الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
وزارة التعليم العالي و البحث العلمي

Université Ferhat Abbas Sétif 1
Faculté des Sciences de la
Nature et de la Vie

جامعة فرحات عباس، سطيف 1
كلية علوم الطبيعة و الحياة

DEPARTEMENT DE MICROBIOLOGIE

N°...../SNV/**2017**

THÈSE

Présentée par

HENDEL Noui

Pour l'obtention du diplôme de

DOCTORAT EN SCIENCES

Filière: BIOLOGIE

Spécialité: MICROBIOLOGIE

THÈME

Etude phytochimique et activités biologiques de *Rosmarinus officinalis* L. et *Thymus ciliatus* (Desf.) Benth. de la région de M'sila : applications antifongiques.

Soutenue publiquement le 19/02/**2017**

DEVANT LE JURY

Président	**BELHATTAB Rachid**	**Pr. UFA Sétif 1**
Directeur	**LAROUS Larbi**	**Pr. UFA Sétif 1**
Examinateurs	**ZERROUG Med. Mihoub**	**Pr. UFA Sétif 1**
	KECHA Mouloud	**Pr. UAM Bejaia**
	BOUTAIBA Saad	**MCA, UZA Djelfa.**
	SARRI Madani	**MCA, UMB M'sila.**

Année universitaire : 2016/2017

REMERCIEMENTS

J'exprime ma profonde gratitude à Monsieur Larbi LAROUS, Professeur à l'université de Setif-1 et mon directeur de thèse, pour m'avoir encadré, la confiance qu'il m'a accordée, sa gentillesse et bienveillance, ainsi que pour ses qualités pédagogiques, ses remarques pertinentes et ses conseils.

Je voudrais également exprimer ma gratitude et mes remerciements au Docteur Giuseppe RUBERTO et au Docteur Edoardo NAPOLI de Istituto del CNR di Chimica Biomolecolare, Catania- Italy pour leur aide dans l'identification phytochimique des différents HEs qui ont fait l'objet d'une partie de ce travail. Je tiens à remercier aussi Docteur Antonella SAIJA, Mariateresa CRISTANI, Antonia NOSTRO, Giovanna GINESTRA du Dipartimento Scienze del Farmaco e dei Prodotti per la Salute, Università di Messina, Italy pour leur aide et bon accueil dans leurs laboratoires.

Je remercie particulièrement Docteur TOUMATIA Omrane du laboratoire de Biologie des Systèmes Microbiens (LBSM) de l'Ecole Normale Supérieure de Kouba pour son aide relative aux souches fongiques.

Mes sincères remerciements vont au Professeur BELHATTAB Rachid, université de Setif-1, d'avoir accepté de présider le jury de cette thèse. Je voudrais également remercier le Professeur ZERROUG Med. Mihoub, université Sétif-1, le Professeur KECHA Mouloud, UAM de Bejaia, BOUTAIBA Saad, Maitre de conférences A, UZA de Djelfa, et SARRI Madani, Maitre de conférences A, UMB de M'sila, pour avoir accepté de faire partie de ce jury.

Merci aussi aux collègues : SELLOUM Mounir, SARRI Djamel, BOUDJELAL Amel, SEGHIRI Kamel, BECISSA Oussama, GUETTOUACHE Mourad, MERNIZ Noureddine, REBBAS Khellaf, HARIR Mohamed, DJELILATE Mohamed, BOUAOUICHE Abderrahmène , KHALDI Mourad, BOUNAR Rabah, SERTI Smail, pour leurs aide et conseils.

Mes remerciements s'adressent aussi à tous et toutes les responsables des laboratoires de biologie de l'université de M'sila.

Je remercie infiniment mes ex-étudiantes: BELBEY Leila et OTHMANI Zineb.

DEDICACES

Louange à ALLAH le Miséricordieux, le très Miséricordieux qui nous a guidés vers le droit chemin,

A mes très chers parents,

A ma chère épouse,

A mes chers enfants Ouail-Abderrahmène, Safaa et Zineb,

A mon frère Abdallah et mes sœurs et leurs familles,

A mes beaux-frères et leurs familles,

A tous qui m'ont enseigné,

A tous mes amis,

Je dédie ce travail.

Noui

SOMMAIRE

REMERCIEMENTS

SOMMAIRE **I**

LISTE DES ABRÉVIATIONS V

LISTE DES FIGURES VI

LISTE DES TABLEAUX IX

RÉSUMÉ X

ملخـــص XI

ABSTRACT XII

INTRODUCTION GENERALE **1**

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

1. Les plantes: source d'antimicrobiens et de conservateurs naturels **3**

2. Les lamiacées **5**

2.1. Biogéographie des lamiacées **6**

2.2. Importance économique **6**

3. Plantes étudiées **7**

3.1. Romarin: *Rosmarinus officinalis* L. **7**

3.2. Thym: *Thymus ciliatus* (Desf.) Benth. **9**

4. Les huiles essentielles (HEs) **10**

4.1. Propriétés antioxydante et antimicrobienne des HEs **12**

5. Les champignons filamenteux **17**

5.1. Les champignons agents de détérioration **17**

5.2. Champignons étudiés **20**

5.2.1. *Alternaria* **20**

5.2.2. *Aspergillus* **21**

5.2.3. *Botrytis* **21**

5.2.4. *Cladosporium* **22**

5.2.5. *Fusarium* **23**

5.2.6. *Moniliella* **24**

5.2.7. *Penicillium* **24**

5.2.8. *Ulocladium* **25**

MATERIELS ET METHODES

1. Présentation de la région d'étude **27**

2. Enquête ethnobotanique **29**

3. Plantes testées **31**

3.1. Origine **31**

3.2. Extraction de l'huile essentielle (HE) **32**

3.3. Extraction par soxhlet **32**
3.4. Etude phytochimique **32**
3.4.1. Analyses GC et GC-MS des HEs **32**
3.4.2. Dosage des polyphénols totaux **33**
3.4.3. Dosage des flavonoïdes totaux **33**
3.5. Activités biologiques **33**
3.5.1. Tests d'activité antioxydante **33**
3.5.1.1. Détection rapide d'antioxydant par dot-blot et coloration au DPPH **33**
3.5.1.2. Séparation par Chromatographie sur Couche Mince (CCM) **34**
3.5.1.3. Test au DPPH **34**
3.5.1.4. Test de blanchiment du β- carotène **34**
3.5.1.5. Test du pouvoir réducteur **35**
4. Champignons testés **36**
4.1. Origine **36**
4.2. Isolement et identification des moisissures **37**
4.2.1. Milieux et méthodes d'identification **37**
4.2.2. Activité antifongique **39**
4.2.2.1. Test de la plante en poudre sur la croissance mycélienne des champignons **39**
4.2.2.2. Test de fumigation des HEs des plantes testées **39**
4.2.2.3. Test de contact direct des HEs dans le milieu de culture **39**
4.2.2.4. Test des puits de diffusion **40**
4.2.2.5. Test de viabilité des champignons totalement inhibés. **40**
4.3. **Analyses statistiques** **40**

RESULTATS ET DISCUSSION

1. Enquête ethnobotanique **39**
1.1. Aperçu général sur les informateurs **39**
1.2. Plantes médicinales utilisées **39**
2. Plantes testées **45**
2.1. Rendements d'extraction **45**
2.2. Etude phytochimique **45**
2.2.1. Analyses GC et GC-MS des HEs **45**
2.2.2. Dosage des polyphénols et flavonoïdes totaux **49**
2.3. Activités biologiques **50**
2.3.1. Tests d'activité antioxydante **50**
2.3.1.1. Détection rapide d'antioxydant par dot-blot et coloration au DPPH **50**
2.3.1.2. Séparation par Chromatographie sur Couche Mince (CCM) **50**
2.3.1.3. Test au DPPH **52**
2.3.1.4. Test de blanchiment du β- carotène **53**
2.3.1.5. Test du pouvoir réducteur **54**
3. Champignons testés **56**

3.1. Origine **56**
3.2. Identification des champignons isolés **56**
3.2.1. *Alternaria alternata* **56**
3.2.2. *Aspergillus glaucus* (*Eurotium herbariorum*) **56**
3.2.3. *Aspergillus nidulans* (*Emericella nidulans*) **57**
3.2.4. *Aspergillus niger* **58**
3.2.5. *Cladosporium herbarum* **59**
3.2.6. *Cladosporium sphaerospermum* **59**
3.2.7. *Botrytis aclada* **60**
3.2.8. *Botrytis cinerea* **60**
3.2.9. *Moniliella suaveolens* **61**
3.2.10. *Fusarium oxysporum* **61**
3.2.11. *Penicillium aurantiogriseum* **62**
3.2.12. *Penicillium chrysogenum* **62**
3.2.13. *Penicillium digitatum* **62**
3.2.14. *Penicillium expansum* **63**
3.2.15. *Penicillium griseofulvum* **64**
3.2.16. *Penicillium italicum* **64**
3.3. Tests d'activité antifongique **66**
3.3.1. Effet antifongique sur chaque champignon **66**
3.3.1.1. *Alternaria alternata* (f) **66**
3.3.1.2. *Alternaria alternata* (g) **66**
3.3.1.3. *Aspergillus flavus* **68**
3.3.1.4. *Aspergillus flavus* NRLL3251 **68**
3.3.1.5. *Aspergillus glaucus* (*Eurotium herbariorum*) **69**
3.3.1.6. *Aspergillus nidulans* (*Emericella nidulans*) **69**
3.3.1.7. *Aspergillus niger* **67**
3.3.1.8. *Aspergillus niger* ATCC16404 **71**
3.3.1.9. *Aspergillus ochraceus* ATCC 28947 **71**
3.3.1.10. *Aspergillus parasiticus* **73**
3.3.1.11. *Aspergillus parasiticus* CBS100926 **73**
3.3.1.12. *Botrytis aclada* **74**
3.3.1.13. *Botrytis cinerea* **74**
3.3.1.14. *Cladosporium herbarum* **76**
3.3.1.15. *Cladosporium sphaerospermum* **76**
3.3.1.16. *Fusarium culmorum* **77**
3.3.1.17. *Fusarium graminearum* **77**
3.3.1.18. *Fusarium moniliforme* **77**
3.3.1.19. *Fusarium oxysporum* isolé de la banane **79**

3.3.1.20. *Fusarium oxysporum* (type sauvage) **79**
3.3.1.21. *Fusarium oxysporum* f.sp. lini **79**
3.3.1.22. *Fusarium proliferatum* **81**
3.3.1.23. *Moniliella suaveolens* **81**
3.3.1.24. *Penicillium citreonigrum* **83**
3.3.1.25. *Penicillium aurantigriseum* **83**
3.3.1.26. *Penicillium griseofulvum* **84**
3.3.1.27. *Penicillium digitatum* **84**
3.3.1.28. *Penicillium expansum* **86**
3.3.1.29. *Penicillium chrysogenum* **86**
3.3.1.30. *Penicillium frequentens* **86**
3.3.1.31. *Penicillium italicum* **88**
3.3.1.32. *Ulocladium chartarum* **88**
3.3.2. Viabilité des champignons totalement inhibés. **89**
3.3.3. Discussion de l'activité antifongique des plantes étudiées **90**
CONCLUSION GENERALE **100**
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES **103**
ANNEXES **116**
PUBLICATIONS **122**

LISTE DES ABREVIATIONS

AA: Acide ascorbique
BHA: Butylhydroxytoluène
BHT: Butylhydroxyanisol
CCM: Chromatographie sur Couche Mince
CG-SM: Chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse.
CYA: Czapek Yeast Extract Agar.
DMSO: diméthylsulphoxide
DPPH: 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl
EAG: Equivalents d'acide gallique
EM : Extrait méthanolique.
EMs : Extraits méthanoliques.
EQ : Equivalents de quercétine
G25N: 25% Glycerol Nitrate Agar.
HE : Huile essentielle.
HEs : Huiles essentielles.
ICM: Inhibition de la croissance mycélienne
MEA: Malt Extract Agar.
PDA: Potato dextrose Agar.
R_{EM} : Extrait méthanolique de romarin.
R_f: Rapport frontal
R_{HE} : Huile essentielle de romarin.
T_{EM} : Extrait méthanolique de thym.
T_{HE} : Huile essentielle de thym.
TPT: Teneur en polyphénols totaux

LISTE DES FIGURES

		page
Figure 1.	Principales localisations des sites d'action des constituants des HEs (Burt, 2004).	**13**
Figure 2.	*Alternaria* sp (**A**) et *Aspergillus* sp (**B**) (Botton *et al.*, 1990)	**21**
Figure 3.	*Botrytis cinerea* ; Conidiophores se développant d'un sclerotium (**a**), blastoconidies à l'apex du conidiophore (**b**), (Webster and Weber, 2007).	**23**
Figure 4.	*Cladosporium* sp. ; Conidiophores (**A**), conidies (**B**), (Messiaen *et al.*, 1991).	**23**
Figure 5.	(**A**) *Fusarium* sp.: macroconidies (**a**), microconidies (**b**) ; et (**B**) *Moniliella suaveolens*: chaînes conidiennes (**a**), conidies (**b**) (Botton *et al.*, 1990).	**24**
Figure 6.	*Penicillium expansum* : têtes conidiennes et conidies, (Samson and Pitt, 1990).	**25**
Figure 7.	*Ulocladium chartarum* : conidiophores et conidies, (Campbell *et al.*, 2013).	**26**
Figure 8.	Localisation de la wilaya de M'sila et les régions de collecte des plantes étudiées.	**28**
Figure 9.	Démarche méthodologique de l'enquête ethnobotanique.	**29**
Figure 10.	Fiche questionnaire modifiée (Mehdiou et Kahouadji, 2007).	**30**
Figure 11.	Photo d'un arbrisseau (**A**) et des feuilles et fleurs (**B**) de *R. officinalis* poussant spontanément à Kaf-el-Assel (M'sila).	**31**
Figure 12.	Photo d'un sous- arbrisseau (**A**) et des feuilles et fleurs (**B**) de *T. ciliatus* poussant spontanément à Bou Sâada (M'sila).	**31**
Figure 13.	Quelques fruits et légumes sources de champignons.	**36**
Figure 14.	Schéma de culture des isolats fongiques destiné à leur identification (Pitt and Hocking, 2009).	**37**
Figure 15.	Culture sur lame pour observation des organes de fructification.	**38**
Figure 16.	Les familles des plantes médicinales les plus dominantes dans l'usage traditionnel à M'sila.	**42**
Figure 17.	Lamiacées utilisées en médecine traditionnelle à M'sila.	**42**
Figure 18.	Criblage rapide du pouvoir antioxidant des extraits méthanolique et HE par dot-blot et coloration au DPPH.	**51**
Figure 19.	Analyse par CCM des EMs et HEs des plantes testées.	**51**
Figure 20.	Graphique montrant le changement de couleur du DPPH du violet au jaune quand il est exposé à une substance antioxydante (Pérez and Aguilar, 2013).	**52**
Figure 21.	*Alternaria alternata* après 7 jours d'incubation à 25°C.	**57**
Figure 22.	*Aspergillus glaucus* (*Eurotium herbariorum*) après 7 jours d'incubation à 25°C.	**57**
Figure 23.	*Aspergillus nidulans* (*Emericella nidulans*) après 7 jours d'incubation à 25°C.	**58**
Figure 24.	*Aspergillus niger* après 7 jours d'incubation à 25°C.	**58**
Figure 25.	*Cladosporium herbarum* après 7 jours d'incubation à 25°C.	**59**
Figure 26	*Cladosporium sphaerospermum* après 7 jours d'incubation à 25°C.	**59**
Figure 27.	*Botrytis aclada* après 7 jours d'incubation à 25°C sur (1) CYA, (2); MEA, (3) PDA ; (4) formation de sclérotes ; (5) conidiophores et conidies sur lame de culture, (6) conidiophore et conidies entre lame et lamelle après coloration. (F= face ; R= revers).	**60**
Figure 28.	*Botrytis cinerea* (1) sur milieu PDA, (2) conidiophore et conidies sur lame de culture.	**60**
Figure 29.	*Moniliella suaveolens* après 7 jours d'incubation à 25°C.	**61**
Figure 30.	*Fusarium oxysporum* sur : (1) PDA, (2) aspect microscopique sur lame de culture.	**61**
Figure 31.	*Penicillium aurantiogriseum* après 7 jours d'incubation à 25°C.	**62**
Figure 32.	*Penicillium chrysogenum* après 7 jours d'incubation à 25°C.	**63**

Figure 33. *Penicillium digitatum* après 7 jours d'incubation à 25°C. **63**

Figure 34. *Penicillium expansum* après 7 jours d'incubation à 25°C. **64**

Figure 35. *Penicillium griseofulvum* après 7 jours d'incubation à 25°C. **65**

Figure 36. *Penicillium italicum* après 7 jours d'incubation à 25°C. **65**

Figure 37. Croissance du champignon *A. alternata* (f) sur PDA sous l'effet des HEs, des EMs et de la poudre des plantes *R. officinalis* et *T. ciliatus.* **67**

Figure 38. Croissance du champignon *A. alternata* (g) sur PDA sous l'effet des HEs, des EMs et de la poudre des plantes *R. officinalis* et *T. ciliatus.* **67**

Figure 39. Croissance du champignon *A. flavus* (type sauvage) sur PDA sous l'effet des HEs, des EMs et de la poudre des plantes *R. officinalis* et *T. ciliatus.* **68**

Figure 40. Croissance du champignon *A. flavus* NRLL3251 sur PDA sous l'effet des HEs, des EMs et de la poudre des plantes *R. officinalis* et *T. ciliatus.* **69**

Figure 41. Croissance du champignon *A. glaucus* (*Eurotium herbariorum*) sur PDA sous l'effet des HEs, des EMs et de la poudre des plantes *R. officinalis* et *T. ciliatus.* **70**

Figure 42. Croissance du champignon *A. nidulans* (*Emericella nidulans*) sur PDA sous l'effet des HEs, des EMs et de la poudre des plantes *R. officinalis* et *T. ciliatus.* **70**

Figure 43. Croissance du champignon *A. niger* sur PDA sous l'effet des HEs, des EMs et de la poudre des plantes *R. officinalis* et *T. ciliatus.* **71**

Figure 44. Croissance du champignon *A. niger* ATCC16404 sur PDA sous l'effet des HEs, des EMs et de la poudre des plantes *R. officinalis* et *T. ciliatus.* **72**

Figure 45. Croissance du champignon *A. ochraceus* ATCC 28947 sur PDA sous l'effet des HEs, des EMs et de la poudre des plantes *R. officinalis* et *T. ciliatus.* **72**

Figure 46. Croissance du champignon *A. parasiticus* sur PDA sous l'effet des HEs, des EMs et de la poudre des plantes *R. officinalis* et *T. ciliatus.* **73**

Figure 47. Croissance du champignon *A. parasiticus* CBS100926 sur PDA sous l'effet des HEs, des EMs et de la poudre des plantes *R. officinalis* et *T. ciliatus.* **74**

Figure 48. Croissance du champignon *B. aclada* sur PDA sous l'effet des HEs, des EMs et de la poudre des plantes *R. officinalis* et *T. ciliatus.* **75**

Figure 49. Croissance du champignon *B. cinerea* sur PDA sous l'effet des HEs, des EMs et de la poudre des plantes *R. officinalis* et *T. ciliatus.* **75**

Figure 50. Croissance du champignon *C. herbarum* sur PDA sous l'effet des HEs, des EMs et de la poudre des plantes *R. officinalis* et *T. ciliatus.* **76**

Figure 51. Croissance du champignon *C. sphaerospermum* sur PDA sous l'effet des HEs, des EMs et de la poudre des plantes *R. officinalis* et *T. ciliatus.* **77**

Figure 52. Croissance du champignon *F. culmorum* sur PDA sous l'effet des HEs, des EMs et de la poudre des plantes *R. officinalis* et *T. ciliatus.* **78**

Figure 53. Croissance du champignon *F. graminearum* sur PDA sous l'effet des HEs, des EMs et de la poudre des plantes *R. officinalis* et *T. ciliatus.* **78**

Figure 54. Croissance du champignon *F. moniliforme* sur PDA sous l'effet des HEs, des EMs et de la poudre des plantes *R. officinalis* et *T. ciliatus.* **79**

Figure 55. Croissance du champignon *F. oxysporum* (souche isolée de banane) sur PDA sous l'effet des HEs, des EMs et de la poudre des plantes *R. officinalis* et *T. ciliatus.* **80**

Figure 56. Croissance du champignon *F. oxysporum* (type sauvage) sur PDA sous l'effet des HEs, des EMs et de la poudre des plantes *R. officinalis* et *T. ciliatus.* **80**

Figure 57. Croissance du champignon *F. oxysporum* f.sp. *lini* sur PDA sous l'effet des HEs, des EMs et de la poudre des plantes *R. officinalis* et *T. ciliatus.* **81**

Figure 58. Croissance du champignon *F. proliferatum* sur PDA sous l'effet des HEs, des EMs et de la poudre des plantes *R. officinalis* et *T. ciliatus.* **82**

Figure 59. Croissance du champignon *M. suaveolens* sur PDA sous l'effet des HEs, des EMs et de la poudre des plantes *R. officinalis* et *T. ciliatus.* **82**

Figure 60. Croissance du champignon *P. citreonigrum* sur PDA sous l'effet des HEs, des EMs et de la poudre des plantes *R. officinalis* et *T. ciliatus.* **83**

Figure 61. Croissance du champignon *P. aurantigriseum* sur PDA sous l'effet des HEs, des EMs et de la poudre des plantes *R. officinalis* et *T. ciliatus.* **84**

Figure 62. Croissance du champignon *P. griseofulvum* sur PDA sous l'effet des HEs, des EMs et de la poudre des plantes *R. officinalis* et *T. ciliatus.* **85**

Figure 63. Croissance du champignon *P. digitatum* sur PDA sous l'effet des HEs, des EMs et de la poudre des plantes *R. officinalis* et *T. ciliatus.* **85**

Figure 64. Croissance du champignon *P. expansum* sur PDA sous l'effet des HEs, des EMs et de la poudre des plantes *R. officinalis* et *T. ciliatus.* **86**

Figure 65. Croissance du champignon *P. chrysogenum* sur PDA sous l'effet des HEs, des EMs et de la poudre des plantes *R. officinalis* et *T. ciliatus.* **87**

Figure 66. Croissance du champignon *P. frequentens* sur PDA sous l'effet des HEs, des EMs et de la poudre des plantes *R. officinalis* et *T. ciliatus.* **87**

Figure 67. Croissance du champignon *P. italicum* sur PDA sous l'effet des HEs, des EMs et de la poudre des plantes *R. officinalis* et *T. ciliatus.* **88**

Figure 68. Croissance du champignon *U. cartarum* sur PDA sous l'effet des HEs, des EMs et de la poudre des plantes *R. officinalis* et *T. ciliatus.* **89**

Figure 69. Effet des poudres et extraits méthanoliques de *R.officinalis* et *T. ciliatus* sur la croissance radiale des champignons testés sur PDA. **91**

Figure 70. Effet de la plante en poudre sur la croissance radiale de quelques champignons testés ; **1-** *A. ochraceus*, **2-** *A. parasiticus*, **3-** *B. aclada*, **4-** *F. oxysporum*, **5-** *P. expansum* . **92**

Figure 71. Effet de l'extrait méthanolique sur la croissance radiale de quelques champignons testés; **1-** *P. digitatum*, **2-** *F. graminearum*, **3-** *A. alternata*, **4-** *F. oxysporum*, **5-** *F. proliferatum*. **92**

Figure 72. Effet des HEs de *R.officinalis* et *T. ciliatus* sur la croissance radiale des champignons testés sur PDA par la méthode de contact direct. **93**

Figure 73. Effet des HEs de *R.officinalis* et *T. ciliatus* sur la croissance radiale des champignons testés sur PDA par la méthode de fumigation. **95**

Figure 74. Effet de l'HE par contact direct sur la croissance radiale de **(1)** *M. suaveolens*, **(2)** *F. culmorum,* **(3)** *P. griseofulvum* et **(4)** *P. expansum***.** **96**

Figure 75. Effet de l'HE par fumigation sur la croissance radiale de **(1)** *B. cinerea*, **(2)** *A. alternata*, **(3)** *F. graminearum* et **(4)** *A. flavus.* **96**

Figure 76. Profil chromatographique: L'HE de *R. officinalis* (**A**) et l'HE de *T. ciliatus* (**B**). **116**

Figure 77. Droite d'étalonnage : acide gallique (**A**) et quercétine (**B**). **117**

Figure 78. Inhibition du radical libre DPPH par : EM de *R. officinalis* (**A**), EM de *T. ciliatus* (**B**), HE de *R. officinalis* (**C**), HE de *T. ciliatus* (**D**), BHA (**E**), BHT (**F**) et AA (**G**). **118**

Figure 79. Inhibition du blanchiment du ß-carotène par : EM de *R. officinalis* (**A**), EM de *T. ciliatus* (**B**), HE de *R. officinalis* (**C**), HE de *T. ciliatus* (**D**), BHA (**E**) et BHT (**F**). **119**

Figure 80. Pouvoir réducteur : EM de *R. officinalis* (**A**), EM de *T. ciliatus* (**B**), HE de *R. officinalis* (**C**), HE de *T. ciliatus* (**D**) et BHT (**E**), AA (**F**). **120**

LISTE DES TABLEAUX

		page
Tableau 1.	Effet antifongique de quelques HEs.	**15**
Tableau 2.	Différentes catégories de produits alimentaires et les espèces fongiques les plus couramment associés (Dijksterhuis *et al.*, 2013).	**18**
Tableau 3.	Usages et modes de préparation des lamiacées utilisées en médecine traditionnelle à M'sila.	**44**
Tableau 4.	Composition chimique de l'HE de *R. officinalis* de Kaf-el-Assel (Hammam-Dalâa -M'sila-).	**46**
Tableau 5.	Composition chimique de l'HE de *T. ciliatus* de Djbel Messaâd (M'sila).	**48**
Tableau 6.	Teneurs en polyphénols et flavonoïdes totaux des EMs et des HEs des plantes étudiées	**49**
Tableau 7.	Activités antioxydantes, des extraits des plantes testées et les antioxydants standards.	**52**
Tableau 8.	les champignons isolés et leurs origines d'isolement.	**56**
Tableau 9.	Champignons totalement inhibés selon la technique et la concentration appliquées.	**89**

Résumé

Le but de cette étude est d'inventorier les plantes médicinales de la famille des labiées courantes et utilisées par la population de la région de M'sila, et d'évaluer *in vitro* les activités antioxydante et antifongique des huiles essentielles (HE) et des extraits méthanoliques (EM) issues de deux labiées. Une enquête ethnobotanique a été menée au niveau de la région d'étude et une liste des labiées utilisées a été dressée. Deux labiées très fréquentes ont été choisies pour notre étude: *Rosmarinus officinalis* L. (romarin) et *Thymus ciliatus* (Desf) Benth. (thym). La composition chimique des HEs a été déterminée par GC-MS. L'HE de *R. officinalis* est composée de 31 éléments dont principalement le camphre (41.2%), camphène (18.1%) et α-pinène (17.4%) ; celle de *T. ciliatus* est composée de 58 éléments dont principalement en pourcentage α-pinène (22.18), myrcène (13.13), β-pinène (7.69), β-caryophyllène (10.23) et germacrène D (9.86). L'activité antioxydante a été évaluée selon trois méthodes : l'EM du romarin était le plus puissant, et le plus proche aux antioxydants synthétiques BHA, BHT et acide ascorbique; DPPH (IC_{50}= 13.33 ± 0.13 µg/ml), β-carotène/acide linoléique (IC_{50}= 38.11 ± 2.26µg/ml) et pouvoir réducteur (EC_{50}= 14.03 ± 1.35µg/ml). L'activité antifongique s'est appliquée sur 32 champignons phytopathogènes et de contamination alimentaire. Quatre méthodes ont été appliquées sur milieu solide: l'EM, appliqué par méthode des puits de diffusion (0.7g/ml), était le moins efficace. L'incorporation de la plante en poudre au milieu de culture (à 10%) a réduit la croissance de 21.88% et 6.25% de l'ensemble des champignons, à plus de 50%, pour *R. officinalis* et *T. ciliatus* respectivement. Différentes concentrations d'HE ont été testées. L'HE appliquée par incorporation au milieu de culture (1500µl/l) a inhibé 50% des champignons aux niveaux 50 et 75% pour *R. officinalis* et *T. ciliatus* respectivement, avec une inhibition totale de 4 champignons. La fumigation d'HE (15µl) a inhibé 65% des champignons aux niveaux 65 et 81.25% pour *R. officinalis* et *T. ciliatus* respectivement, avec une inhibition totale de 5 champignons. L'inhibition a été accompagnée d'une sporulation faible voire absente. Nos résultats ont révélé une partie du fort potentiel des plantes étudiées pour lutter contre les maladies fongiques dans les aliments et ont présenté leur caractère prometteur d'être une source alternative aux pesticides chimiques et conservateurs synthétiques. D'autres études sont nécessaires pour trouver des techniques d'application adéquates dans le domaine de sécurité alimentaire.

Mots clés: ethnobotanique, lamiaceae, huiles essentielles, GC-MS, activité antioxydante, activité antifongique, *R. officinalis*, *T. ciliatus*.

ملخص

تهدف هذه الدراسة إلى حصر النباتات الطبية التابعة لعائلة الشفويات و المستخدمة من قبل سكان منطقة المسيلة، وتقييم النشاط المضاد للأكسدة و النشاط المضاد للفطريات في المختبر للزيوت الأساسية و المستخلصات الميثانولية لاثنتين من هذه النباتات. أجري استقصاء إثنونباتي في منطقة الدراسة وحُددت قائمة النباتات الشفوية المستعملة. اختيرت اثنتان من النباتات الشفوية الشائعة لغرض الدراسة و هما *Rosmarinus officinalis* L. (إكليل الجبل) و *Thymus ciliatus* (Desf.) Benth. (الزعتر). حُدّد التركيب الكيميائي للزيت الأساسي لكل منهما باستعمال الكرماتوغرافيا GC-MS. يتكون زيت *R. officinalis* من 31 عنصرا منها أساسا camphre (41.2٪) ، camphène (18.1٪) و α-pinène(17.4٪) ؛ و يتكون زيت *T. ciliatus* من 58 عنصرا منها أساسا، بالنسبة المئوية، α-pinène (22.18)، myrcène (13.13)، β-pinène (7.69)، β-caryophyllene (10.23) وD germacrene (9.86). قُدّر النشاط المضادة للأكسدة باستخدام ثلاث طرق: كان المستخلص الميثانولي لإكليل الجبل الأكثر فعالية والأقرب إلى المواد الاصطناعية المضادة للأكسدة BHA، BHT وحمض الأسكوربيك؛ DPPH (IC_{50}= 13.33 ±0.13µg/ml) ، β-carotène/acide linoléique (IC_{50} = 38.11 ± 2.26 µg/ml)، والقدرة الإرجاعية pouvoir réducteur (EC_{50} = 14.03 ± 1.35 µg/ml). طُبّق النشاط المضاد للفطريات على 32 فطر ممرض للنباتات و مسبب لتلوث الأغذية و ذلك باستعمال أربع طرق في الوسط الزراعي الصلب. كان المستخلص الميثانولي (0.7 g/ml)، المطبق بطريقة الآبار، الأقل فعالية. أدى تطبيق مسحوق النبتة بطريقة المزج بالوسط الزراعي (بنسبة 10٪) إلى تخفيض نمو 21.88٪ و 6.25٪ من جميع الفطريات، إلى أكثر من 50٪، لكل من *R. officinalis* و *T. ciliatus* على التوالي. أما الزيت الأساسي فطُبّق بتراكيز مختلفة. أدى التطبيق بطريقة المزج بالوسط الزراعي (1500µl/l) إلى تثبيط نمو 50٪ من مجموع الفطريات، بمقدار 50 و 75٪ ، لكل من *R. officinalis* و *T. ciliatus* على التوالي، مع تثبيط تام لأربعة فطريات .كما أدى تطبيقه بطريقة التبخير (µl15) إلى تثبيط 65٪ من مجموع الفطريات بمقدار 65 و 81.25٪ لكل من *R. officinalis* و *T. ciliatus* على التوالي، مع تثبيط تام لخمسة فطريات. و رافق التثبيط تأثير واضح على إنتاج الأبواغ حيث كانت درجة التبوغ من ضعيفة الى منعدمة. بينت هذه النتائج جزءا هاما من إمكانات النبتتين المدروستين في مكافحة الأمراض و التلوثات الفطرية في المواد الغذائية وقدمت الصفة التي تجعل منها مصدرا بديلا للمبيدات الكيميائية والمواد الحافظة التركيبية، و يبقى مجال الدراسات مفتوحا لإيجاد تقنيات التطبيق الملائمة في مجال السلامة الغذائية.

كلمات مفتاحية : الإثنونباتية، العائلة الشفوية، الزيوت الأساسية، GC-MS، النشاط المضاد للأكسدة، النشاط المضاد للفطريات، *R.officinalis*، *T. ciliatus*.

Abstract

The aim of this study is to inventory the common medicinal plants of the Labiatae family used by the population of the M'sila region, and to evaluate the *in vitro* antioxidant and antifungal activities of the essential oils (EO) and methanol extracts (ME) from two labiates. An ethnobotanical survey was conducted at the study area and used labiates were listed. Two very common labiates were chosen for this study: *Rosmarinus officinalis* L. (rosemary) and *Thymus ciliatus* (Desf) Benth. (thyme). The chemical composition of EOs was determined by GC-MS. *R. officinalis* EO is composed of 31 components of which mainly camphor (41.2%), camphene (18.1%) and α-pinene (17.4%); *T. ciliatus* EO is composed of 58 items components of which mainly, in percentage, α-pinene (22.18), myrcene (13.13), β-pinene (7.69), β-caryophyllene (10.23) and germacrene D (9.86). The antioxidant activity was assessed using three methods: rosemary ME was the most potent and the closest to synthetic antioxidants BHA, BHT and ascorbic acid; DPPH (IC_{50} = 13.33 ± 0.13 µg/ml), β-carotene/linoleic acid (IC_{50} = 38.11 ± 2.26 µg/ml) and reducing power (EC_{50} = 14.03 ± 1.35µg/ml). The antifungal activity was applied to 32 plant pathogenic and foodborne fungi. Four methods were applied to solid medium: the ME, applied by well diffusion method (0.7g/ml), was less effective. The incorporation of the powdered plant into the culture medium (at 10%) reduced the growth of 21.88% and 6.25% of all fungi, to greater than 50%, for *R. officinalis* and *T. ciliatus* respectively. Different concentrations of EO were tested. Applied EO by incorporation into the culture medium (1500µl/l) inhibited 50% of the molds to the levels 50 and 75% for *R. officinalis* and *T. ciliatus* respectively, with complete inhibition of 4 fungi. Fumigated EO (15µl) inhibited 65% of the molds to the levels 65 and 81.25% for *R. officinalis* and *T. ciliatus* respectively, with complete inhibition of 5 fungi. The inhibition was accompanied by low or absent sporulation. Our results revealed some of the potential of studied plants to fight against fungal diseases in foods and presented their promising character of being an alternative source of chemical pesticides and synthetic preservatives. Further studies are needed to find adequate application techniques in the food safety area.

Keywords: ethnobotany, lamiaceae, essential oils, GC-MS, antioxidant activity, antifungal activity, *R. officinalis*, *T. ciliatus*.

INTRODUCTION GÉNÉRALE

INTRODUCTION GENERALE

Deux tiers de la population mondiale d'aujourd'hui dépendent de l'agriculture pour leur survie, mais aujourd'hui, la croissance et la production de cultures agricoles restreignent de jour en jour. L'utilisation intensive des produits chimiques organiques synthétiques au cours des dernières décennies a conduit à certains problèmes environnementaux de long-terme. Les engrais chimiques et les pesticides s'accumulent continuellement dans l'environnement, nuisent à l'écosystème, provoquant une pollution, et infligeant des maladies à des niveaux alarmants. Par conséquent, il est très urgent d'identifier des alternatives aux pesticides chimiques pour la protection des végétaux, sans sacrifier la productivité et la rentabilité de l'agriculture (Mishra *et al.*, 2015).

La sécurité alimentaire et les maladies d'origine alimentaire forment des problèmes de santé publique de plus en plus importants. Tous les produits alimentaires sont constitués de matières premières biologiques et se détériorent au cours du temps. Les denrées alimentaires représentent un bon milieu de croissance pour les microorganismes, et la détérioration microbienne des produits alimentaires entraîne des pertes économiques élevées pour l'industrie alimentaire. Le désir des transformateurs de produits alimentaires est de ralentir le rythme de détérioration autant que possible à travers la formulation, la transformation, l'emballage, le stockage et la manipulation. Ainsi, des méthodes efficaces pour réduire ou éliminer les agents pathogènes d'origine alimentaire ou les microbes qui causent la détérioration des aliments sont nécessaires. En même temps, il existe une demande croissante du côté du consommateur pour des produits avec moins d'additifs alimentaires synthétiques, ainsi, un grand intérêt pour l'utilisation de substances naturelles, pour la conservation des aliments, comme une alternative pour la large gamme d'additifs chimiques synthétiques, est apparu.

Les plantes médicinales forment un élément important des systèmes médicaux autochtones dans le monde. Ces ressources sont généralement considérées comme partie des connaissances «traditionnelles» d'une culture. Au cours des dernières années, l'utilisation de ces informations dans la recherche sur les plantes médicinales a reçu un intérêt considérable dans la communauté scientifique. Ces évolutions conduisent à un défi considérable pour les ethnobotanistes et les ethnopharmacologistes. Simultanément, la nécessité de recherches scientifiques de base sur les plantes médicinales en utilisant des systèmes médicaux autochtones devient de plus en plus pertinente (Heinrich, 2000).

Les plantes sont connues pour produire une large variété de molécules ayant de forts effets antioxydants tels que les vitamines et les composés phénoliques. Récemment, l'intérêt dans la recherche sur le rôle des antioxydants d'origine végétale dans l'alimentation et la santé humaine a augmenté. En raison de la vaste gamme d'effets antimicrobiens et d'autres effets bénéfiques, les plantes productrices d'huiles essentielles (HEs) ont été utilisées comme plantes médicinales pendant des milliers d'années. La tendance récente de l'utilisation de composés naturels dans les médicaments et la conservation des aliments a conduit à un intérêt croissant pour les HEs dans les secteurs de recherche et de l'industrie.

Ce travail s'inscrit dans le cadre de la valorisation de la flore locale d'intérêt thérapeutique dans le but de réduire la flore fongique phytopathogène, dont certains champignons sont connus pour la production de mycotoxines. Nous nous sommes intéressés aux HEs, sans négliger les extraits organiques (extraits méthanoliques -EMs-), issues de *Rosmarinus officinalis* L. et *Thymus ciliatus* (Desf.) Benth. Ces 02 plantes de la famille des lamiacées poussent spontanément dans la région de M'sila, riches en huiles essentielles et sont connues pour leur utilisation en médecine populaire de la dite région.

Ce travail est structuré en trois chapitres:

Le premier chapitre est consacré à une synthèse bibliographique portant sur une présentation générale des plantes comme source d'antimicrobiens et conservateurs naturels, en particulier les lamiacées et leurs HEs. Les genres des espèces fongiques et les plantes sources d'HEs étudiés dans ce travail sont également décrits brièvement.

Le deuxième chapitre concerne le matériel et la description des méthodes appliquées.

La partie résultats et discussions est présentée dans le troisième chapitre sous la structure:

- Résultats et discussion de l'enquête ethnobotanique.
- Résultats et discussion de l'analyse phytochimique des HEs et EMs, à savoir la CG-SM des HEs, dosage des polyphénols et flavonoïdes totaux, activité antioxydante par plusieurs méthodes.
- Identification des champignons isolés.
- Résultats et discussion de l'activité antifongique des HEs et EMs, de chaque plante sur chaque champignon, par différentes méthodes.

En fin une conclusion générale.

CHAPITRE I
SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

1. Les plantes: source d'antimicrobiens et de conservateurs naturels

Les plantes ont été à la base de médicaments traditionnels à travers le monde depuis des milliers d'années et de continuer à fournir de nouveaux remèdes pour l'humanité; beaucoup d'efforts ont donc porté sur l'utilisation de techniques expérimentales disponibles pour identifier des antioxydants naturels à partir de plantes. Plusieurs auteurs ont examiné les utilisations bénéfiques de ces espèces végétales (Scartezzini and Speroni, 2000; Matkowski *et al.*, 2008). Récemment, on a examiné de nombreuses herbes médicinales au grand potentiel antioxydant. Cet examen couvre les espèces médicinales à partir de différents pays du monde (Afrique du Sud, Maroc, Egypte, Etats-Unis d'Amérique, Australie, Brésil, Bulgarie, Chine, Inde, Iran, Italie, Japon, Malaisie, Pologne, Portugal, Thaïlande et Turquie). Le but de cet examen est d'étudier la capacité antioxydante et la teneur totale en composés phénoliques des plantes médicinales du monde entier et d'évaluer les sources potentielles d'antioxydants naturels pour des fins alimentaires et médicinales (Ali *et al.*, 2008).

Les effets néfastes du stress oxydatif sur la santé humaine sont devenus un problème grave. L'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) a estimé que 80% des habitants de la planète comptent sur la médecine traditionnelle pour leurs besoins primaires de soins sanitaires, et la plupart de ce traitement implique l'utilisation d'extraits de plantes et de leurs composants actifs. Sous le stress, le corps produit plus d'espèces réactives de l'oxygène (p. ex., les radicaux superoxydes, hydroxyles et perhydroxyles) que d'antioxydants enzymatiques (p. ex., la superoxyde dismutase, le glutathion peroxydase et la catalase) et des antioxydants non-enzymatiques (p. ex., l'acide ascorbique (vitamine C), α-tocophérol (vitamine E), le glutathion, les caroténoïdes, les flavonoïdes etc…). Ce déséquilibre conduit à des dommages cellulaires et des problèmes de santé. Le manque d'antioxydants, qui peut arrêter les radicaux libres réactifs, favorise le développement de maladies dégénératives, dont les maladies cardiovasculaires, les cancers, les maladies neurodégénératives, la maladie d'Alzheimer et les maladies inflammatoires. Une solution à ce problème est de compléter le régime alimentaire avec des composés antioxydants contenues dans les sources végétales naturelles. Ces antioxydants naturels d'origine végétale peuvent donc servir comme un type de médecine préventive. Des rapports récents indiquent qu'il existe une relation inverse entre l'apport alimentaire des aliments riches en antioxydants et l'incidence de la maladie humaine. Cependant, les antioxydants synthétiques, tels que l'hydroxytoluène butylé (BHT) et le butylhydroxyanisole (BHA), ont été largement utilisés comme antioxydants dans l'industrie alimentaire et peuvent être responsables de dommages au foie et de la carcinogenèse. Pour

cette raison, l'intérêt dans l'utilisation des antioxydants naturels a augmenté (Krishnaiah *et al.*, 2011).

Actuellement, en raison de l'expansion rapide de la population mondiale, les pratiques agricoles ont été axées sur l'augmentation de la production alimentaire. La protection des cultures contre les mauvaises herbes, les insectes et les maladies a été nécessaire pour obtenir des rendements plus élevés en agriculture. Les pertes de production, avant récolte, des cultures mondiales majeures dues aux ravageurs (insectes, microorganismes) et aux adventices sont estimées à 35%. Sans une protection efficace des cultures, ces pertes seraient de 70%. La diminution de la production mondiale de denrées alimentaires causée par la non-utilisation des produits phytosanitaires pourrait être à l'origine de famines chez les populations déjà fragilisées. Tous ces arguments pris en compte, il est indéniable que les produits phytosanitaires chimiques présentent de nombreux avantages. Néanmoins, la pollution de l'environnement, en raison de leur biodégradation lente, phytotoxicité, cancérogénicité et déchets toxiques dans les produits agricoles, est un inconvénient important. La production agricole a actuellement une tendance à utiliser des méthodes respectueuses de l'environnement pour le contrôle des maladies et des infections des ravageurs (Prieto *et al.*, 2013; Deravel *et al.*, 2014).

La demande croissante de produits agricoles sans pesticides a conduit à la recherche de nouvelles stratégies, abordables, et moins toxiques pour la lutte antiparasitaire. Parmi ces stratégies les agents biologiques, les sels minéraux et les substances végétales ont suscité un intérêt dans l'industrie. D'une manière générale, les dérivés des plantes (HEs, extraits, fractions et composés) sont généralement considérés comme étant non phytotoxiques et potentiellement efficaces pour lutter contre les champignons pathogènes des plantes. Les extraits de plantes et HEs peuvent avoir un rôle important à jouer dans la conservation des denrées alimentaires contre les champignons. La littérature récente a montré que l'activité biologique d'un grand nombre d'extraits de plantes, d'HEs et leurs composants individuels est liée à l'inhibition de la croissance de divers champignons. La recherche phytochimique a conduit à l'isolement de principes actifs synthétisés par les plantes en réponse aux stress biotiques ou abiotiques, mettant en évidence que ces substances ont une action insecticide, fongicide, bactéricide ou herbicide. Tout au long de leur évolution, les plantes ont développé plusieurs mécanismes de défense pour prévenir les infections dues aux agents pathogènes; elles synthétisent également un grand nombre de métabolites secondaires pour se protéger contre les stress biotiques et abiotiques et pour le maintien de la structure et les

fonctions vitales. Ce sont des raisons pour considérer les plantes comme une source importante de nouveaux biopesticides (Prieto *et al.*, 2013)

Les biopesticides, « organismes vivants ou produits issus de ces organismes ayant la particularité de supprimer ou limiter les ennemis des cultures » sont utilisés depuis des siècles par les fermiers et paysans (Deravel *et al.*, 2014). En terme général, selon la US Environmental Protection Agency (USEPA), les biopesticides sont des pesticides dérivés de matériels naturels tels que les animaux, les plantes, les bactéries et les minéraux. L'Association Internationale des Fabricant d'agents de Biocontrôle (International Biocontrol Manufacturer's Association (IBMA)) et l'Organisation Internationale de Lutte Biologique supportent l'utilisation du terme agents de lutte biologique à la place de biopesticides. L'IBMA Classe les agents de lutte biologique en quatre groupes: (1) microbiens, (2) macrobiens, (3) produits naturels, et (4) écomones (agents modifiant le comportement des insectes). Les biopesticides offrent des outils puissants pour créer une nouvelle génération de produits d'agriculture durable. Ils sont les alternatives les plus probables à certains pesticides chimiques les plus problématiques actuellement utilisés. Les biopesticides offrent des solutions aux problèmes tels que la résistance des parasites, les pesticides chimiques traditionnels, et les préoccupations du public sur les effets secondaires des pesticides sur l'environnement et, finalement, sur la santé humaine (Mishra *et al.*, 2015). Même s'ils ont souvent la réputation d'être moins efficaces que les pesticides chimiques traditionnels, les biopesticides sont l'objet d'un intérêt croissant de la part des exploitants, notamment dans le cadre de stratégies de lutte intégrée (Deravel *et al.*, 2014).

La plante produit une gamme de composés aromatiques et non aromatiques, dont certains sont reconnus comme agents antimicrobiens. Les phénols, les terpènes, les alcaloïdes, les lectines et les polypeptides sont les produits qui ont été largement utilisés dans diverses applications. Ces composés peuvent être obtenus à partir des racines, écorces, graines, bourgeons, feuilles et fruits (Singh and Singh, 2012). Les plantes aromatiques sont particulièrement riches en ces substances et elles ont été utilisées dans des aliments comme agents aromatisants. Les composés appartenant aux extraits de plantes peuvent être classés en plusieurs groupes dont principalement ceux sous forme de composés phénoliques ou d'HEs (Martínez, 2012).

2. Les lamiacées

Les lamiacées sont des arbustes, sous-arbrisseaux ou plantes herbacées en général odorants, à tiges quadrangulaires. Feuilles en général opposées sans stipules; parfois lobées, ou composées pennées, entières à dentelées. Inflorescences en cymes axillaires plus ou

moins contractées simulant souvent des verticilles (verticillastres), ou encore condensées au sommet des tiges, et simulant des épis (spicastres). Fleurs en général hermaphrodites. Le calice est souvent persistant. Il est pentamère, possède cinq dents ou lobes et peut être bilabié. La corolle normalement pentamère est souvent bilabiée ou plus rarement plus ou moins actinomorphe, longuement tubuleuse, parfois à 4-5 lobes sub-égaux ou à une seule lèvre. Lèvre inférieure trilobée, la supérieure bilobée. Les étamines sont au nombre de quatre, la cinquième nulle ou très réduite; ou, parfois, de deux; dans ce dernier cas, elles sont accompagnées de deux staminodes. Anthères à loges parfois dissociées et à connectif très différencié. Ovaire supère à 2 carpelles originellement bi-ovulés, ensuite uniovulés par la constitution d'une fausse cloison. Style bifide, en général gymnobasique. Fruits constitués par 4 akènes plus ou moins soudés par leur face interne et diversement ornés (Qezel et Santa, 1963; Basílio *et al.*, 2015).

2.1. Biogéographie des lamiacées

Les lamiacées sont distribuées sur les régions: (1) Méditerranée et Asie centrale sud-ouest; (2) Afrique au sud du Sahel et Madagascar; (3) la Chine; (4) Australie; (5) Amérique du Sud; (6) Amérique du Nord et le Mexique ; et (7) région Indo-malaisienne (Asie du Sud). Plusieurs genres riches en espèces ont de très larges distributions naturelles et se répartissent généralement en deux groupes, en fonction de leur répartition: ceux principalement d'origine tropicale, dont *Vitex* (Viticoideae), *Clerodendrum* (Ajugoideae), *Callicarpa* (Incertae sedis), *Ocimum*, *Hyptis* (Nepetoideae), et ceux qui avaient probablement une origine tempérée , mais s'étendant souvent dans les régions montagneuses tropicales, comme *Ajuga*, (Ajugoideae), *Scutellaria* (Scutellarioideae), *Stachys* (Lamioideae), *Salvia*, *Clinopodium*, *Mentha*, (Nepetoideae) (Harley *et al.*, 2004).

La région méditerranéenne et l'Asie centrale sud-ouest forment les plus grands centres de diversité de plusieurs genres, par exemple, *Teucrium* (Ajugoides), *Scutellaria* (scutellarioides) *Phlomis*, *Stachys*, *Lamium*, *Sideritis*, (Lamioideae), *Salvia*, *Satureja*, *Thymus*, *Origanum*, *Nepeta* (Nepetoideae), et beaucoup d'autres. Les genres endémiques de la région comprennent *Cedronella*, *horminum* et *Cleonia* (Nepetoideae) et *Melittis*, *Prasium*, *Moluccella*, *Isoleucas* (Lamioideae), mais de nombreux autres genres dominants ici s'étendent vers l'Est jusqu'au Nord-West de la Chine. Quelques genres s'étendent également à l'Amérique du Nord (Harley *et al.*, 2004).

2.2. Importance économique

Les lamiacées ont une très large gamme d'utilisations. De nombreuses espèces de la sous-famille Mimosoideae sont des arbres forestiers tels que les différentes espèces de

Gmelina, *Vitex* et *Tectona grandis* qui sont importants pour leur bois de valeur commerciale considérable. Traditionnellement, la famille est connue par les nombreuses plantes aromatiques qui ont été largement utilisées depuis l'antiquité, en particulier dans la région méditerranéenne et différentes parties d'Asie. Beaucoup de ces plantes appartiennent à la sous-famille des Nepetoideae, qui sont connus pour leurs HEs détenues dans les glandes spéciales, en particulier sur le feuillage. La région méditerranéenne est connue pour l'utilisation de ces feuilles depuis les premiers temps, en particulier à des fins culinaires. Ces plantes comprennent des espèces de *Salvia* (sauge), *Mentha* (menthe poivrée et menthe verte), *Thymus* (thym), *Origanum* (origan et marjolaine), *Satureja* (sarriette), *Rosmarinus* (romarin) et *Melissa* (mélisse). De nombreuses autres espèces aromatiques sont utilisées dans les parfums ou les produits de toilette, comme *Lavandula* (lavande). L'usage médicinal des lamiacées est très répandu en particulier en médecine populaire. Plusieurs espèces sont utilisées pour soigner une très large gamme de maladies. L'aromathérapie utilise des HEs de plusieurs labiées. Beaucoup d'entre elles forment aussi une riche source de nectar pour l'industrie du miel; d'autres ont des fleurs attractives et sont importantes en horticulture (Harley *et al.*, 2004).

3. Plantes étudiées

3.1. Romarin: *Rosmarinus officinalis* L.

Sa taxonomie botanique est comme suit :

Règne : *Plantae*
Division : *Magnoliophyta*
Classe : *Magnoliopsida*
Ordre : *Lamiales*
Famille : *Lamiaceae*
Genre : *Rosmarinus*
Espèce : *Rosmarinus officinalis* L.

Le nom de «Romarin» est dérivé du mot latin "*Rosmarinus*", signifiant "la rosée de la mer". *Rosmarinus officinalis* L. est un arbrisseau de la famille des Labiées; c'est une plante vivace, très ramifiée et abondamment touffue, avec une odeur aromatique caractéristique. Les feuilles sont simples, dures, linéaires avec des marges révolutées, verdâtres et plissées sur le dessus et tomenteuses dessous, 2-4 mm large. Les fleurs sont groupées en petites grappes axillaires terminales avec des bractées. Le calice est en forme de cloche et bilabiée et a une corolle pâle à bleu vif; la lèvre supérieure est entière et la lèvre inférieure est trilobée. Deux étamines proéminentes avec un simple filament portant une loge fertile; une longue style. Les akènes sont lisses. Le romarin est un chamaephyte pérenne qui pousse le plus souvent dans les garrigues et les forêts de pin, de cèdre ou de genévrier. Il se trouve

dans divers bioclimats (du subhumide à l'aride supérieur) mais il est dominant à l'étage bioclimatique méditerranéenne semi-aride (IUCN, 2005).

Le romarin est originaire des régions méditerranéennes : il s'étend du Portugal à la Turquie et de l'Est du Maroc à l'Est de la Lybie. Il est également présent dans le Proche-Orient. Il est maintenant cultivé dans le monde entier ; en Algérie, Espagne, France, Portugal, Russie, Chine, Yougoslavie, Tunisie, Maroc, l'Italie et Etats-Unis. Les principaux pays producteurs d'HE sont l'Espagne, la Tunisie, le Maroc et la France. Les parties utilisées sont les feuilles fraîches ou séchées (vert grisâtre), entières, coupées, écrasées ou broyées, et l'HE. L'HE est obtenue par distillation à la vapeur des sommités fleuries fraîches. L'huile est un liquide limpide, incolore à jaune pâle. Le rendement est de 0.5-1.2%. Deux huiles sont commercialisées ; Le romarin (Espagne) et le romarin (Tunisie et Maroc). Ils diffèrent dans la composition de l'huile (Charles, 2013).

Appelé localement *klil*, *azir*, le romarin est couramment employé en médecine populaire ; habituellement contre les troubles digestifs et hépatiques. En usage externe, on l'utilise souvent comme tonique du cuir chevelu et contre certaines affections de la peau. Il est utilisé comme arôme culinaire populaire pour la viande et les produits carnés, les aliments cuits, et les recettes méditerranéennes. L'extrait de romarin a des propriétés antioxydantes dans les produits alimentaires. Les feuilles et les sommités fleuries sont utilisées dans les préparations de viande de mouton, des plats de poisson, riz, salades, et dans le vinaigre et de l'huile. Les feuilles et les extraits secs sont utilisés pour les produits de boulangerie, les confiseries et des boissons non alcoolisées et dans les parfums et les savons (Baba Aissa, 1999; Napoli *et al*., 2010).

Le romarin est une plante carminative et stomachique. Il est utilisé pour traiter les crampes d'estomac et la flatulence, et à stimuler l'appétit et la sécrétion de sucs gastriques. Il est utile contre les maux de tête et les maux de nerfs. Il procure un soulagement des douleurs musculaires et des douleurs articulaires. Il est utilisé pour traiter la dépression, la migraine et les troubles du foie et la digestion. La pommade à base de feuilles est utile contre les névralgies, les rhumatismes, l'eczéma et les plaies mineures. Il est également utilisé comme produit de rinçage pour les cheveux et bains de bouche. Les constituants actifs comprennent l'HE jusqu'à 2.5%. Celle-ci est généralement composée des éléments essentiels suivants: 1,8-cinéole, camphre, α-pinène, camphène, β-pinène, myrcène, limonène, acétate de bornyle, bornéol, verbenone et le linalol. Les feuilles renferment aussi des acides phénoliques (acide rosmarinique), diterpènes amères (carnosol, acide carnosique, rosmanol), triterpènes (acide oléanique et ursolique), les alcools triterpéniques (α-amyrine, β-amyrine, bétuline), ainsi que

plusieurs flavonoïdes et leurs glycosides (diosmétine, lutéoline, genkwanine) (Charles, 2013; Goetz et Ghédira, 2012).

Rosmarinus officinalis L. est considéré comme l'une des sources les plus importantes pour l'extraction des composés phénoliques d'une forte activité antioxydante. Les extraits de romarin riches en composés phénoliques sont des antioxydants efficaces en raison de leurs groupes hydroxyles phénoliques, mais ils possèdent aussi beaucoup d'autres effets bénéfiques comme antimicrobiens, antiviraux, activités anticancérigènes anti-inflammatoires et sont également connu pour être un agent chimiopréventif efficace. Par conséquent, cette espèce contient des ingrédients bioactifs qui fournissent une valeur complémentaire, autre que celle nutritionnelle, à appliquer en industrie alimentaire. Cependant, les substances bioactives particulières du romarin responsables de certaines activités biologiques, comme l'activité antimicrobienne, n'ont pas été profondément caractérisées (Moreno *et al.*, 2012).

Le romarin a de nombreux composés phytochimiques qui constituent des sources potentielles de composés naturels comme les diterpènes phénoliques, les flavonoïdes, les acides phénoliques et des HEs. Environ 90% de l'activité antioxydante est principalement attribuée à une teneur élevée en composants non volatils comme l'acide carnosique et le carnosol (diterpènes phénoliques) et de l'acide rosmarinique. Il est clair que les constituants de *R. officinalis* ont une activité antioxydante selon l'usage traditionnel et les preuves scientifiques, mais peu d'informations sont disponibles sur la relation entre la composition chimique et l'activité antioxydante des HEs et extraits non-volatils (Moreno *et al.*, 2012).

3.2. Thym: *Thymus ciliatus* (Desf.) Benth.

Sa taxonomie botanique est comme suit :

Règne : *Plantae*
Division : *Magnoliophyta*
Classe : *Magnoliopsida*
Ordre : *Lamiales*
Famille : *Lamiaceae*
Genre : *Thymus*
Espèce : *Thymus ciliatus* (Desf.) Benth.

Le nom de «Thym» est dérivé du mot Grec "*Thymos*", signifiant "le courage ou la force". Appartenant à la famille des Labiées, le genre *Thymus* est représenté par de nombreuses espèces en Algérie qui ne se prêtent pas aisément à la détermination, en raison de leur variabilité et de leur tendance à s'hybrider facilement. *Thymus ciliatus* (Desf.) Benth., appelé localement *Djertil* , est un sous-arbrisseau érigé ou prostré, odorant. Inflorescences en faux verticilles. Feuilles plus ou moins contractées. Calice bilabié à 3 dents obtuses et 2 aigues et corolle tubuleuse bilabiée, à 2 et 3 lobes; 4 étamines, généralement

saillantes ; fruits en forme de tétrakènes (Baba Aissa, 1999). Les feuilles florales différentes des feuilles caulinaires en général fortement dilatées à leur portion inférieure. Epis florifères larges de 16-20mm. Fleurs plus grandes à corolle plus longuement exserte (Quezel et Santa, 1963).

Cette plante qui est une espèce endémique de l'Afrique du Nord possède des activités biologiques importantes ; antifongiques, antibactériennes, antivirales et antioxydantes. Le thym est utilisé en médecine traditionnelle pour ces effets antiseptiques, antispasmodiques, diaphorétiques, stimulants, antitussifs, sédatifs et rubéfiants (Beloued, 1998; Kholkhal *et al.*, 2013; Ferhat *et al.*, 2014; Amrouni *et al.*, 2014).

L'HE de *T. ciliatus* d'origine marocaine a été rapportée composée principalement de: thymol (0.3-29.3%), carvacrol (0.4-21.7%), α-terpinyle acétate (0-42.9%), acétate de géranyle (0-21.7%), géranyle butyrate (0-26.7%), camphre (de 0.4-28.4%) et bornéol (0.1-31.6%) (Bousmaha-Marroki *et al.*, 2007).

Le thym et l'huile de thym ont de fortes propriétés antioxydantes. Le thym, par son huile, est classé parmi les plantes culinaires et médicinales à pouvoir antioxydant le plus efficace. Son HE a montré un pouvoir antioxydant meilleur que de thymol seul, ce qui suggère que d'autres composants contribuent également à l'activité antioxydante. Le thymol, un constituant important de l'huile de thym, a été jugé ayant un potentiel antioxydant et agent anti-inflammatoire dans les cellules humaines (Charles, 2013). L'effet protecteur de l'huile a été supposé due à la présence de carvacrol et de thymol, tandis que pour l'extrait aqueux cela était dû à la présence de grandes quantités de polyphénols (Kulisić *et al.*, 2007). L'huile de thym à des doses supérieures a montré une activité antioxydante significative et un effet protecteur chez les rats induits par l'aflatoxine (El-Nekeety *et al.*, 2011). L'huile de thym a également montré une forte activité anti-radicalaire et une activité antimicrobienne (Tohidpour *et al.*, 2010; Zouari *et al.*, 2011).

Les études sur *T. ciliatus* sont rares par rapport aux autres espèces de *Thymus*.

4. Les huiles essentielles (HEs)

Les HEs appelées encore « essences » ou « essences aromatiques végétales » sont les substances odorantes, volatiles et de consistance huileuse, contenues dans les plantes (Lardry et Haberkorn, 2007). Généralement de composition complexe, l'HE est obtenue à partir d'une matière première botaniquement définie, soit par entraînement à la vapeur d'eau, soit par distillation sèche, soit par un procédé mécanique approprié sans chauffage. L'HE est le

plus souvent séparée de la phase aqueuse par un procédé physique n'entraînant pas de changement significatif de sa composition (Bourrain, 2013).

Les HEs sont définies aussi comme étant des métabolites secondaires produits par les plantes comme moyen de défense contre les ravageurs phytophages. Ces extraits contiennent en moyenne 20 à 60 composés qui sont pour la plupart des molécules peu complexes, soit des monoterpènes avec leurs phénols reliés, et des terpènes plus complexes, dont les sesquiterpènes (Chiasson et Beloin, 2007)

La plupart des végétaux renferment des HEs, mais habituellement en quantité infime. Seules les plantes dites « aromatiques » en produisent en quantité suffisante. Ces plantes appartiennent, le plus souvent, aux familles des labiées (lavande, thym, sarriette, sauge, menthe, etc.), des ombellifères (cumin, carvi, anis, fenouil, etc.), des myrtacées (eucalyptus, cajeput, niaouli, etc.), des conifères (pin, cèdre, cyprès, genévrier, etc.), des rutacées ou hespéridées (citron, orange, bergamote, etc.), et des lauracées (cannelle, camphrier, sassafras, etc.) (Lardry et Haberkorn, 2007).

Les HEs sont formées dans des cellules ou groupes de cellules spécifiques; et sont généralement trouvés dans une partie particulière ou organe, comme les feuilles, les calices de fleurs, fruits, racines, etc. Ces produits naturels sont utilisés comme matières premières dans de nombreux domaines: les parfums, les cosmétiques, l'aromathérapie et la phytothérapie, les épices et la nutrition. La composition de l'HE est dépendante des caractéristiques telles que le caractère géographique du lieu à partir duquel la plante est obtenue, les variations saisonnières et le climat, la technique de production et la pureté. L'effet de la maturité de la plante au moment de la production de l'huile et de l'existence de différences chémotypiques peut considérablement affecter la composition. L'état écologique et/ou l'état physiologique peuvent interférer avec la présence de composés biologiquement actifs dans la plante (Lahlou, 2004).

Les aspects culinaires de nombreuses plantes sont à base d'HEs, bien que d'autres utilisations l'ont été attribuées (p. ex., les pratiques médicinales). Les HEs sont des produits naturels qui combinent une activité antimicrobienne et antioxydante, offrant ainsi une protection naturelle contre les agents pathogènes microbiens et d'autres agents indésirables. Les HEs sont généralement des terpénoïdes responsables de l'arôme et la saveur associées aux herbes, aux épices et aux parfums, également appelée huiles volatiles parce qu'elles diffusent facilement dans l'air. Les principaux constituants des HEs sont les hydrocarbures (pinène, limonène et bisabolène), les lactones (bergaptène), les phénols (eugénol), les éthers phénoliques (anéthol), les alcools (linalol et santalol), les acides (acide benzoïque et l'acide géranique), les aldéhydes (citral), les aldéhydes cycliques (Cuminal), les oxydes (1,8

cinéole), les esters (acétate de géranyle) et les cétones (camphre) responsables de l'activité biologique, ainsi que pour leur parfum. Les composés phénoliques présents dans les HEs ont également été reconnus comme des composants bioactifs antimicrobiens (Tabassum and Vidyasagar, 2013; Böhme *et al.*, 2014).

4.1. Propriétés antioxydante et antimicrobienne des HEs

Les HEs ont été largement utilisées pour leurs propriétés déjà observées dans la nature, à savoir pour leurs propriétés antibactériennes, antifongiques et activités insecticides. Environ 3000 huiles essentielles sont connues, dont 300 sont commercialement important, surtout pour les industries pharmaceutiques, agronomiques, alimentaires, sanitaires, cosmétiques et parfums (Bakkali *et al.*, 2008).

Beaucoup d'HEs et leurs composants peuvent agir comme agents antioxydants protégeant le produit contre la prolifération des microorganismes pathogènes ou d'altération. Ainsi, l'application de ces agents aux produits frais et transformés améliore la teneur en antioxydants du produit et permettrait d'éviter des processus d'oxydation catalysés par des enzymes, et peut également empêcher les pertes d'antioxydants naturels (Moreira *et al.*, 2016). Récemment, les consommateurs refusent les antioxydants synthétiques en raison de leur cancérogénicité et, au cours des dernières décennies, un intérêt croissant aux antioxydants naturels, composés antioxydants en particulier d'origine végétale, est apparu. Beaucoup d'herbes, d'épices et leurs extraits ont été ajoutés à une variété d'aliments pour améliorer leurs caractéristiques sensorielles et prolonger la durée de vie. Les herbes de la famille des lamiacées, principalement l'origan (*Origanum vulgare*), le romarin (*Rosmarinus officinalis*) et la sauge (*Salvia officinalis*), ont été rapportés d'avoir une capacité antioxydante importante (Böhme *et al.*, 2014). Ainsi, de nombreuses études ont montré que les HEs sont une source abondante de composés présentant une forte activité antioxydante et que ces composés peuvent être utilisés comme antioxydants naturels dans l'industrie alimentaire (Burt, 2004; Shahsavari *et al.*, 2008; Ak and Gülçın, 2008; Nanasombat and Wimuttigosol, 2011; Nieto *et al.*, 2011; Sanchez-Gonzalez *et al.*, 2011; Santos *et al.*, 2012; Nickavar and Esbati, 2012; Aktumsek *et al.*, 2013; Boulanouar *et al.*, 2013)

Une très grande variété d'HEs est connue pour exercer des propriétés antimicrobiennes et, dans la plupart des cas, cette activité est due à la présence de constituants actifs représentés principalement par des monoterpènes, des sesquiterpènes, des alcools et autres hydrocarbures et phénols. La structure chimique des constituants des HEs conditionne leur mode précis d'action antibactérienne. Compte tenu du nombre de différents groupes de composés chimiques présents dans les HEs, il est probable que leur activité

antibactérienne ne soit pas attribuée à un mécanisme spécifique mais qu'il y ait plusieurs cibles dans la cellule (Goetz et Ghédira, 2012). Les principales localisations des sites d'action des constituants des huiles essentielles sont indiquées dans la figure1.

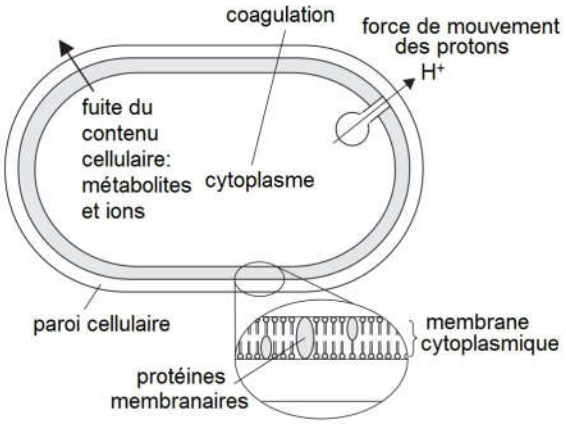


Figure 1. Principales localisations des sites d'action des constituants des HEs (Burt, 2004).

Certaines HEs contiennent principalement les terpènes non phénoliques, tandis que d'autres contiennent un pourcentage élevé de monoterpènes phénoliques, tels que le thymol et le carvacrol. L'eugénol phénylpropanoïde a été détecté souvent dans les HEs avec une forte activité contre les moisissures. Dans des cas particuliers, les monoterpènes bicycliques non phénoliques camphre et α-pinène exercent des activités antifongiques remarquables. Les HEs qui exercent une forte activité antimicrobienne contre les levures possèdent des contenus élevés en thymol, carvacrol, cymène, linalool ou α-pinène. Remarquablement, de nombreux HEs avec des effets inhibiteurs contre les levures ont été trouvés dans les genres de la famille des Lamiacées, dont *Thymus* sp., *Origanum* sp., *Rosmarinus officinalis*, *Ocimum sanctum* et *Zataria multiflora* (Böhme *et al.*, 2014).

En général, les HEs et les extraits végétaux sont des sources d'activité antifongiques contre une large gamme de champignons. Un test rapide pour déterminer l'activité antifongique des extraits et des HEs de plantes a conclu que parmi 345 extraits analysés, 13 ont montré des niveaux élevés d'activité contre *Botrytis cinerea*, qui a servi comme un champignon test; L'ail (*Allium* sp.) et le poivre (*Capsicum* sp.) semblent être les principales plantes présentant la plus forte activité antifongique persistante. En outre, parmi les 49 HEs testées, celles de palmarosa (*Cymbopogon martinii* Roxb.) et du thym rouge (*Thymus zygis L.*) ont montré l'effet inhibiteur le plus élevé sur la germination des spores *B. cinerea* à la plus faible concentration. Les meilleurs inhibiteurs qui suivaient étaient les HEs des bourgeons du clou de girofle (*Syzygium aromaticum* L.) et de feuilles de cannelle

(*Cinnamomun zeylanicum* J Presl.). Les constituants les plus fréquents dans des HEs et présentant une activité antifongique élevée étaient: D-limonène, cinéole, α-pinène, β-pinène, β-myrcène et le camphre. L'HE de *Thymus capitatus* L., a clairement réduit le développement de *B. cinerea* inoculé aux fruits de mandarine, lorsqu'elle est appliquée sous forme de vapeur. Les observations au microscope électronique de balayage ont indiqué un effet néfaste direct de l'huile de thym sur les hyphes (Böhme *et al.*, 2014). Le tableau 1 montre l'effet inhibiteur des HEs de quelques plantes sur différentes levures et moisissures.

Les principaux mécanismes et sites d'action des différents constituants des huiles essentielles sont :

- l'altération de la paroi cellulaire.
- la dégradation de la membrane cytoplasmique.
- l'altération des protéines membranaires.
- la fuite du contenu cellulaire.
- la coagulation du cytoplasme.
- l'épuisement de la force de mouvement des protons.

Une caractéristique importante des HEs et de leurs constituants est leur caractère hydrophobe, ce qui leur permet de s'insérer dans les couches lipidiques de la membrane cellulaire bactérienne et des mitochondries, perturbant les structures et les rendant plus perméables. La fuite des ions et autres constituants de la cellule peut alors se produire (Goetz et Ghédira, 2012).

Tableau 1. effet antifongique de quelques HEs.

Plante	Composé principal de l'HE	Champignon	Effet antifongique*	Référence
			• *Inhibition du mycélium 100%*	Bouchra *et al.* (2003)
Origanum compactum (origan)	Carvacrol	*Botrytis cinerea*	- 100 ppm	
Thymus glandulosu (thym)	Thymol		- 100 ppm	
			• *CMC*	Jamali *et al.* (2012)
Thymus satureioides (thym)	Carvacrol	*Candida albicans, C. krusei, C.*	- 0.89-1.78 mg/ml	
T. broussonetii	Carvacrol	*glabrata, C. parapsilosis*	- 0.45 mg/ml	
T. maroccanus	Carvacrol		- 0.46 mg/ml	
T. ciliatus	Carvacrol		- 0.43- 0.86 mg/ml	
T.pallidus	α-Terpène		- 0.90 mg/ml	
T. leptobotrys	Carvacrol		- 0.23 - 0.46 mg/ml	
T. serpyllum	Acétate de linalyle		- 3.52 - 7.05 mg/ml	
			• *Inhibition de la germination des spores à100%*	Gemeda *et al.* (2014)
Cymbopogon martini (palmrosa)	Thymol	*Aspergillus niger, A. flavus*	2 µl/ml	
Foeniculum vulgare (fenouil)	-		4 µl/ml	
Trachyspermum ammi (Ajowan)	-		1 µl/ml	
			• *Inhibition du mycélium à 100%*	Manganyi *et al.*(2015)
Thymus vulgaris (thym)	Eugenol	*Fusarium oxysporum*	500 (µl/l)	
Syzigium aromaticum (clou de girofle)	Thymol		500 (µl/l)	
			• *CMF*	Khan and Ahmad (2011).
Syzygium aromaticum (clou de girofle)	Eugenol	*A. flavus* NRRL 501, *A. fumigatus*	320 ou 640 µl/ml	
Cinnamomum verum (cannelle)	Cinnamaldehyde	MTCC 2550, *A. niger* IOA-3, *A.*	160 ou 320 µl/ml	
Cymbopogon martini (palmrosa)	Geraniol	*solani* MTCC 2101, *T. rubrum* IOA-9, *T. rubrum*	288 ou 576 µl/ml	
			• *CMI*	Hanamanthagouda *et al.*(2010)
Lavandula bipinnata (lavande)	Transcarveol	*Aspergillus niger*	≤ 2 µl/ml	
		Penicillium notatum	≤ 4 µl/ml	
		Candida albicans	≤ 4 µl/ml	
			• *Inhibition du mycélium*	Bluma and Etcheverry (2008), Passone *et al.* (2013), Passone and Etcheverry (2014)
Peumus boldus (boldo)	α-Terpinène	*Aspergillus flavus, A. parasiticus,*	- 93.9 à 100% pour ≥ 1500 µl/l	
Lippia turbinata (menthe pouliot)	Oxyde de pipériténone	*A. nomius, A. pseudotamarii*	- 16.1 à 75.8% pour 1000 µl/l	
Syzygium aromaticum (clou de girofle)	Eugénol		- 37.5 à 62.7% pour 2000 µl/l	

* CMI : Concentration minimale d'inhibition.
CMC : Concentration minimale candidacide.
CMF : Concentration minimale fongicide.

Tableau 1. effet antifongique de quelques HEs (suite).

Plante	Composé principal de l'HE	Champignon	Effet antifongique*	Référence
			• *CMI*	Şahin *et al.*(2004)
Origanum vulgare (origan)	Caryophyllène	*Candida albicans*-A117, *Alternaria alternata*,.*Aspergillus flavus, A. variecolor, Fusarium acuminatum, F. oxysporum, F. tabacinum, Moniliania fructicola, Penicillium spp., Rhizopus spp., Rhizoctonia solani, Sclorotinia sclerotiorum, S. minorn, Trichophyton mentagrophytes, T. rubrum*	31.25–125 µg/ml	
			• *CMI*	Lopez *et al.*(2004)
Origanum vulgare (origan)	Thymol	*Fusarium verticillioides*	500 µl/l	
Aloysia triphylla	Myrcène		250 µl/l	
Aloysia polystachya	Carvone		500 µl/l	
Mentha piperita	Menthol		1000 µl/l	
			• *CMI après 7 jours*	Tampieri *et al.*(2005)
Cinnamomum camphora (camphrier)	Linalool	*Candida albicans*	1000 ppm	
Cinnamomum verum (cannelier)	Eugenol		500 ppm	
Citrus limon (citronnier)	Limonène		5000 ppm	
Cymbopogon flexuosus (citronelle)	Géranial		500 ppm	
Eucalyptus globulus (eucalyptus)	1,8-cinéole		5000 ppm	
Hyssopus officinalis (hysope)	S-pinocamphone		1000 ppm	
Lavandula officinalis (lavande)	Acétate de linalyl		5000 ppm	
Melaleuca alternifolia (arbre à thé)	4-terpinéol		5000 ppm	
Mentha piperita (menthe poivrée)	Menthol		500 ppm	
Ocimum basilicum (basilic)	Estragol		1000 ppm	
Origanum vulgare (origan)	Carvacrol		500 ppm	
Rosmarinus officinalis (romarin)	1,8-cinéole		5000 ppm	
Satureja montana (Sarriette)	Carvacrol		500 ppm	
Thymus vulgaris (thym)	Carvacrol		1000 ppm	
			• *Inhibition du mycélium* (10µl/disque)	Kadoglidou *et al.* (2011)
Lavandula stoechas (Lavande)	Fenchone	*Aspergillus terreus, Fusarium oxysporum, Penicillium expansum, Verticillium dalhiae*	- 2 à 100%	
Mentha spicata (Menthe verte)	Carvone		- 10 à 100%	
Origanum vulgare (Origan)	Carvacrol		- 68 à 100%	
Salvia fruticosa (Sauge)	1,8-cinéole		- 0 à 67%	

* CMI : Concentration minimale d'inhibition.
CMC : Concentration minimale candidacide.
CMF : Concentration minimale fongicide.

5. Les champignons filamenteux

Les champignons filamenteux ou moisissures sont des eucaryotes non photosynthétiques et immobiles. Ils forment le groupe d'organismes le plus important des contaminants dans les produits alimentaires. Ce sont des saprophytes dotés d'un grand pouvoir de dégradation. Certaines espèces sont toxinogènes, d'autres sont souvent utilisées en industrie. Un nombre important de champignons sont phytopathogènes et peuvent dégrader les produits végétaux avant la récolte. L'appareil végétatif des champignons est un thalle composé de filaments (hyphes) ramifiés dont l'ensemble constitue le mycélium. Ils se reproduisent grâce à des spores. Celles-ci sont issues soit d'une reproduction sexuée (champignon téléomorphe) ou d'une multiplication asexuée (champignon anamorphe). Les différents groupes de moisissures ont été définis suivant leur mode de reproduction sexuée et les caractéristiques de leurs spores. Les Zygomycètes possèdent des spores contenues à l'extérieur d'une cellule renflée (sporange), les Ascomycètes ont des spores regroupées dans des sortes de sacs (asques) et les Basidiomycètes qui ont des spores portées par des basides (Prescott *et al.*, 2003).

5.1. Les champignons agents de détérioration

Les moisissures sont capables de croître sur tous les types d'aliments: céréales, viande, lait, fruits, légumes, noix et graisses (Tableau 2). Leur croissance peut entraîner plusieurs types d'altération alimentaire: flaveurs anormales, toxines, décoloration, pourriture et formation de propagules pathogènes ou allergènes. La détérioration des propriétés sensorielles d'un aliment est souvent due à la production d'exoenzymes pendant la croissance fongique. Les moisissures peuvent produire un grand nombre d'enzymes: des lipases, des protéases, des carbohydrases. Une fois sont à l'intérieur de l'aliment, ces enzymes peuvent poursuivre leurs activités indépendamment de la destruction ou l'enlèvement du mycélium. Les activités enzymatiques peuvent entraîner des saveurs et odeurs de pourriture. Cela est dû à la transformation de 2,4,6-trichlorophénol fongique à trichloroanisole (TCA) par *Penicillium brevicompactum***,** *P. crustosum, Aspergillus flavus* et d'autres espèces. Ces réactions enzymatiques peuvent également provoquer la désintégration complète de la structure des aliments. Les moisissures peuvent produire des composants volatils tels que le disulfure de diméthyle, la géosmine et le 2-méthylisobornéol qui peuvent affecter la qualité des aliments et des boissons, même lorsqu'ils sont présents en très petites quantités. Ces composés sont produits en grandes quantités dans les combinaisons spécifiques des espèces de différents genres, tels que *Penicillium*, *Aspergillus* et *Fusarium* (Filtenborg *et al.*, 1996).

Tableau 2. Différentes catégories de produits alimentaires et les espèces fongiques les plus couramment associés (Dijksterhuis *et al.*, 2013).

Produit agricole	Produit	Espèces fongiques
Haricots et pois	Haricots noirs, Cornille	*Alternaria alternata*, *Aspergillus flavus*, *Asp. ochraceus*, *Asp. parasiticus*, *Fusarium proliferatum*, *Penicillium citrinum*
Céréales	Maïs	*Asp. flavus*, *Asp. niger*, *Asp. ochraceus*, *F. graminearum*, *F. proliferatum*, *F. verticillioides*, *P. citrinum*
	Riz	*Asp. flavus*, *Asp. niger*, *P. citrinum*
	pain de seigle	*Eurotium repens*, *Eur. rubrum*, *P. carneum*, *P. paneum*, *P. roqueforti*
	Sorgho	*Alt. alternata*, *Asp. flavus*, *F. verticillioides*, *F. semitectum*, *P. citrinum*
	Pain de blé	*Asp. flavus*, *Eur. repens*, *Eur. rubrum*
	blé, seigle, orge, avoine	*Alt. tenuissima* and *infectoria*, *Asp. flavus*, *Asp. parasiticus*, *F. avenaceum*, *F. culmorum*, *F. graminearum*, *P. aurantiogriseum*, *P. cyclopium*, *P. freii*, *P. melanoconidium*, *P. polonicum*, *P. verrucosum*
fromage	fromage à pâte dure	*Asp. versicolor*, *P. commune*, *P. discolor*, *P. nalgiovense*, *P. solitum*
Café	Café-mousson	*Asp. candidus*, *Asp. niger*, *Asp. tamarii*
	Café-traditionnelle	*Asp. carbonarius*, *Asp. steynii*, *Asp. westerdijkiae*, *P. citrinum*
Fruits	Citron	*Alt. tangelonis*, *Alt. tenuissima*, *Alt. turkisafria*, *P. digitatum*, *P. italicum*
	Fruits secs	*Asp. carbonarius*, *Asp. flavus*, *Asp. niger*, *Asp. ochraceus*, *Xeromyces bisporus*, *Wallemia sebi*
	Jus de fruit	*Byssochlamys nivea*, *B. spectabilis* (=*Paecilomyces variotii*), *Eupenicillium* spp., *Neosartorya* spp., *Talaromyces* spp.
	Raisins	*Asp. carbonarius*, *Asp. niger*, *Asp. tubingensis*, *P. expansum*
	Pépins noyaux	*Alt. arborescens*., *Alt. tenuissima*, *F. lateritium*, *P. crustosum*, *P. expansum*, *P. solitum*
Viande	Saucisses	*P. nalgiovense*, *P. nordicum*, *P.olsonii*, *P. chrysogenum*, *Eurotium* spp.
Noix	Amandes, noisettes	*Alt. arborescens*, *Asp. flavus*, *Asp. niger*, *Asp. tamarii*,
	pistaches, noix	*F. acuminatum*, *F. avenaceum*, *F. semitectum*, *P. crustosum*, *P. discolor*
Oléagineux	Olives	*Alt. alternata*, *Asp. versicolor*, *P. citrinum*, *P. expansum*
	Arachides	*Asp. flavus*, *Asp. niger*
	Tournesol	*Alt. alternata*, *Asp. flavus*, *Asp. niger*, *Asp. parasiticus*, *F.verticilloides*, *F. semitectum*
Légumes	Gingembre	*P. brevicompactum*
	Oignon et ail	*P. allii*, *P. glabrum*, *Petromyces alliaceus*
	Poivron	*Alt. alternata*
	Poivre noir	*Asp. flavus*, *Asp. parasiticus*, *Asp. tamarii*
	Pommes de terre	*Alt. alternata*, *Alt. solani*, *F. coeruleum*, *F. sambucinum*
	Tomates	*Alt. alternata*, *Alt. subtropica*, *Alt. tenuissima*, *P. expansum*, *P. olsonii*, *P. tularense*, *Stemphylium eturmiunum*, *Stemphylium solani*
	Igname	*Botryosphaeria rhodina*, *F. verticillioides*, *P. sclerotigenum*
	chips d'igname	*Asp. flavus*, *Asp. niger*

L'aspect le plus important de la détérioration fongique des aliments est la formation de mycotoxines. Plus de 400 mycotoxines sont connues aujourd'hui, les aflatoxines sont les plus connues, et le nombre augmente rapidement. Les mycotoxines sont des métabolites secondaires qui sont toxiques pour les animaux vertébrés, en petites quantités lorsqu'ils sont introduits par voie naturelle. La toxicité de ces métabolites est très différente, avec une toxicose qualifiée de chronique étant la plus importante pour les humains. Cependant, seulement quelques mycotoxines sont bien décrites en termes toxicologiques. Les effets toxiques les plus importants sont les différents types de cancers et de suppression immunitaire. Plusieurs mycotoxines ont une activité antibiotique très importante aussi, ce qui peut donner avec le temps des bactéries résistantes aux antibiotiques, tels que les pénicillines. En outre, il est important de noter que certaines de ces mycotoxines agissent de manière synergique (Filtenborg *et al.*, 1996).

Il faut savoir que, le plus souvent, les végétaux sont contaminés par les moisissures lors de la culture, et que la croissance du champignon et la production des toxines se poursuivent après récolte. La plupart des moisissures toxiques poussent sur l'aliment, diffusent dans la masse de l'aliment, élaborent des toxines et provoquent des intoxications aiguës après ingestion chez les animaux. Les mycotoxines sont formées pendant la croissance de moisissures sur les aliments. Certaines sont présentes seulement dans la moisissure, alors que la plupart d'entre elles sont excrétées dans les aliments. Les denrées alimentaires destinées à la consommation humaine pouvant être contaminées sont les matières premières comme les fruits et les fruits secs, les céréales, mais également les produits transformés comme le pain, la farine, les pâtes ou les jus de fruits ainsi que les viandes. Une même denrée peut être sujette à de multiples contaminations, ce qui pose le problème de synergie. Chez l'homme, certaines de ces mycotoxines (aflatoxines, stérigmatocystine, ochratoxine A, fumonisines, fusarine) ont un effet insidieux dans la mesure où elles sont cancérogènes après exposition à long terme à faible dose via l'alimentation ou par inhalation de poussières en milieu professionnel. Comme la plupart des mycotoxines sont très résistantes aux traitements physiques et chimiques, une règle de base existe une fois que les mycotoxines sont dans l'aliment, elles y restent pendant le traitement et le stockage. Cela signifie également que l'utilisation de tout matériel moisi dans la transformation des aliments peut transférer les mycotoxines au produit final (Pfohl-Leszkowicz, 2009).

Étant des métabolites secondaires les mycotoxines particulières sont produites par un nombre limité d'espèces. L'aflatoxine est produite uniquement par *Aspergillus flavus*, *A. parasiticus* et *A. nomius* étroitement liés, tandis que d'autres mycotoxines telles que

l'ochratoxine A sont produites par quelques espèces de genres différents: *Petromyces alliaceus*, *Aspergillus ochraceus* et *Penicillium verrucosum*. D'autre part, les espèces toxiques particulières sont capables de produire un nombre considérable de mycotoxines. *P. griseofulvum* par exemple produit régulièrement la patuline, la griséofulvine, l'acide cyclopiazonique et roquefortine C. Toutefois, le profil et la quantité de mycotoxines qu'une moisissure produit dans l'aliment dépend complètement des paramètres écologiques et de traitement de la denrée alimentaire particulière (Filtenborg *et al.*, 1996).

En plus de provoquer des pertes économiques dues à la détérioration des aliments, principalement trois familles de moisissures ont une répercussion sur la santé humaine : *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*. Les champignons toxinogènes sont classés en quatre groupes suivant le moment auquel ils se développent : pathogène pour la plante (ex. *F. graminaerum* élaborant la zéaralénone); champignons poussant et produisant la mycotoxine sur les plantes sénescentes ou stressées (ex. *F. moniliforme* produisant la fumonisine et *A. flavus* produisant les aflatoxines); champignons colonisant à l'origine la plante et prédisposant celle-ci à la contamination par la mycotoxine lors de la récolte (ex. *F. roseum* produisant des trichothécènes); champignons existant dans le sol et dans le matériel de putréfaction et qui prolifèreront lors du stockage (ex. *A. ochraceus* et *P. viridicatum* élaborant tous deux l'ochratoxine A) (Pfohl-Leszkowicz, 2009).

5.2. Champignons étudiés

5.2.1. *Alternaria*

Les différentes espèces d'*Alternaria* causent la pourriture sur la plupart, sinon la totalité, des fruits et légumes frais, soit avant ou après la récolte. Les symptômes apparaissent en forme de taches en brun ou noir, plates ou creuses avec des marges définies, ou, de vastes zones diffuses, décomposées qui sont peu profondes ou s'étendant plus profondément dans la chair du fruit ou du légume. Le champignon se développe bien à une large gamme de températures, même dans le réfrigérateur, mais à un rythme plus lent. Le champignon peut se propager dans les tissus et la pourriture interne avec peu ou pas de mycélium apparaissant à la surface, mais le plus souvent un tapis de mycélium, blanc au début, plus tard brun à noir, se forme sur la surface de la zone pourrie (Agrios, 2005).

Alternaria produit de grandes conidies brunes avec des cloisons à la fois longitudinales et transversales, portées sur des conidiophores discrets, et avec un rétrécissement conique distinct ou «bec» à l'extrémité apicale. Ces conidies sont souvent formées en chaînes (Figure 2A). Les conidies d'*Alternaria* nouvellement produites croissent latéralement à partir du conidiophore à proximité du sommet ou à travers la zone du bec (Pitt and Hocking, 2009).

5.2.2. *Aspergillus*

L'*Aspergillus* et son téléomorphe *Eurotium* sont l'exemple type de champignons nuisibles. Seulement quelques types d'aliments, denrées et matières premières à partir desquels les *Aspergillus* ne sont pas régulièrement isolés. Les Aspergillus sont parfois pathogènes pour l'homme, les animaux et les végétaux, et susceptibles de produire des métabolites toxiques. Le genre comprend près de 180 espèces réparties en 18 groupes essentiellement définis d'après les caractères de l'appareil reproducteur (Botton *et al.*, 1990).

Le thalle est à mycélium cloisonné portant de nombreux conidiophores dressés, non ramifiés, terminés en vésicule (Figure 2B). Phialides formées directement sur la vésicule (têtes conidiennes unisériées) ou portées sur des métules ou stérigmates (têtes conidiennes bisériées). Conidies sèches, en chaînes divergentes ou associées on colonnes compactes, unicellulaires, globuleuses, sub-globuleuses ou elliptiques, lisses ou ornementées, hialines ou pigmentées en jaune, brun, noir ou vert. Cellules à paroi épaisse (Hülle cells) et sclérotes parfois présents (Botton *et al.*, 1990).

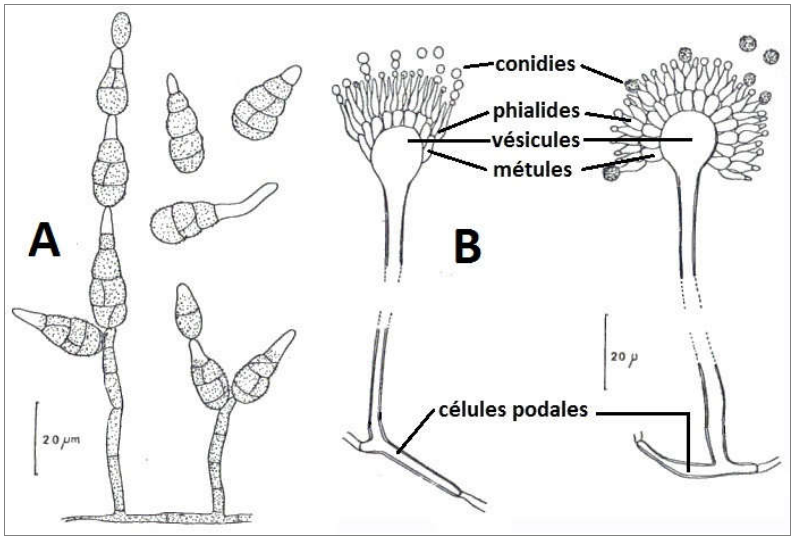


Figure 2. *Alternaria* sp (**A**) et *Aspergillus* sp (**B**) (Botton *et al.*, 1990).

5.2.3. *Botrytis*

Le *Botrytis* provoque les pourritures grises des fruits et légumes, dans le champ et au cours du stockage. Presque tous les fruits frais, les légumes et les bulbes sont attaqués par le *Botrytis* durant le stockage. Certains produits, comme la fraise, la laitue, l'oignon, le raisin et les pommes, sont également attaqués dans le champ. La décomposition peut commencer de la fleur ou de l'extrémité de la tige du fruit ou de toute blessure. L'altération apparaît comme une zone bien définie détrempée, puis brunâtre, qui pénètre profondément et avance

rapidement dans le tissu. Dans la plupart des hôtes et dans les conditions humides une couche grisâtre, granulaire, du champignon se développe sur la surface des zones en décomposition. Les moisissures grises sont les plus graves dans les environnements frais et humides et continuent à se développer, bien que lentement, même à 0°C (Agrios, 2005).

Thalle à croissance très rapide, d'abord blanc puis gris à brun-noir. Conidiophores grands, dressés, bruns à reflets métalliques, très ramifiés vers le haut où ils produisent sur des renflements de nombreuses conidies. Celles-ci solitaires, sèches, unicellulaires, hyalines à brun pâle, nées sur de cours denticules. Sclérotes souvent présents (Figure 3) (Botton *et al.*, 1990).

5.2.4. *Cladosporium*

Le *Cladosporium* est un genre très couramment isolé et est souvent dominant dans les études de la microflore de l'air. L'espèce se reproduit à la fois comme des saprophytes et comme agents pathogènes des plantes. Les conidies de *Cladosporium* sont particulièrement bien adaptées à la dispersion aérienne, étant petites, sèches, très pigmentées et apparemment très résistantes à la lumière du soleil. Le genre est très diversifié et comprend de nombreuses espèces non encore caractérisées. Les espèces de *Cladosporium* peuvent se présentées comme des agents pathogènes sur les fruits et légumes frais et peuvent entraîner l'altération de fraises ou de tomates. Sur d'autres aliments, elles surviennent habituellement comme contaminants plutôt que comme des champignons d'altération. Cependant, toutes les espèces communes poussent à des températures aux environs de 0°C, et ont été signalés, de temps en temps, à provoquer la détérioration de viandes réfrigérées, du fromage et d'autres produits réfrigérés (Pitt and Hocking, 2009).

Thalle brun olivacé à brun noir, pigmenté dans toutes ses parties, velouté ou floconneux, terne. Conidiophores ramifiés, droits ou flexueux. Conidies en chaînes acropétales, les inférieures plus grandes, souvent septées et avec plusieurs sites conidiogènes, les autres unicellulaires, globuleuses, ovoïdes, elliptiques ou fusiformes, lisses, verruqueuses ou échinulées, avec des cicatrices d'insertion souvent bien visibles. La fragilité des structures sporifères, la présence dans les préparations de fragments de conidiophores allongés et de conidies de formes et de dimensions variées, sont souvent caractéristiques du champignon *Cladosporium* (Figure 4) (Botton *et al.*, 1990).

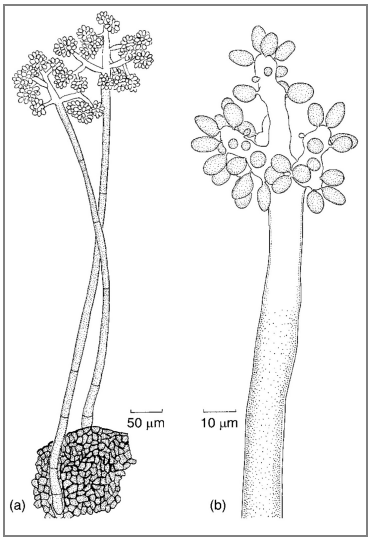


Figure 3. *Botrytis cinerea* ; Conidiophores se développant d'un sclerotium (**a**), blastoconidies à l'apex du conidiophore (**b**), (Webster and Weber, 2007).

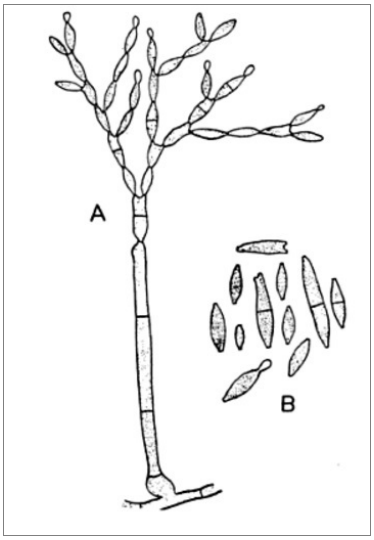


Figure 4. *Cladosporium* sp. ; Conidiophores (**A**), conidies (**B**), (Messiaen *et al.*, 1991).

5.2.5. *Fusarium*

Le *Fusarium* provoque les pourritures post-récolte rose et jaune sur les légumes et les plantes ornementales et notamment sur les cultures racines, les tubercules et les bulbes. Cultures basses telles que les cucurbitacées et les tomates sont également touchés fréquemment. La contamination par le *Fusarium* a lieu généralement dans le champ avant ou pendant la récolte, mais l'infection peut se développer dans le champ ou durant le stockage. Les pertes sont particulièrement lourdes avec les cultures telles que les pommes de terre qui sont stockées pendant de longues périodes. Les tissus touchés paraissent humides et bruns clairs au début, mais plus tard, ils deviennent bruns foncés et légèrement secs. L'élargissement des zones de décomposition profondes s'accompagne par l'apparition de petites touffes fongiques blanchâtres, roses ou jaunes (Agrios, 2005).

Le genre *Fusarium* est caractérisé par la production de conidies cloisonnées, fusiformes ou en forme de croissant, appelé macroconidies avec une cellule basale pédicellée (Figure 5A). Celles-ci peuvent être produites dans pustules discrètes, appelé sporodochies. De nombreuses espèces de *Fusarium* produisent aussi des conidies plus petites composées d'une à deux cellules, microconidies, de formes diverses. Certaines espèces produisent des chlamydoconidies terminales ou intercalaires. Les colonies de *Fusarium* sont généralement à croissance rapide et se composent de mycélium aérien blanc à crème, rose, rouge, violet ou brun (Pitt and Hocking, 2009).

Le genre comprend plus de 40 espèces souvent largement répandues dans le sol, certaines sont phytopathogènes, d'autres sont des parasites de l'homme et des animaux. Les *Fusarium* peuvent produire de dangereuses toxines (Botton *et al.*, 1990).

5.2.6. *Moniliella*

Moniliella est un genre de champignons du type levuriforme, caractérisé par la production de cellules bourgeonnantes, arthrospores à paroi mince et, dans une espèce, par des chlamydospores relativement grandes (Figure 5B). Le genre comprend plusieurs espèces dont *M. Suaveolens* et *M. acetoabutans*. *M. suaveolens* se trouve dans le beurre et la margarine, et d'autres substrats riches en huile, tandis que *M. acetoabutans* est intéressant en raison de sa résistance à l'acide acétique et sa capacité potentielle donc détériorer la mayonnaise et autres produits conservés avec de l'acide acétique (Pitt and Hocking, 2009).

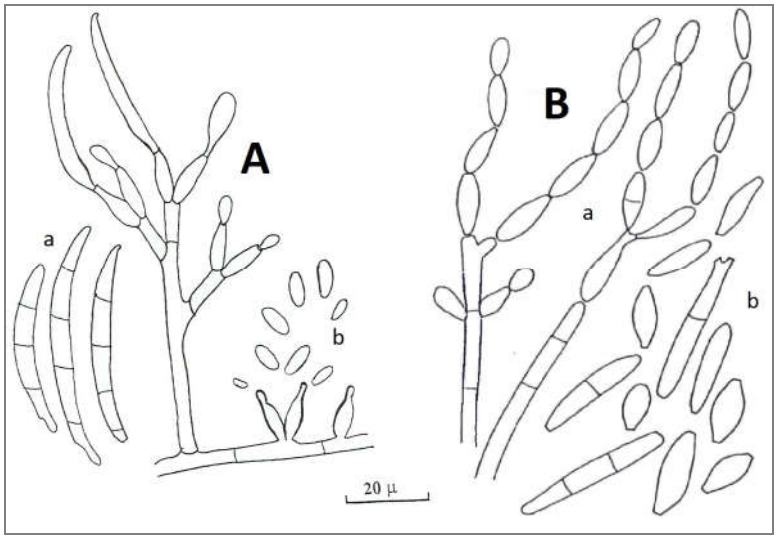


Figure 5. (**A**) *Fusarium* sp.: macroconidies (**a**), microconidies (**b**) ; et (**B**) *Moniliella suaveolens*: chaînes conidiennes (**a**), conidies (**b**) (Botton *et al.*, 1990).

5.2.7. *Penicillium*

Les différentes espèces de *Penicillium* provoquent les pourritures bleues et vertes, aussi connu comme la pourriture de *Penicillium*. Elles sont les plus fréquentes les plus destructives de toutes les maladies post-récolte, affectant la plupart des fruits et légumes. Sur certains fruits, tels que les agrumes, certaines infections peuvent avoir lieu dans le champ, mais les moisissures bleues ou vertes sont essentiellement des maladies post-récolte et souvent représentent jusqu'à 90% de détérioration pendant le transport, au stockage, et dans le marché. *Penicillium* pénètre les tissus par les blessures. Cependant, il peut se propager à partir de fruits infectés en contact avec celles saines à travers la peau indemne.

La pourriture causée par le *Penicillium* apparaît d'abord comme des taches liquides, molles, légèrement décolorées de taille variable et sur toute partie du fruit. Les tâches peu profondes au début deviennent rapidement plus profondes. A température ambiante, la majeure partie ou la totalité du fruit se désintègre en quelques jours. Bientôt une moisissure blanche commence à se développer à la surface du fruit, à proximité du centre de la tâche, et

commence à produire les spores. La zone de sporulation prend une couleur bleu, bleu-vert ou vert-olive et est généralement entourée de mycélium blanc et une bande de tissu mouillé. Le fruit détérioré présente une odeur de moisi. Dans des conditions sèches, il peut rétrécir et devenir momifié. Dans des conditions humides, les champignons et les levures secondaires entrent aussi le fruit, qui est ensuite réduit en une masse humide molle. Diverses espèces de *Penicillium* sont cultivées au niveau industriel pour la fabrication de fromage, la production de métabolites. D'autres espèces peuvent produire de dangereuses mycotoxines, telles que la patuline, dans les produits touchés, qui contaminent les jus et les sauces fabriqués à partir de fruits sains et partiellement pourris (Agrios, 2005).

Thalle vert ou rarement blanc. Conidiophores isolés, groupés en faisceaux lâches ou agrégés en corémies, hyalins, lisses ou granuleux, simples ou ramifiés, terminés par un pénicille (Figure 6). Ceci est composé soit d'un simple verticille de phialides (monoverticillé), soit d'un verticille de ramifications (métules) portant les phialides (biverticillé), soit plusieurs verticilles successifs comportant des ramifications, des métules et des phialides (triverticillé…).phialides ampulliformes ou lancéolées. Conidies disposées en longues chaînes, globuleuses, elliptiques, cylindriques ou fusiformes, lisse ou rugueuses, hyalines, grisâtres ou verdâtres. Sclérotes parfois presents (Botton *et al.*, 1990).

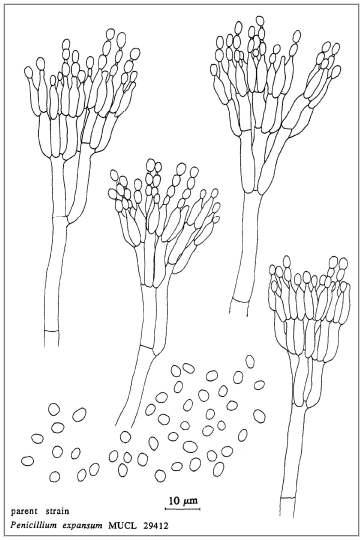


Figure 6. *Penicillium expansum* : têtes conidiennes et conidies, (Samson and Pitt, 1990).

5.2.8. *Ulocladium*

La répartition des espèces d'*Ulocladium* est cosmopolite dans les régions froides, tempérées et tropicales du monde. Il y a plus de 20 noms publiés des espèces qui représentent les taxons reconnaissables de l'*Ulocladium*. Certaines espèces d'*Ulocladium* se

trouvent dans le sol comme des saprophytes, en jouant un rôle écologique important dans la décomposition et le recyclage des matériaux dans les écosystèmes naturels, ou sur les bâtiments et les matériaux de construction comme des champignons cellulolytiques qui poussent sur du bois humide et le papier après les dommages causés par l'eau. Certains sont pathogènes des plantes causant une gamme de maladies sur les cultures agricoles importantes et les arbres fruitiers (Runa *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2009).

L'*Ulocladium*, en commun avec *Alternaria* et *Stemphylium*, produit des conidies avec des cloisons longitudinales et transversales à la fois. Celles de l'*Ulocladium* sont plus étroites à la base qu'au sommet, et peut être pointé à une extrémité, pour donner une forme piriforme, tandis que celles de *Stemphylium* ont des extrémités arrondies et sont généralement symétriques longitudinalement. Les Conidies de l'*Alternaria* sont certainement en forme de massue. Les analyses moléculaires ont indiqué que l'*Ulocladium* ne peut pas être séparé de l'*Alternaria* (Pitt and Hocking, 2009)

Les colonies présentent une texture laineuse, duveteuse à poudreuse. La couleur est brun olive à noire et le recto est noir. Des hyphes septés, bruns, naissent de courts conidiophores septés, non ramifiés, fortement géniculés (Figure 7). Les conidies (ou porospores) sont brunes, ovoïdes, à paroi lisse ou rugueuse. Produites isolément (rarement en chaînes), elles mesurent 13 à 30 µm de long sur 6 à 19µm de large et sont cloisonnées à la fois longitudinalement et transversalement (dictyospores). Elles sont plus larges à la partie distale qu'à la partie proximale où se trouve la cicatrice de libération (Campbell *et al.*, 2013).

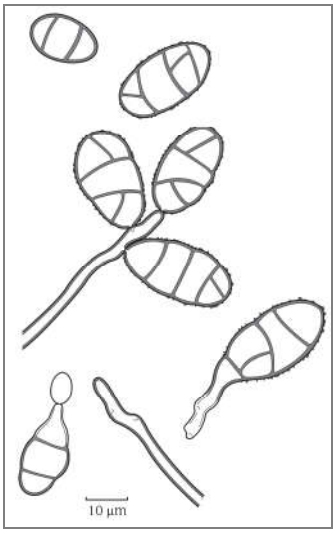


Figure 7. *Ulocladium chartarum* : conidiophores et conidies, (Campbell *et al.*, 2013).

CHAPITRE II
MATERIEL ET METHODES

MATERIELS ET METHODES

1. Présentation de la région d'étude

La Wilaya de M'sila est située entre 35°18' et 35°32' Nord et 4°15' et 5°06' Est, à 248 Km au sud-est d'Alger. S'étendant sur une superficie de 18.175 km^2, elle occupe une position privilégiée dans la partie centrale de l'Algérie du nord dans son ensemble. Elle est limitée au Nord-Est par les Wilayas de Bordj Bou-Arreridj et Sétif, au Nord-Ouest par Médea et Bouira, à l'Est Batna, à l'Ouest par Djelfa et au Sud Est par Biskra (Figure 8) (Annuaire statistique, 2014).

Entre l'Atlas Tellien et l'Atlas Saharien, M'sila est caractérisée d'une zone de montagnes de part et d'autre du Chott El Hodna , une zone centrale constituée essentiellement de plaines et de hautes plaines , une zone de chotts et de dépression avec le Chott El Hodna au Centre-Est et le Zahrez Chergui au Centre-Ouest et une zone de dunes de sable éolien (Annuaire statistique, 2014).

Le climat de la wilaya est du type continental soumis en partie aux influences sahariennes. L'été y est sec et très chaud, alors que l'hiver y est très froid. Sur le plan pluviométrique, la zone la plus arrosée est située au nord, elle reçoit plus de 480 mm/an (Djebel Ech Chouk - Chott de Ouenougha), quant au reste du territoire, la zone la plus sèche est située à l'extrême sud de la wilaya et reçoit moins de 200 mm/an. Les précipitations moyennes annuelles de la wilaya en 2013 sont de 13.3 mm/an. Les températures moyennes mensuelles de l'année sont de 20°C, enregistrées au mois plus chaud (Juillet) sont de 33.9°C et le mois plus froid (Fevrier) sont de 6.6°C (Annuaire statistique, 2014)

La population totale de la wilaya est estimée au 31/12/2014 à 1.200.669 habitants, contre 983.513 habitants en 31/12/2008, soit une augmentation absolue d'environ 217.156 habitants. La région est caractérisée par une diversité écologique représentée par deux principaux écosystèmes: steppique et forestier. De la vocation essentiellement agro-pastorale, l'activité principale de la population des zones rurales est l'élevage de moutons et de caprins. Les zones agricoles représentent 20% de la superficie totale consacrée principalement aux céréales. L'arboriculture est marquée par la prédominance de l'abricotier suivie par l'olivier (Feliachi *et al.*, 2003, Bahlouli *et al*., 2008, Tad-consult, 2008).

On distingue une végétation halophyte au voisinage d'une étendue d'eau salée momentanée (chott), représentée principalement par les espèces *Atriplex halimus*, *Salsola tetrandra*, *Salsola vermiculata*, *Salicornia fruticosa*, *Suaeda fruticosa* et *Anabasis oropediorum* et plus à l'intérieur, sur la steppe sableuse, une végétation formée

essentiellement de *Stipa tenacissima*, *Artemisia herba alba* et *Lygeum spartum* (Le Houerou, 1977).

L'usage des plantes médicinales dans la médecine populaire est caractéristique de la région d'étude vu le nombre important des boutiques herbiers répartis abondamment sur tout le territoire de la Wilaya de M'sila.

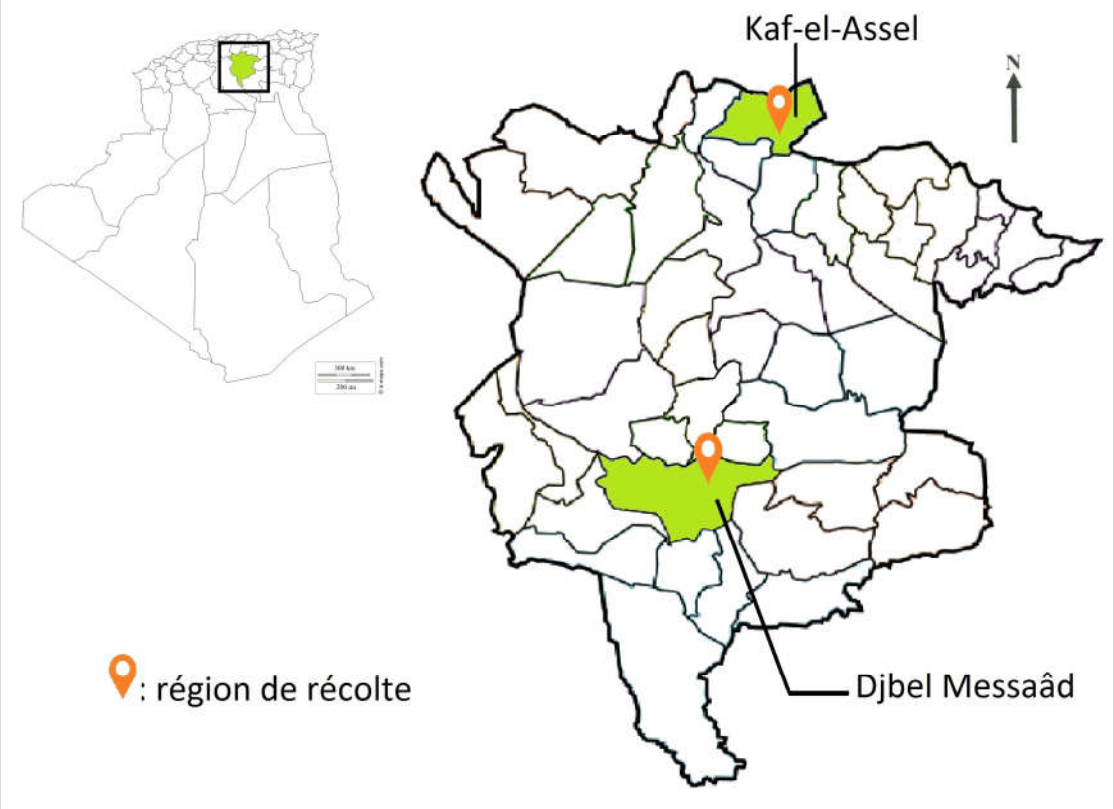


Figure 8. Localisation de la Wilaya de M'sila et les régions de collecte des plantes étudiées.

2. Enquête ethnobotanique

Pour avoir l'information ethnobotanique pertinente sur les plantes médicinales utilisées par la population, la méthode d'étude adoptée (Figure 9) a visé trois types de personnes ; tradipraticiens, herboristes et connaisseurs. Une fiche questionnaire modifiée (Mehdiou et Kahouadji, 2007) (Figure 10) est préparée. Elle comprend 03 sections : une partie reliée au nom de la plante, ses parties utilisées et ses utilisations médicinales, une partie concerne l'âge, le sexe et le niveau d'éducation de l'informateur et une partie contenant le code et/ou spécimen collecté. Les fiches questionnaires ont été remplies au cours des entretiens individuels dirigés par des enquêteurs appartenant à la population et le travail s'est déroulé durant la période 2010 - 2012. En parallèle, des sorties sur le terrain ont été effectuées avec l'aide des gardes forestiers de la région pour la récolte de plantes médicinales disponibles dans la région.

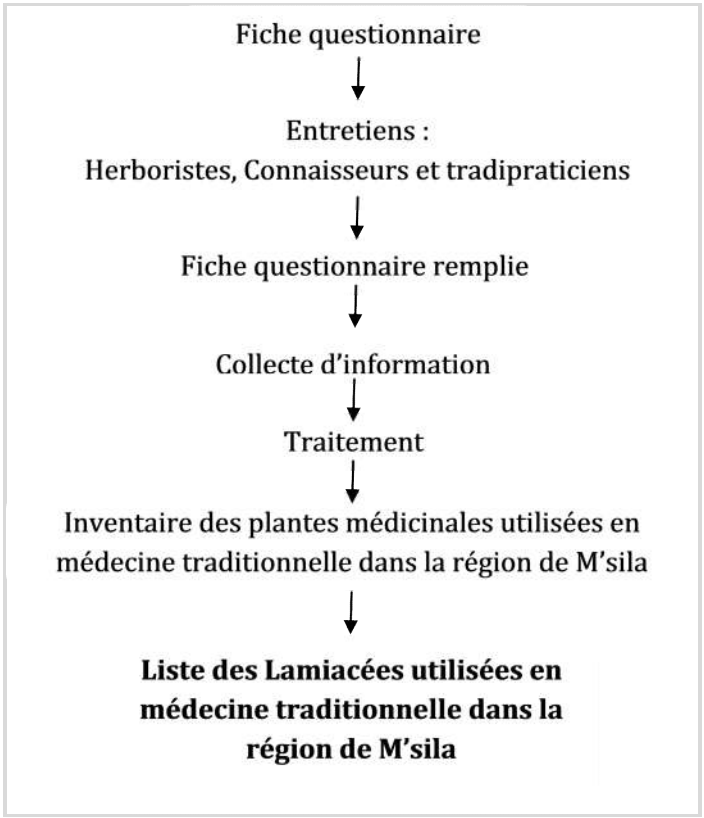


Figure 9. Démarche méthodologique de l'enquête ethnobotanique.

L'identification taxonomique des espèces a été réalisée ultérieurement à l'aide des flores Quézel et Santa (1963), Ozenda (1983), Maire (1952–1987) et d'autres guides d'identification ainsi que par l'intervention des botanistes du Département des Sciences de la Nature et de la Vie, Faculté des Sciences, Université de M'Sila.

Université de M'Sila **Date :** .....
Facultés des Sciences **N° :**.....

Fiche ethnobotanique
Usage des plantes en médecine traditionnelle
Région de M'Sila -Algérie -

Questionnaire:

1- Vous êtes : Herboriste (vendeur) ☐ Tradipraticien ☐ Connaisseur ☐
2- Age : A1<20☐ A2[20-30] ☐ A3[30-40] ☐ A4☐ [40-50] A5☐ [50-60] A6 >60 ☐
3- Genre: Masculin ☐ Féminin ☐
4- Niveau d'étude: Analphabète ☐ Primaire ☐ Secondaire ☐ Universitaire ☐
5- Résidence: M'sila ☐ si Hors M'sila ☐ où ? Village :…… …… Douar : ……..……..
6- Origine de la plante :
   - locale (wilaya de M'sila)☐
   - hors wilaya de M'sila☐
   - importée ☐
7- Qui apporte la plante :
   - moi-même ☐
   - si autre personne ☐ : Age : A1☐ A2☐ A3 ☐ A4☐ A5☐ A6☐ ;
     Niveau d'étude: Analphabète ☐ Primaire ☐ Secondaire ☐ Universitaire ☐
8- quelle est la région source de la plupart des plantes apportées (dans la W de M'sila): …….
9- La plante apportée : sèche ☐ humide ☐
   - Mode de séchage : ombre ☐ soleil ☐
   - Conditionnement : plastique ☐ papier ☐ exposée à l'air ☐
   - Autre ……..
10- Citer les plantes selon le tableau :

Espèces médicinales	Maladie	Mode de Préparation	Partie utilisée	période de collecte	Plantes utilisées avec la dite plante

Spécimen de la plante utilisée

Figure 10. Fiche questionnaire de Mehdiou et Kahouadji (2007) modifiée.

3. Plantes testées

Nous avons sélectionné 02 plantes pour l'étude phytochimique et les activités biologiques : *Rosmarinus officinalis* et *Thymus ciliatus*. Ces plantes sont disponibles, poussent spontanément dans la région d'étude et occupent de bonnes positions dans la médecine populaire de la population locale.

3.1. Origine

Rosmarinus officinalis L. (figure 11), poussant à l'état spontané, a été récolté durant Mars 2011 dans la région montagneuse de Kaf-el-Assel à Hammam-Dalâa au Nord de la Wilaya de M'sila (Figure 8).

Thymus ciliatus (Desf.) Benth. (figure 12), poussant à l'état spontané, a été récolté durant la même période dans la région montagneuse de Djbel Messaâd au Sud de la Wilaya de M'sila (Figure 8).

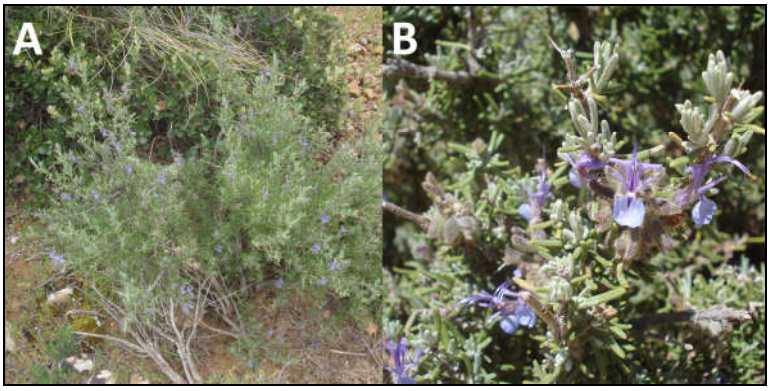


Figure 11. Photo d'un arbrisseau (**A**) et des feuilles et fleurs (**B**) de *R. officinalis* poussant spontanément à Kaf-el-Assel (M'sila).

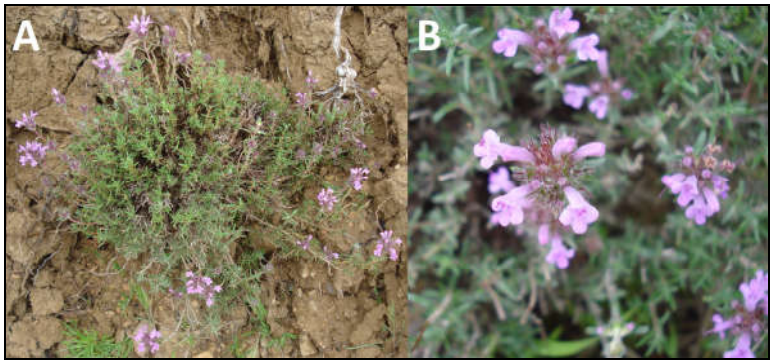


Figure 12. Photo d'un sous- arbrisseau (**A**) et des feuilles et fleurs (**B**) de *T. ciliatus* poussant spontanément à Djbel Messaâd (M'sila).

La matière fraîche (parties aériennes) a été séchée à l'ombre à la température ambiante pendant 10 jours et les feuilles et les fleurs ont été enlevées puis stockées dans des sacs en papier propre jusqu'à utilisation.

3.2. Extraction de l'huile essentielle (HE)

L'extraction de l'HE a été effectuée par hydrodistillation dans un appareil de type Clevenger: un poids de 100g de matériel végétal est mis à ébullition dans 1L d'eau distillée pendant 3h. Après sa récupération, l'HE est déshydratée par le sulfate de sodium anhydre (Na_2SO_4) puis stockée dans des flacons propres en verre ambré à 4°C dans l'obscurité (Zaouali *et al*., 2010). Le rendement (R_{HE}, v/w) est exprimé en pourcentage par rapport au poids sec de la plante.

3.3. Extraction par soxhlet

Une quantité de 45g de plante broyée (poudre) a été soumise à l'extraction par soxhlet en utilisant 450ml de méthanol comme solvant à une température de 40°C pendant 8 heures. L'extrait méthanolique (EM) est récupéré, filtré par papier Whatman N°1, puis concentré sous vide à l'aide d'un évaporateur rotatif. Après séchage dans une étuve, l'extrait est conservé à 4°C jusqu'à son utilisation. Le rendement en EM (R_{EM}, w/w) est exprimé en pourcentage par rapport au poids sec de la plante (Erkan *et al.,* 2008).

3.4. Etude phytochimique

3.4.1. Analyses CG et CG-SM des HEs

Les analyses de chromatographie en phase gazeuse (CG) ont été effectuées sur un chromatographe en phase gazeuse Hewlett-Packard modèle 5890, équipé d'un détecteur à ionisation de flamme (FID) et relié à un intégrateur électronique. Les analyses GC-FID ont été effectuées selon les conditions analytiques suivantes: colonne capillaire ZB-5 (30m × 0.25mm × 0.25µm d'épaisseur du film); l'hélium comme gaz vecteur; injection en mode split (01:50); la température de l'injecteur et du détecteur est de 250 et 280°C, respectivement. La température du four a été programmée de 40 à 300°C à raison de 2°C/min. La chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CG-SM) a été réalisée sur le même chromatographe en phase gazeuse relié à un spectromètre de masse Hewlett-Packard modèle 5971A, une tension d'ionisation de 70eV, un multiplicateur d'électrons 1700V, la température de la source d'ion est de 180°C, les données des spectres de masse étaient acquises dans le mode de balayage en plage *m/z* de 40-400. Les conditions chromatographiques de gaz étaient les mêmes que ci-dessus.

L'identification des constituants a été basée sur leur indice de rétention CG (par rapport aux *n*-alcanes C_9-C_{22} dans la colonne ZB-5), une correspondance informatique des données spectrales SM avec ceux de la bibliothèque Wiley 275, la comparaison des modèles de

fragmentation avec ceux rapportés dans la littérature et, si possible, par co-injections avec des échantillons authentifiés.

3.4.2. Dosage des polyphénols totaux

La teneur en polyphénols totaux (TPT) de l'extraits méthanolique de chaque plante a été estimée par l'utilisation du réactif de Folin-Ciocalteu (Ruiz-Navajas *et al.*, 2013). Ce dernier est constitué par un mélange d'acide phosphotungstique ($H_3PW_{12}O_{40}$) et d'acide phosphomolybdique ($H_3PMo_{12}O_{40}$) qui est réduit, lors de l'oxydation des phénols, en mélange d'oxydes bleus de tungstène (W_8O_{23}) et de molybdène (Mo_8O_{23}). La coloration bleue produite possède une absorption maximale aux environs de 750nm. Elle est proportionnelle au taux de composés phénoliques. Chaque extrait est dissous dans le méthanol et ensuite un volume de 0.3ml est introduit dans les tubes à essais suivis de 2.5ml du réactif de Folin-Ciocalteu (10 fois dilué à l'eau) et 2ml de carbonate de sodium (Na_2CO_3) (7.5%, w/v). Les tubes sont mélangés au vortex, sont recouverts au parafilm et sont incubés à 50°C pendant 5min. L'absorption est mesurée à 760nm à l'aide d'un spectrophotomètre (Shimadzu UVmini-1240) et est comparée à une courbe d'étalonnage del'acide gallique (0-200µg/ml). Les résultats sont exprimés en µg équivalents d'acide gallique par milligramme (µg EAG/mg) d'extrait méthanolique sec, comme moyenne de trois répétitions.

3.4.3. Dosage des flavonoïdes totaux

La méthode du trichlorure d'aluminium ($AlCl_3$) a été utilisée pour estimer les flavonoïdes dans les extraits des plantes testées. Une solution diluée de l'extrait est préparée dans le méthanol. A 01ml de cette dernière est ajouté 01ml de la solution d'$AlCl_3$ (2% dans le méthanol). Après 15 min de réaction, l'absorbance est lue à 415nm contre un blanc constitué d'un mélange de méthanol (01ml) et d'extrait (01ml) sans $AlCl_3$. La concentration en flavonoïdes est déduite à partir d'une courbe standard (0-40µg/ml) établie avec la quercétine dans les mêmes conditions. Les résultats sont exprimés en microgrammes équivalents de quercétine par milligramme (µg EQ/mg) d'extrait sec (Khlifi *et al*., 2013).

3.5. Activités biologiques

3.5.1. Tests d'activité antioxydante

3.5.1.1. Détection rapide d'antioxydant par dot-blot et coloration au DPPH

Un criblage rapide de l'activité antioxydante a été réalisé par application en forme de dot-blot et coloration au 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) sur les différents extraits : un volume de 10µl de chaque concentration des EMs (1, 0.5, 0.25, 0.125 et 0.062mg/ml) ou des HEs (HE pure, 100, 50, 25 et 12.5µl/ml) est appliqué à la plaque de CCM. Après

séchage, la plaque est placée sur sa face dans une solution méthanolique de DPPH (0.2%) pendant 10 secondes. L'apparition de tâches jaunes sur un fond violé indique l'action antioxydante de l'extrait (Choi *et al.*, 2002).

3.5.1.2. Séparation par Chromatographie sur Couche Mince (CCM)

L'analyse par CCM a été réalisée par l'utilisation de plaque 20/20cm de gel de silice, 0.2mm sur support d'aluminium. Après activation de la plaque à 100°C pendant 30 min, un volume de 10µl de l'extrait ou de l'HE est déposé à 1.5cm du bord inférieur puis est soumis à l'action du système d'élution toluène/acétate d'éthyle (7:93, v/v) dans une cuve saturée. Après fin de migration, la plaque est séchée à l'air puis visualisée à l'œil nu et sous UV aux longueurs d'ondes 254nm et 366nm. La pulvérisation par le DPPH permet la révélation spécifique des composants antioxydants : l'activité antioxydante est représentée par des zones jaunes sur fond violet après un temps optimal de 30min. Les couleurs ainsi que les rapports frontaux (R_f) des spots sont enregistrés (Choi *et al*., 2002).

3.5.1.3. Test au DPPH

Le test au DPPH a été réalisé selon la méthode décrite par Hazzit *et al.* (2009) et Saeed *et al.* (2012). Les EMs et les HEs ont été solubilisés dans le méthanol absolu, puis ont subi des dilutions pour en avoir différentes concentrations de l'ordre de microgrammes par ml. Un volume de 50µl de chaque concentration est ajouté à 2ml d'une solution méthanolique de DPPH (0.004%). Après incubation à l'obscurité à température ambiante pendant 20min, l'absorbance est lue à 517nm contre un contrôle négatif ne contenant que la solution du DPPH. La même procédure est appliquée aux antioxydants standards utilisés comme contrôles positifs : acide ascorbique (AA), Butylhydroxytoluène (BHA) et Butylhydroxyanisol (BHT). Le pourcentage d'inhibition des radicaux libres (I%) est calculé selon la formule:

$$I\ (\%) = [(A_c - A_t)/ A_c] \times 100$$

où A_c est l'absorbance du contrôle négatif; A_t est l'absorbance de l'échantillon. Tous les tests sont effectués en trois répétitions et les résultats sont exprimés en moyenne ± SEM. La concentration de l'échantillon fournissant 50% d'inhibition (IC_{50}) est calculée à partir du graphique représentant le pourcentage d'inhibition contre la concentration de l'extrait ou de l'huile.

3.5.1.4. Test de blanchiment du β- carotène

Dans cet essai, l'oxydation de l'acide linoléique produit de nombreux produits d'oxydation (hydroperoxydes lipidiques, des diènes conjugués, et des sous-produits volatils)

qui attaquent le chromophore de ß-carotène, ce qui entraîne le blanchiment de sa couleur caractéristique. Cependant, la présence d'antioxydant inhibe le blanchiment du ß-carotène par les produits formés de l'oxydation de l'acide linoléique (Zouari *et al.*, 2011). Le test de blanchiment ß-carotène/acide linoléique a été réalisé selon la méthode décrite par Shukla *et al.* (2012). Une solution mère de ß-carotène et l'acide linoléique est préparée en dissolvant 0.5mg de ß-carotène dans 01ml de chloroforme, 25µl d'acide linoléique et 200mg de Tween 40. Le chloroforme est complètement évaporé sous vide dans un évaporateur rotatif à 40°C; puis 100ml d'eau distillée est ajouté et le mélange est vigoureusement agité. Des aliquotes (2.5ml) de l'émulsion ß-carotène/acide linoléique (fraîchement préparée avant chaque expérience) sont transférées aux tubes à essai contenant chacun 350µl de différentes concentrations, de l'extrait ou de l'HE de chaque plante, diluées dans le méthanol. L'absorbance est mesurée immédiatement à 470nm et l'émulsion essai est incubée dans un bain-marie à l'obscurité à 50°C pendant 120min où l'absorbance est mesurée à nouveau. La même procédure est appliquée au BHT et BHA comme témoins positifs, et au méthanol à la place de l'extrait comme témoin négatif. L'activité antioxydante relative (I%) est évaluée en terme de blanchiment du β-carotène selon la formule:

$$I\% = [(A_t - C_t)/ (C_0 - C_t)] \times 100$$

où A_t et C_t représentent les valeurs de l'absorbance mesurées pour l'échantillon testé et le témoin respectivement, après incubation pour 120min, et C_0 représente la valeur de l'absorbance pour le témoin mesurée au début de l'incubation. Les résultats sont exprimés en valeurs d'IC_{50} (µg/ml), la concentration requise pour provoquer 50% inhibition du blanchiment du β-carotène. Tous les tests sont effectués en trois répétitions et les résultats sont exprimés en moyenne ± SEM d'un triplicata (Aidi Wannes *et al.*, 2010).

3.5.1.5. Test du pouvoir réducteur

Le pouvoir réducteur de Fe^{3+} des EMs des plantes étudiées ou de leurs HEs a été déterminé selon Esmaeili et Sonboli (2010). L'extrait ou l'HE (0.75ml) à différentes concentrations est mélangé avec 0.75ml de tampon phosphate (0.2M, $pH_{6.6}$) et 0.75ml d'hexacyanoferrate de potassium [$K_3Fe(CN)_6$] (w/v, 1%), suivi d'incubation à l'obscurité à 50°C dans un bain-marie pendant 20min. La réaction est arrêtée par addition de 0.75ml d'une solution (10%) d'acide trichloroacétique (TCA), puis centrifugation à 3000rpm pendant 10min. Un volume de 1.5ml du surnageant est mélangé avec 1.5ml d'eau distillée et 0.1ml d'une solution (0.1%, w/v) de chlorure ferrique ($FeCl_3$) puis incubé pendant 10min. L'absorbance à 700nm est mesurée comme étant le pouvoir réducteur. La valeur EC_{50} (la concentration efficace à laquelle l'absorbance était de 0.5) a été calculée pour les extraits, le BHT et l'AA (Zengin *et al.*, 2010).

4. Champignons testés

4.1. Origine

Les champignons soumis à l'effet antifongique des plantes testées sont divisés en 03 groupes selon leur origine :

1- Un groupe de 08 champignons filamenteux sont offerts par le Département des Sciences des Médicaments et Produits de Santé. Université de Messine, Italie : *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger* ATCC16404, *Aspergillus ochraceus* ATCC28947, *Aspergillus parasiticus*, *Fusarium oxysporum*, *Penicillium citreonigrum*, *Penicillium frequentens*, *Ulocladium chartarum*.

2- Un groupe de 07 champignons filamenteux sont offerts par le Laboratoire de Biologie des Systèmes Microbiens (LBSM). Ecole Normale Supérieure de Kouba, Algérie : *Aspergillus flavus* NRRL3251, *Aspergillus parasiticus* CBS100926, *Fusarium culmorum*, *Fusarium graminearum*, *Fusarium moniliforme*, *Fusarium oxysporum* f. sp. *lini*, *Fusarium proliferatum.*

3- Le troisième groupe est composé de champignons isolés de fruits et légumes moisis ou altérés dont des olives, fraises, tomates, grenade, oignon, citron, orange, mandarine et banane (Figure 13).

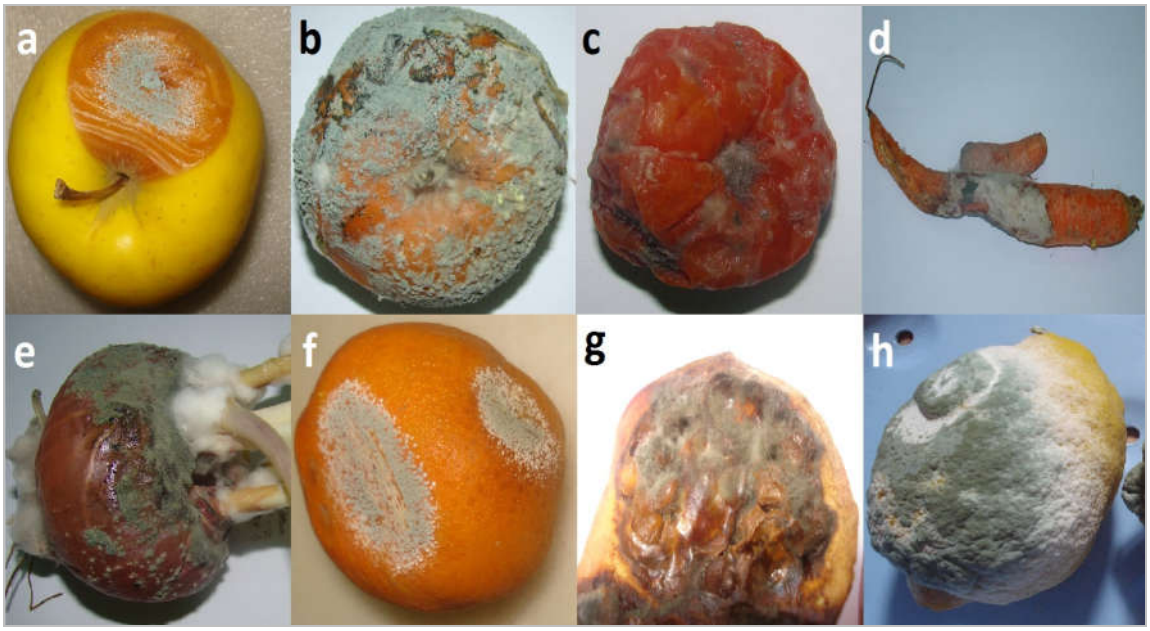


Figure 13. Quelques fruits et légumes sources de champignons étudiés : pomme (**a**) ; Orange (**b**) ; tomate (**c**) ; carotte (**d**) ; oignon (**e**) ; mandarine (**f**) ; grenade (**g**) et citron (**h**).

4.2. Isolement et identification des moisissures

Des prélèvements ont été effectués au niveau des endroits moisis et sites suspectés altérés des fruits et légumes d'isolement. Les parties prélevées sont placées sur milieu Potato Dextrose Agar (PDA). Les boites ensemencées sont incubées à 25°C est soumises à l'examen quotidien pour vérifier la croissance et faire l'isolement primaire. Le réensemencement des isolats a permis d'avoir des cultures pures.

Les champignons isolés et purifiés sont repiqués et maintenus sur PDA dans des tubes inclinés puis stockés à 4°C jusqu'à utilisation.

4.2.1. Milieux et méthodes d'identification

La technique d'identification de Pitt et Hocking est choisie (Pitt and Hocking, 2009). Trois milieux différents sont utilisés : Czapek Yeast Extract Agar (CYA), Malt Extract Agar (MEA) et 25% Glycerol Nitrate Agar (G25N). Leur inoculation et incubation sont effectuées selon la figure 14 ; les trois milieux à 25°C et CYA à 5 et 37°C. Des boîtes de Pétri de 90mm de diamètre sont utilisées sauf lorsque l'incubation a lieu à 5°C on utilise alors des boîtes de 60mm de diamètre. Les boîtes incubées à 37°C doivent être enfermées dans des sacs en polyéthylène pour empêcher l'évaporation, donc l'assèchement du milieu. La durée d'incubation est de 7 jours.

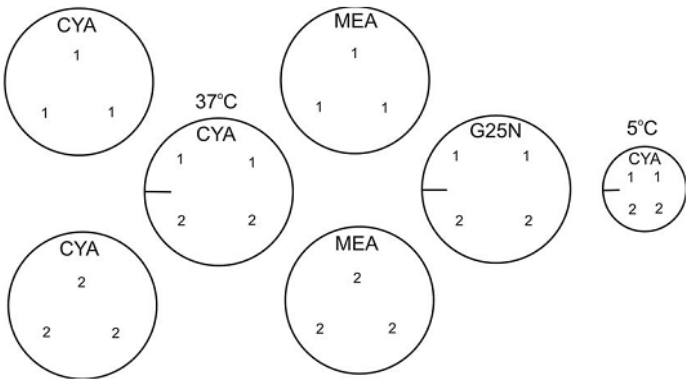


Figure 14. Schéma de culture des isolats fongiques destiné à leur identification (Pitt and Hocking, 2009).

Toutes les cultures sont récupérées après 7 jours d'incubation. L'identification implique la mesure du diamètre de la colonie fongique, l'aspect macroscopique et microscopique.

La mesure du diamètre de la colonie fongique s'applique sur le fond de la boite. La croissance ou la germination microscopique à 5°C est évaluée par analyse en microscopie à faible grossissement, en mettant la boîte de Pétri de 5°C sur le champ optique du microscope

et en examinant la lumière transmise. Lors de l'examen à l'œil nu ou sous un stéréomicroscope, on observe la texture (duveteuse, laineuse, cotonneuse, veloutée, poudreuse ou granuleuse...), le relief des colonies (plates, plissées, …), la couleur (pigmentation…), l'odeur et la présence de fructifications…..

L'examen microscopique implique la préparation de lames. A l'aide d'une aiguille d'inoculation, une petite partie est prélevée de la bordure de la colonie où les structures fertiles sont jeunes et le nombre de spores n'est pas excessif. L'échantillon est placé sur une lame, dans une goutte de lactophénol ou de lactophénol au bleu de méthyle. Recouvert d'une lamelle le champignon est prêt pour l'observation.

La culture sur lame a été appliquée afin d'examiner le champignon à son état cultivé directement au microscope. La méthode consiste à placer sur une lame, portée sur un support stérile en forme de U en boite de Pétri stérile, un petit carré (1cm × 1cm) de PDA que l'on a prélevé dans une boite de milieu solide de 2mm d'épaisseur. Ce bloc est ensemencé sur ses faces verticales est recouvert d'une lamelle stérile. Un peu d'eau distillée stérile est versée dans le fond de la boîte, ou sur un papier filtre stérile placé au fond de la boite. Celle-ci est refermée et le tout est placé à l'étuve à 25 °C pendant 24 à 48 heures selon le développement du champignon (Figure 15). Après culture, la lame est observée au microscope. Si la culture est optimale, le bloc de PDA est éliminé; une goutte de lactophénol au bleu de méthyle est déposée alors sur la lame et le tout est recouvert d'une lamelle. La lamelle de culture (à laquelle le mycélium adhère généralement) peut être retirée et posée sur une goutte de lactophénol placée sur une lame neuve.

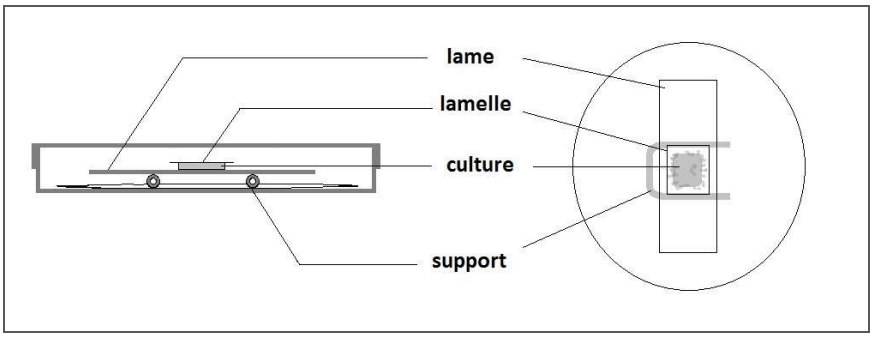


Figure 15. Culture sur lame pour observation des organes de fructification.

Les photographies et les mesures des différentes structures observées ont été faites au moyen du logiciel pour microscopie *Motic Images* 2000 version 1.3. D'autres guides d'identification ont été également utilisés: Botton *et al.* (1990), Watanabe (2002), Leslie and Summerell (2006) et Campbell *et al.* (2013).

4.2.2. Activité antifongique

L'activité antifongique des plantes testées a été vérifiée selon différentes méthodes.

4.2.2.1. Test de la plante en poudre sur la croissance mycélienne des champignons

L'activité antifongique de la poudre des plantes testées a été évaluée par la méthode de dilution en gélose décrite par Ameziane *et al.* (2007) et Askarne *et al.* (2012). Dix grammes de plante en poudre sont ajoutés à 100ml de milieu de culture PDA fondu à 40°C. La suspension résultante est agitée pendant 10min, passée à l'autoclave pendant 20min à 120°C et ensuite filtrée à travers des couches de gaze stérile avant d'être distribuée dans des boîtes de Pétri de 9cm de diamètre (15ml/boite). Le champignon cultivé sur PDA sans poudre végétale est utilisé comme témoin. Les boites préparées sont aseptiquement inoculées, avec des disques de 6mm de diamètre du champignon testé pris à partir du bord actif d'une culture âgée de 7 jours, et sont incubées à 25°C pendant 7 jours. Chaque test comprend trois répétitions. L'activité antifongique est exprimée en pourcentage d'inhibition de la croissance mycélienne (% ICM) et est calculée selon la formule suivante:

$$\% \text{ ICM} = [(\text{diamètre du témoin} - \text{diamètre du test})/\text{diamètre du témoin}] \times 100 \quad (1)$$

4.2.2.2. Test de fumigation des HEs des plantes testées

Cette technique (Feng *et al*., 2011) a été appliquée sur le milieu PDA (15ml par boite de Pétri 90mm). Un disque de 6mm de diamètre du champignon testé, pris à partir du bord actif d'une culture âgée de 7 jours, est déposé au centre du milieu en boite. Les boîtes sont maintenues dans une position inversée et un disque de papier filtre Whatman stérile de 9mm de diamètre est déposé au centre du couvercle puis imbibé de l'HE à différents volumes (5, 10, 15µl/disque). Un disque vide a servi de témoin. Les boites sont hermétiquement fermées avec du parafilm puis incubées à 25°C. Le développement du champignon est suivi quotidiennement par la mesure du diamètre de la colonie jusqu'au $7^{ième}$ jour. Chaque test comprend trois répétitions. L'activité antifongique au $7^{ième}$ jour est exprimée en pourcentage d'inhibition de la croissance mycélienne (% ICM) selon la formule (1) ci-dessus.

4.2.2.3. Test de contact direct des HEs dans le milieu de culture

Ce test antifongique est réalisé selon Soliman and Badeaa (2002) avec quelques modifications, l'HE solubilisée dans le diméthylsulphoxide (DMSO) est incorporée dans le milieu de culture PDA refroidi à 45°C. Les concentrations finales appliquées sont : 500, 1000 et 1500µl/l. Les boites de Pétri contenant chacune 15ml de milieu sont aseptiquement ensemencées au centre avec un disque du champignon testé pris à partir du bord actif d'une

culture âgée de 7 jours. Les témoins sont supplémentés uniquement de DMSO. Les boites inoculées sont incubées à 25°C à l'obscurité. Chaque test comprend trois répétitions. Le développement du champignon est suivi quotidiennement par la mesure du diamètre de la colonie jusqu'au 7^{ième} jour. L'activité antifongique au 7^{ième} jour est exprimée en pourcentage d'inhibition de la croissance mycélienne (% ICM) selon la formule (1) ci-dessus.

4.2.2.4. Test des puits de diffusion

Dans cette méthode (Tepe *et al*., 2005) les EMs des deux plantes sont pesés puis sont solubilisés dans le DMSO pour avoir une concentration finale de 700mg/ml. À l'aide d'un porte-pièce stérile (8mm), des puits sont effectués dans le PDA solide (boites de 90mm) à trois points équidistants du centre et des marges. Un volume de 20µl de l'EM de chaque plante est appliqué à chaque puits. Le milieu est aseptiquement ensemencé au centre par un disque (6mm) du champignon testé pris à partir du bord actif d'une culture âgée de 7 jours. Les témoins sont supplémentés uniquement de DMSO. Les boites sont incubées à 25°C à l'obscurité pendant 7 jours. Chaque boite sert d'un triplicata. La lecture est faite par la mesure du diamètre de la zone d'inhibition (mm) autour de chaque puits. L'activité antifongique est exprimée en pourcentage d'inhibition de la croissance mycélienne (% ICM) selon la formule (1) ci-dessus.

4.2.2.5. Test de viabilité des champignons totalement inhibés

Ce test a concerné les champignons totalement inhibés sous l'action des extraits des plantes étudiées. La méthode consiste à transférer le disque du champignon totalement inhibé au milieu PDA exempt de l'extrait et l'incuber encore une semaine. Si le champignon ne présente aucune croissance la concentration appliquée est dans ce cas fongicide.

4.3. Analyses statistiques

Toutes les expériences ont été réalisées en triple exemplaire et les données sont exprimées sous forme de moyenne ± SEM. L'analyse de variance (ANOVA) et de comparaison multiple de Tukey ont été considérées significatives à $p<0.05$. La comparaison entre les effets des 02 plantes sur les champignons testés est considérée significative à $p<0.05$ selon le test de comparaisons multiples de Sidak.

Toutes les analyses statistiques ont été réalisées au moyen du logiciel informatique GraphPad prism 6.05 pour Microsoft Windows.

CHAPITRE III
RESULTATS ET DISCUSSION

RESULTATS ET DISCUSSION

1. Enquête ethnobotanique

1.1. Aperçu général sur les informateurs

De 89 enquêtés les connaisseurs ont représenté 48%, les herboristes 34% et les tradipraticiens 18%. L'âge de 56% d'entre eux dépasse 30 ans, 38% sont sans niveau d'instruction et 70% étaient des femmes. Dans ce domaine, tous les habitants sont intéressés par l'utilisation traditionnelle des plantes. Cependant, les femmes étaient plus concernées par l'usage des plantes médicinales par rapport aux hommes. Ces résultats indiquent l'utilisation généralisée des plantes à cause de transmission du savoir entre les générations et la disponibilité des vendeurs d'herbes par rapport aux médicaments prescrits coûteux et parfois non disponible, en particulier au niveau des petites localités.

1.2. Plantes médicinales utilisées

Un nombre total de 82 espèces de plantes et 71 genres répartis sur 33 familles ont été répertoriés. Les familles dominantes étaient les *Lamiaceae*, *Apiaceae*, *Leguminosae* et les *Liliaceae* (Figure 16).

Les espèces de la famille des Lamiaceae représentent 22% du total des plantes inventoriées et 48.6% de la fréquence d'utilisation (Figure 17). Les gens de la zone d'étude utilisent fréquemment les plantes comme remèdes pour le traitement des maladies et troubles communs. Cette situation peut être expliquée par le nombre important de vendeurs d'herbes et par la haute fréquentation des boutiques herbiers essentiellement par des femmes, d'une part, et la disponibilité de plantes médicinales sous l'état spontanées ou cultivées dans les zones rurales ainsi que le niveau de scolarisation d'autre part.

Le tableau 3 résume la relation déterminée entre les plantes médicinales de la famille des lamiaceae et les maladies ou troubles pour lesquels elles sont conseillées. Les principales maladies traitées par les habitants de la zone d'étude comprennent les troubles digestifs, les problèmes broncho-pulmonaires, les maladies de la peau, le diabète, les troubles du système vasculaire et autres.

Ces résultats indiquent l'importance des membres de la famille des Lamiacées et leur large utilisation en tant que source de médicaments traditionnels. Certains d'entre eux sont des espèces populaires à travers le monde, des espèces appartenant aux genres *Teucrium*, *Marrubium*, *Origanum*, *Rosmarinus*, *Mentha*, *Thymus*, *Ajuga*, *Salvia*, *Lavandula* sont utilisées dans le traitement des maladies courantes comme les troubles digestifs, les abcès, la

goutte, la conjonctivite, les troubles menstruels, cholécystite, l'hépatite, les inflammations, les maladies du foie et dans la stimulation de la graisse et la cellulite (Ivancheva and Stantcheva, 2000, Rokaya *et al.*, 2010, Stankovic *et al.*, 2010).

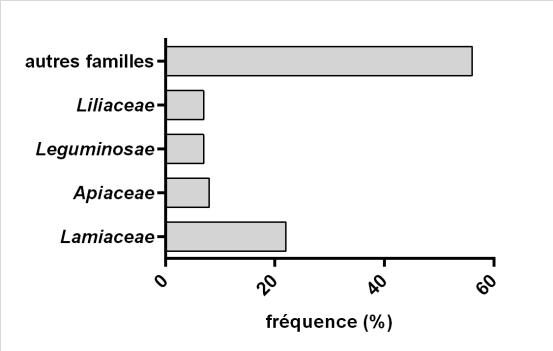


Figure 16. Les familles des plantes médicinales les plus dominantes dans l'usage traditionnel à M'sila.

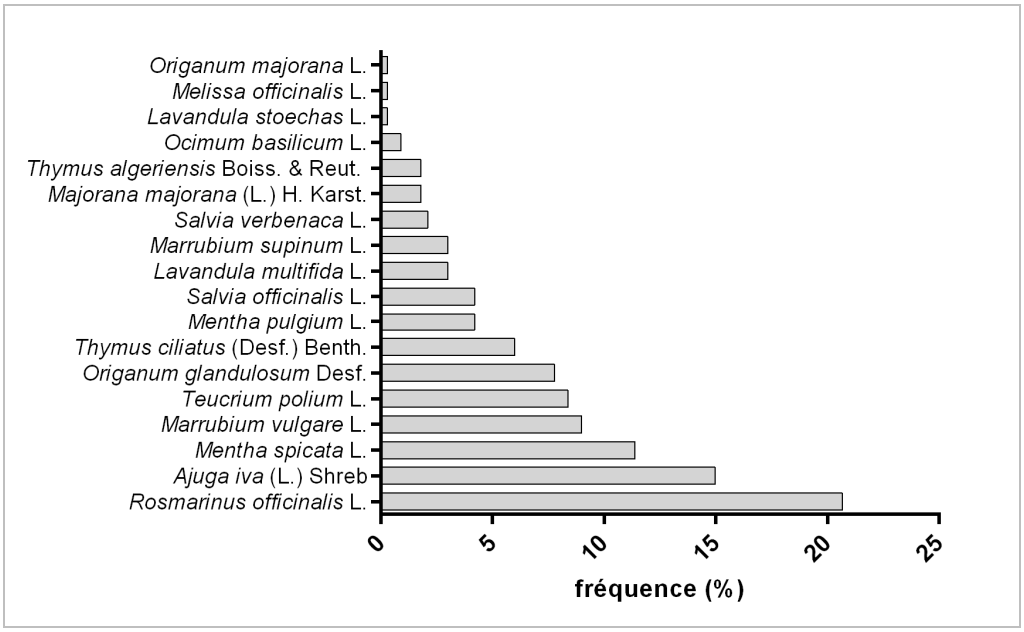


Figure 17. Lamiacées utilisées en médecine traditionnelle à M'sila.

Vingt pour cent des plantes médicinales utilisées pour le traitement de l'eczéma dans la zone d'étude sont labiées (Sari *et al.*, 2012). Certaines espèces de *Thymus* sont largement utilisées dans la médecine populaire algérienne pour leur effets antitussif, antiseptique, expectorant, anti-helminthes et des propriétés antispasmodiques (Hazzit *et al.*, 2009).

Des études au laboratoire indiquent l'activité antidiabétique des extraits aqueux de certaines plantes de la zone d'étude, l'administration orale de 200 et 300 mg/Kg p.c. de l'extrait aqueux de *Marrubium vulgare* induit un effet antidiabétique significatif (Boudjelal

et al., 2012). L'effet antioxydant de l'extrait aqueux d'*Ajuga iva* et d'autres activités biologiques de certains extraits de plantes médicinales de l'Algérie ont également été citées (Djeridane *et al.*, 2006, Taleb-Senouci *et al.*, 2009). Des EMs de *Teucrium polium* et *Ajuga iva* ont présenté une activité antibactérienne contre certaines bactéries pathogènes (Zerroug *et al.*, 2011).

La médecine traditionnelle est généralement préférée par certaines personnes parce que l'utilisation de plantes médicinales diminue les inconvénients des médicaments chimiques.

Cette étude vise les Lamiacées utilisées par les populations de M'sila. Ces plantes sont généralement utilisées pour le traitement des problèmes gastro-intestinaux, l'hypertension artérielle, d'une part, et pour certaines maladies telles que le diabète, l'asthme et de l'eczéma, d'autre part. Les principales espèces sont *Rosmarinus officinalis* L., *Ajuga iva* (L.) Shreb*, Marrubium vulgare* L.*, Mentha spicata* L., *Origanum glandulosum* Desf., *Thymus ciliatus* (Desf.) Benth. et *Teucrium polium* L.

La recherche ethnobotanique, pour la valorisation-transmission des savoirs sur l'utilisation des plantes, est le moyen le plus fiable pour préserver et assurer la continuité de la médecine traditionnelle et avoir une source sûre et durable de biomolécules alternatives aux molécules chimiquement synthétisées.

Tableau 3. Usages et modes de préparation des lamiacées utilisées en médecine traditionnelle à M'sila.

Nom de la plante (nom local)	Partie utilisée	Préparation	Utilisation
Ajuga iva (L.) Shreb (Chendgoura الشندقورة)	Plante entière	Infusion, poudre + miel,	Stomachique, antidiabétique, hypotenseur, tonique, diarrhée, fièvre.
Lavandula multifida L. (Khzama الخزامى)	Parties aériennes, feuilles	Infusion, gouttes oculaires, Cataplasme pour maux de tête	Sédatif, antispasmodique, cancer, astringent, stomachique.
Lavandula stoechas L. (Halhal الحلحال)	P. aériennes, feuilles	Infusion, Décoction	Asthme, influenza, lésions,
Majorana majorana (L.) H.Karst (Mardqouch المردقوش)	S. fleuries, feuille	Infusion, Décoction	Sédatif, crampe
Marrubium vulgare L. (Mariouet المريوت)	P. aériennes, feuilles	Cataplasme pour maux de tête	Antidiabétique, fébrifuge, vermifuge, diarrhée.
Marrubium supinum L. (Mariouet المريوت)	P. aériennes, feuilles	Infusion, gouttes oculaires	Fièvre, otite, amaigrissant, hypotenseur, eczéma
Melissa officinalis L. (Teronjene الترنجان)	P. aériennes	Infusion, Poudres, Bath	Sédatif, hypotension, rhumatisme.
Mentha spicata L. (Naânaâ النعناع)	P. aériennes	Infusion	Hypotension, sédatif, désinfectant, astringent
Mentha pulegium L. (Fliou الفليو)	P. aériennes	Infusion	Antispasmodique, hypotension, troubles d'estomac and stomachique
Ocimum basilicum L. (Hbaq الحبق)	Fleur, feuille	Infusion	Tension, stomachique, sédatif, aérophagie.
Origanum glandulosum Desf. (Zaâter الزعتر)	Feuille, fleur, S. fleuries, racines, p. aériennes	Infusion, Poudre + huile d'olive	Hypotension, antispasmodique, astringent.
Origanum majorana L. (Zaâter el moulk زعتر الملوك)	P. aériennes	Evaporation de poudre + huile d'olive	Tension, stomachique, sédatif, voies respiratoires
Rosmarinus officinalis L. (Klil الكليل)	P. aériennes, feuilles	Infusion, Compresse	troubles abdominaux, tonique, rhumatisme, troubles circulatoires.
Salvia officinalis L. (Miramia الميرمية)	P. aériennes, feuilles	Infusion, Poudre + miel, Poudre	antidiabétique, stomachique, troubles d'estomac
Salvia verbenaca L. (Khayata الخياطة)	P. aériennes, feuilles	Infusion, Décoction	Aromatic, stomachique, tonique, vulnéraire, désinfectant, antispasmodique, antisudorale, astringent (diarrhée), carminative,
Teucrium polium L. (Djaïda الجعيدة)	P. aériennes, feuilles	Infusion, Poudre	Désinfectant, stomachique, hémorroïdes, anémie
Thymus algeriensis Boiss. & Reut. (Zâaitra الزعيترة)	P. aériennes, feuilles	Infusion, Décoction	Hypotenseur, carminatif, antidiabétique, vermifuge, angines, hypocholestérolémiant, aromatique
Thymus ciliatus (Desf.) Benth. (Djertil الجرتيل)	P. aériennes, feuilles	Infusion, Décoction	Grippe, vermifuge, carminatif, tonique

2. Plantes testées

2.1. Rendements d'extraction

Les rendements en HEs des plantes étudiées étaient de 1.15 ± 0.1 et 1.6 ± 0.08% (v/w) pour *R. officinalis* et *T. ciliatus* respectivement. Des études ont montré des variations des rendements en HE de romarin en fonction de la variété de la plante et les caractéristiques écologiques de la zone de récolte (Jamshidi *et al.*, 2009 ; Zaouali *et al.*, 2010 ; Ojeda-Sana *et al.*, 2013). Le rendement varie si la plante est cultivée ou spontanée (Atik-Bekkara *et al.*, 2007), et selon la méthode d'extraction (Bousbia *et al.*, 2009). Les parties aériennes fraîches du romarin, récoltées en mois de Mars dans une zone algérienne à climat subhumide ont donné un rendement de 0.82 % (Djeddi *et al.*, 2007; Ouibrahim *et al.*, 2013). Les rendements des régions voisines de notre site de récolte (les Bibans; région de Bordj Bou Arreridj) varient entre 0.44 et 1.5% (v/w) (Boutekedjiret *et al.* 1998; 2003).Dans une zone algérienne ouest (Tlemcen), le rendement est d'environ 1.2% (Haddouchi *et al.*, 2009). *T. cilatus* de l'Afrique du Nord présente des rendements en HE variant aussi selon la région et la période de récolte ; de 0.3 à des niveaux extrêmes de 5.1% (Bousmaha-Marroki *et al.*, 2007 ; Amarti *et al.*, 2010 ; Ghorab *et al.*, 2013 ; 2014) et aux niveaux moyens de 2-3% (Giordani *et al.*, 2008 ; Amrouni *et al.*, 2014).

Selon le mode opératoire appliqué, l'extraction méthanolique du romarin a donné un rendement de 31.87 ± 3.4 % (w/w) et celle du thym en a donné 28.14 ± 1.9 % (w/w).

2.2. Etude phytochimique

2.2.1. Analyses GC et GC-MS des HEs

Le tableau 4 présente la composition de l'HE de *R. officinalis* étudiée. Au total, 31 éléments, soit 97.30%, ont été entièrement caractérisés et regroupés en trois catégories: les hydrocarbures monoterpéniques, monoterpènes oxygénés, et sesquiterpènes. La teneur de l'HE en d'hydrocarbures monoterpéniques et oxygénés était très élevée par rapport à celle en sesquiterpènes ; les valeurs sont de 43.6, 50.9 et 2.8% respectivement. L'HE est caractérisée par la prédominance de certains composants à savoir: le camphène, l'α-pinène, le limonène et le p-cymène parmi les hydrocarbures monoterpéniques; le camphre, le 1,8-cinéole, le bornéol, l'α-terpinéol et le terpinène-4-ol parmi les monoterpènes oxygénés; l'α-trans-bisabolène et le β-caryophyllène parmi les sesquiterpènes.

La composition chimique de l'HE de notre romarin comprend les composants principaux : camphre (41.2%), camphène (18.1%) et α-pinène (17.4%) ; elle est différente de celle du romarin de la région voisine (les Bibans dans la région de Bordj Bou Arreridj) qui

comprend comme composants majeurs 1,8 cinéol (52.4%), camphre (19.7%), α-terpinéol (12.8%), bornéol (12.1%) (Boutekedjiret *et al.*, 1998 ; 2003) ; elle est même différente de celle des autres régions de l'Algérie (Atik Bekkara *et al.*, 2007 ; Djeddi *et al.*, 2007 ; Bousbia *et al.*, 2009).

Tableau 4. Composition chimique de l'HE de *R. officinalis* de Kaf-el-Assel (Hammam-Dalâa -M'sila-).

N°[a]	IR exp.[b]	IR lit.[c]	classe/composant	%
			Hydrocarbures monoterpéniques	**43.6**
1	922	926	Tricyclène	0.7
2	936	939	α-Pinène[d]	**17.4**
3	951	954	Camphène[d]	**18.1**
4	976	979	β-Pinène[d]	0.5
5	987	990	Myrcène[d]	0.5
6	1001	1002	α-Phellandrène	0.3
7	1015	1017	α-Terpinène[d]	0.5
8	1023	1024	*p*-Cymène[d]	**1.5**
9	1029	1029	Limonène[d]	**3.8**
10	1059	1059	γ-Terpinène[d]	0.3
			Monoterpènes oxygénés	**50.9**
11	1032	1031	1.8-Cinéole[d]	**4.9**
12	1152	1146	Camphre[d]	**41.2**
13	1169	1169	Bornéol[d]	**2.5**
14	1180	1177	Terpinen-4-ol[d]	**0.9**
15	1192	1188	α-Terpinéol[d]	**1.0**
16	1290	1285	Acétate de Bornél[d]	0.3
17	1298	1290	Thymol[d]	t
18	1304	1299	Carvacrol[d]	0.1
			Sesquiterpènes	**2.8**
19	1379	1376	α-Copaène[d]	t
20	1424	1419	β-Caryophyllène[d]	**0.8**
21	1460	1434	β-trans-Farnesène	0.1
22	1482	1484	α-Amorphène	t
23	1485	1484	Germacrène D	0.1
24	1486	1496	γ-Amorphène	t
25	1500	1500	α-Muurolène	0.1
26	1505	1506	β-Bisabolène	0.1
27	1512	1513	γ-Cadinène	0.1
28	1520	1523	δ-Cadinène	0.2
29	1538	1538	α-Cadinène	t
30	1548	1545	α-Calacorène	t
31	1691	1685	α-Bisabolol	**1.3**
	Hydrocarbures monoterpéniques			**43.6**
	Monoterpènes oxygénés			**50.9**
	Sesquiterpènes			**2.8**
	Total			**97.3**

[a] La numérotation se rapporte à l'ordre d'élution, et les valeurs (rapport de pourcentage de surface du pic) représentent des moyennes de 3 déterminations (t = Trace. <0.05%).
[b] indice de rétention (IR) par rapport au mélange standard des n-alcanes sur colonne SPB-5.
[c] indice rétention de littérature (IR) (Adam, 2007).
[d] Co-injection avec le composant pur.

Le romarin de l'Espagne compte les composants 1,8-cinéole (15-25%), camphre (13-18,5%), α-pinène (18-26%), camphène (12.8%), β-pinène, myrcène, limonène, acétate de

bornyle, bornéol, et verbénone. Ceux de Tunisie et du Maroc compte 1,8-cinéole (38-55%), camphre (5-15%), α-pinène (9-14%), camphène (2,5-6%), β-pinène (4-9%), l'acétate de bornyle, le bornéol, la verbénone, le linalol (Charles, 2013).

Tableau 5 présente la composition de l'HE de *T. ciliatus*. Au total, 58 éléments, soit 95.68%, ont été entièrement caractérisés et regroupés en quatre catégories: les hydrocarbures monoterpéniques, monoterpènes oxygénés, sesquiterpènes, et autres. Les teneurs en hydrocarbures monoterpéniques et les sesquiterpènes sont très élevées par rapport à aux monoterpènes oxygénés soit 50.1, 40.3 et 5.3% respectivement. On remarque la présence d'un composé non terpénoïde, le 3-octanone, en quantité très faible.

Parmi les 16 composants d'hydrocarbures monoterpéniques 5 éléments (31.25%) prédominent dont respectivement α-pinène, myrcène, β-pinène, limonène et α-thujène. Les monoterpènes oxygénés qui sont mineurs contiennent essentiellement linalool, α-terpinéol, camphre et 1,8-cinéole. Les sesquiterpènes (32 composants) contiennent en quantités importantes β-caryophyllène, germacrène D, δ-cadinène, α-cadinol, α-eudesmol, δ-amorphène, élémol, γ-muurolène, β-bourbonène, β-eudesmol, α-humulène, α-copaène et β-copaène respectivement qui représentent 40.62%. Il convient de souligner que le thymol et le carvacrol sont totalement absents, même à niveau de trace ; se sont deux phénols monoterpéniques présents chez de nombreuses espèces de *Thymus*.

Les HEs des parties aériennes de plusieurs espèces de *Thymus* du Maroc, dont *T. ciliatus*, ont été analysées pour leur profils qualitatifs et quantitatifs (Jamali *et al.*, 2012) ; Les hydrocarbures monoterpéniques et les monoterpènes oxygénés étaient les principales classes de composés pour la plupart des espèces de thym étudiées. L'analyse typologique a permis la classification des espèces en trois groupes principaux dont le groupe contenant le thymol et/ou carvacrol, le γ-terpinène et le p-cymène renferme *T. ciliatus*.

Dans la littérature *Thymus* est signalé comme genre portant le thymol et/ou le carvacrol (Nickavar *et al.*, 2005 ; Jaafari *et al.*, 2007 ; Al-Fatimi *et al.*, 2010 ; Kasrati *et al.*, 2014 ; Tefiani *et al.*, 2015), et Kabouche *et al.* (2009) considère *T. ciliatus* comme l'HE de tout le genre *Thymus* contenant la plus haute quantité en thymol. Cependant, Ghorab *et al.* (2014) a cité une HE à partir d'un échantillon de *T. ciliatus* collecté en Algérie sans aucune quantité de phénols (thymol et carvacrol).

Tableau 5. Composition chimique de l'HE de *T. ciliatus* de Djbel Messaâd (M'sila).

N°[a]	IR exp.[b]	IR lit.[c]	classe/composant	%
			Hydrocarbures monoterpéniques	**50.09 (16)**
1	922	926	tricyclène	0.03
2	927	930	**α-thujène**	**1.05**
3	936	939	**α-pinène**[d]	**22.18**
4	951	954	camphène[d]	0.57
5	955	952	fenchène	0.04
6	972	975	sabinène	0.36
7	976	979	**β-pinène**[d]	**7.69**
8	987	990	**myrcène**	**13.13**
9	1000	1002	α-phellandrène	0.11
10	1014	1017	α-terpinene[d]	0.28
11	1023	1024	*p*-cymène[d]	0.25
12	1029	1029	**limonène**	**3.29**
13	1036	1037	*cis*-ocimène	0.03
14	1046	1050	*trans*-ocimène	0.32
15	1059	1059	γ-terpinène[d]	0.57
16	1088	1088	*p*-mentha-2,4-(8)-diène	0.19
			Monoterpènes oxygénés	**5.29 (9)**
17	1032	1031	1,8-cinéole[d]	0.54
18	1081	1086	*trans*-linalool oxide	0.19
19	1099	1096	**linalool**	**2.30**
20	1152	1146	**camphre**[d]	**0.73**
21	1166	1164	pinocarvone	0.02
22	1169	1169	bornéol[d]	0.10
23	1179	1177	terpinèn-4-ol[d]	0.42
24	1192	1188	**α-terpinéol**[d]	**0.90**
25	1197	1195	myrténol[d]	0.09
			Sesquiterpènes	**40.26 (32)**
26	1375	1375	ylangène	0.18
27	1379	1377	**α-copaène**[d]	**0.85**
28	1388	1388	**β-bourbonène**	**1.15**
29	1388	1393	β-cubebène	0.64
30	1424	1419	**β-caryophyllène**[d]	**10.23**
31	1434	1432	**β-copaène**	**0.82**
32	1440	1441	aromadendrène	0.06
33	1445	1450	*cis*-muurola-3,5-diène	0.03
34	1451	1453	*trans*-muurola-3,5-diene	0.24
35	1454	1454	**α-humulène**[d]	**0.90**
36	1458	1456	β-*trans*-farnesène	0.54
37	1485	1479	**γ-muurolène**	**1.17**
38	1491	1484	**germacrène D**	**9.86**
39	1495	1490	β-selinène	0.14
40	1500	1493	*trans*-muurola-4(14),5-diène	0.52
41	1504	1500	bicyclogermacrène	0.43
42	1505	1500	α-muurolène	0.29
43	1512	1505	β-bisabolène	0.22
44	1513	1512	**δ-amorphène**	**1.55**
45	1529	1523	**δ-cadinène**	**2.18**
46	1545	1534	*trans*-cadina-1(2),4-diène	0.07
47	1548	1538	α-cadinène	0.05
48	1559	1545	α-calacorène	0.02
49	1560	1549	**élémol**	**1.53**
50	1588	1578	spathulénol	0.05
51	1597	1583	caryophyllène oxide	0.65
52	1627	1631	eremoligénol	0.20
53	1649	1632	γ-eudesmol	0.54
54	1654	1654	**α-cadinol**	**2.09**
55	1661	1656	α-muurolol	0.04
56	1664	1660	**β-eudesmol**	**1.12**
57	1676	1663	**α-eudesmol**	**1.90**
			Autres	**0.04**
58	985	984	3-octanone	0.04

Hydrocarbures monoterpéniques	**50.09**
Monoterpènes oxygénés	**5.29**
Sesquiterpènes	**40.26**
Autres	**0.04**
Total	**95.68**

[a] La numérotation se rapporte à l'ordre d'élution, et les valeurs (rapport de pourcentage de surface du pic) représentent des moyennes de 3 déterminations (t = Trace. <0.05%).
[b] indice de rétention (IR) par rapport au mélange standard des n-alcanes sur colonne SPB-5.
[c] indice rétention de littérature (IR) (Adam, 2007).
[d] Co-injection avec le composant pur.

2.2.2. Dosage des polyphénols et flavonoïdes totaux

Les composés phénoliques sont considérés comme des métabolites secondaires et ces composés phytochimiques dérivés de phénylalanine et la tyrosine se produisent de façon ubiquitaire dans les plantes. Les flavonoïdes sont naturellement dans les plantes et sont considérés comme ayant des effets positifs sur la santé humaine. Les études sur les dérivés des flavonoïdes ont montré une large gamme de propriétés antibactériennes, antivirales, anti-inflammatoires, anticancéreuses, et anti-allergiques (Saeed *et al.*, 2012). Le tableau 6 représente les teneurs en polyphénols et flavonoïdes totaux des EMs et des HEs des plantes étudiées, déterminées par la méthode de Folin-Ciocalteu et la méthode de trichlorure d'aluminium respectivement. La teneur en composés polyphénoliques (µg EAG/mg) varie d'un minimum de 7.74± 0.43 pour l'HE du romarin à un maximum de 126.1± 3.40 pour l'EM de la même plante, alors que celle en flavonoïdes (µg EQ/mg) est maximale pour l'EM du thym (47.91± 0.99). Les HEs sont pauvres en polyphénols et flavonoïdes par rapport aux extraits.

Tableau 6. Teneurs en polyphénols et flavonoïdes totaux des EMs et des HEs des plantes étudiées. Les résultats sont exprimés en moyenne (n=3) ± SEM.

Extrait végétal	Polyphénols (µg EAG/mg)	Flavonoïdes (µg EQ/mg)
EM de *T. ciliatus*	82.67 ± 1.19 [a]	47.91± 0.99 [a]
EM de *R. officinalis*	126.8± 3.40 [b]	38.57 ±0.65 [a]
HE de *T. ciliatus*	13.42 ± 0.09 [c]	0.02 ±0.02 [b]
HE de *R. officinalis*	7.74± 0.43 [d]	0.01 ±0.00 [b]

Les moyennes suivies par la même lettre dans la même colonne ne sont pas significativement différentes (P<0.05) selon le test de comparaisons multiples de Tukey.

Ces résultats indiquent la richesse de nos plantes testées en polyphénols. Cela est clair par rapport à des études utilisant la méthode de Folin-Ciocalteu. Yesil-Celiktas *et al.* (2007) ont indiqué un niveau variant de 147.3 à 34.1mg EAG par g d'extrait de romarin récolté à partir de zones différentes de Turquie et aux périodes de récoltes différentes. Un niveau plus élevé (162 mg GAE/g) que celui de notre plante est mentionné par Erkan *et al.* (2008). D'autres études ont montré des teneurs en composés phénoliques inférieures (Moreno *et al.*, 2006; Wojdyło *et al.*, 2007; Santos *et al.*, 2012). Nos résultats montrent que notre *thymus* présentait un niveau en polyphénols plus élevé que celui de la même plante de l'ouest de l'Algérie récoltée en mois de Mai qui contenait 64.23 mg EAG/g (Kholkhal *et al.*, 2013); cela est peut-être dû aux caractéristiques écologiques des zones et périodes de récolte ou de la nature de la plante elle-même. Comparé à d'autres espèces du même genre notre thym (*T. ciliatus*) renferme des teneurs plus élevées en polyphénols et flavonoïdes que *T. algeriensis*

de la région de Laghouat qui présentait 18.73 µg AGE/mg et 2.10 ± 0.54 µg QE/mg respectivement (Boulanouar *et al.*, 2013). Une étude du contenu phénolique des HEs de différents clones de romarin appartenant à différentes zones géographiques d'Europe et d'Afrique du nord a montré que l'HE de la plante à rendement le plus faible a donné le niveau le plus élevé en polyphénols (Bányai *et al.*, 2003), ce qui explique que la qualité de l'HE n'est pas dépendante du rendement.

2.3. Activités biologiques

2.3.1. Tests d'activité antioxydante

2.3.1.1. Détection rapide d'antioxydant par *dot-blot* et coloration au DPPH

La capacité antioxydante des plantes testées a été visualisée à l'œil par un criblage rapide ; les EMs et les HEs dilués ont été appliqués sous la forme d'un point sur une couche CCM qui a été ensuite colorée avec une solution de DPPH (Figure 18). L'apparition de la couleur jaune dans les points a une valeur potentielle pour l'évaluation indirecte de la capacité antioxydante; l'intensité de la couleur de la tâche a été proportionnelle à la concentration et à la capacité antioxydante de l'échantillon appliqué. Le procédé est généralement basé sur l'inhibition de l'accumulation de produits oxydés, puisque la génération de radicaux libres est inhibée par l'addition d'antioxydants. Selon l'intensité de couleur, le romarin présente une activité antioxydante plus forte que celle de thym ; cela est notamment claire l'ors de l'application de l'HE pure et la concentration 0.125mg/ml de l'EM.

2.3.1.2. Séparation par Chromatographie sur Couche Mince (CCM)

L'analyse par CCM, appliquée par l'utilisant du système d'élution toluène/acétate d'éthyle (7:93, v/v), a permis de séparer quelques composants communs et non communs des 02 EMs et HEs. Après la révélation sous UV_{366}, UV_{254} et coloration au DPPH (Figure 19), les Ems et les HEs ont montré de nombreuses taches séparées visibles à l'œil ou sous lumière UV.

Pour la détection qualitative de la capacité antioxydante dans les extraits testés, la coloration au DPPH a permis de localiser plusieurs taches blanches ayant des intensités différentes sur plaque de CCM pour les HEs. Les EMs ont présenté moins de taches. Ceci est peut-être relié à la concentration appliquée de l'extrait ou au système de séparation utilisé. Deux composés des HEs aux $R_{f\,1}$= 0.56 et $R_{f\,2}$= 0.49 ont présenté une activité antioxydante importante qui se traduit par la couleur blanche intense et la taille du spot; le composé (2) de

l'HE du romarin parait le plus important (Figure 19). Choi *et al.* (2002) ont montré que les antioxydants de plusieurs extraits de plantes ne fonctionnent pas tous de la même façon et peuvent être plus efficaces contre les différents radicaux libres. Le nombre de taches blanches et leur migration sont différents parmi les extraits de plantes et en fonction du système solvant de la CCM. Leur intensité et la vitesse de réaction diffèrent également; certaines ont une capacité de piégeage de radicaux libres rapide, réduisent très rapidement le radical DPPH, tandis que d'autres en ont une plus lente et prennent donc plus de temps pour réagir.

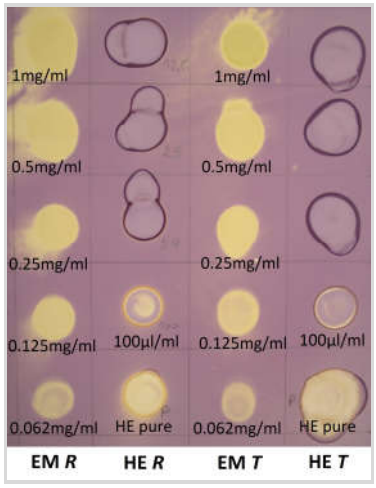


Figure 18. Criblage rapide du pouvoir antioxidant des extraits méthanolique et HE par dot-blot et coloration au DPPH. EM *R* : extrait méthanolique de *R. officinalis* ; EM *T* : extrait méthanolique de *T. ciliatus* ; HE *R* : HE de *R. officinalis* ; HE *T* : HE de *T. ciliatus.*

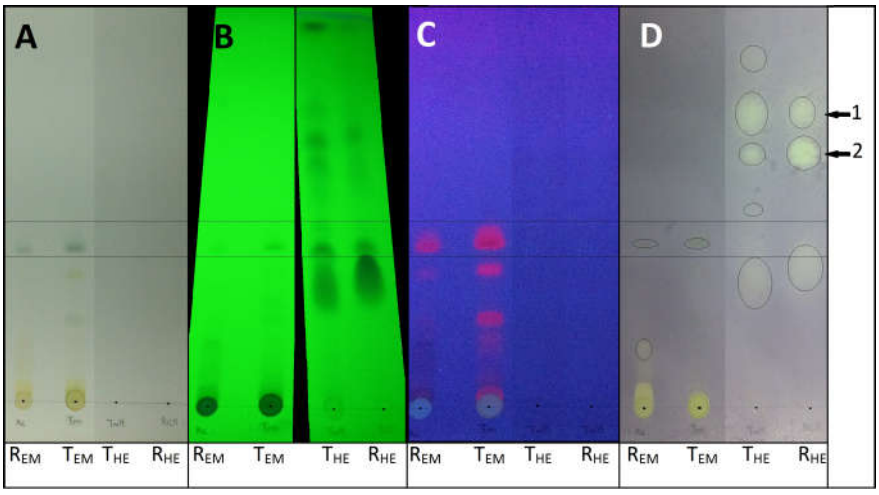


Figure 19. Analyse par CCM - toluène/acétate d'éthyle (7:93, v/v) – des EMs et HEs des plantes testées, et révélation des spots : à l'œil nu (**A**), sous UV_{254} (**B**), sous UV_{366} (**C**) et après coloraton au DPPH (**D**).
$\mathbf{R_{EM}}$: EM de *R. officinalis*, $\mathbf{T_{EM}}$: EM de *T. ciliatus*, $\mathbf{R_{HE}}$: HE de *R. officinalis*, $\mathbf{T_{HE}}$: HE de *T. ciliatus*. **1** et **2** : spots de composants ayant une forte capacité antiradicalaire.

2.3.1.3. Test au DPPH

La capacité de donner l'atome d'hydrogène ou l'électron de l'extrait MeOH ou de l'HE a été mesurée à partir de la décoloration de la solution méthanolique violette du DPPH mesurable à 517nm pour donner une couleur jaune (Figure 20). Ce radical libre stable est largement utilisé pour tester la capacité des composés à agir comme piégeurs de radicaux libres ou de donneurs d'hydrogène, et d'évaluer l'activité antioxydante des aliments (Esmaeili and Sonboli, 2010). L'activité de piégeage du radical libre DPPH dépend de la capacité de sa décoloration en présence d'antioxydants (Sourov *et al.*, 2014). Le tableau 7 montre les valeurs d'IC_{50} des EMs et des HEs des plantes étudiées et celles des antioxydants synthétiques BHA, BHT et AA.

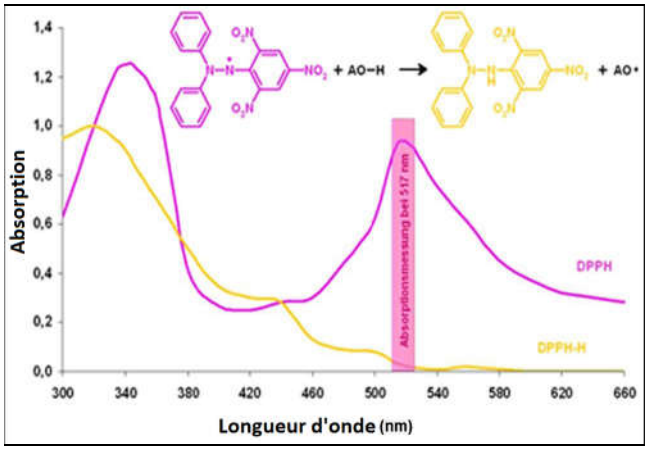


Figure 20. Graphique montrant le changement de couleur du DPPH du violet au jaune quand il est exposé à une substance antioxydante (Pérez and Aguilar, 2013).

Tableau 7. Activités antioxydantes, des extraits des plantes testées et les antioxydants standards, exprimées en valeurs d'IC_{50} (µg/ml) basées sur les tests du DPPH, de β-carotène et du Pouvoir réducteur (PR). (Les résultats sont exprimés en moyenne (n=3) ± SEM.

Extrait végétal	DPPH IC_{50} (µg/ml)	β-carotène/acide linoléique IC_{50} (µg/ml)	PR EC50 (µg/ml)
EM de *T. ciliatus*	16.93 ± 0.15 [a]	168.70 ± 3.72 [a]	54.46 ± 1.68 [a]
EM de *R. officinalis*	13.33 ± 0.13 [b]	38.11 ± 2.26 [b]	14.03 ± 1.35 [b]
HE de *T. ciliatus*	3.72 ± 0.10 [*c]	0.94 ± 0.12 [*c]	0.36 ± 0.01 [*c]
HE de *R. officinalis*	3.32 ± 0.05 [*c]	0.77 ± 0.01 [*c]	0.68 ± 0.01 [*d]
BHA	4.01 ± 0.34 [d]	0.44 ± 0.00 [d]	–
BHT	21.71 ± 0.27 [e]	0.57 ± 0.03 [d]	5.365 ± 0.24 [e]
AA	3.07 ± 0.15 [d]	–	12.62 ± 0.04 [b]

[*] Les valeurs sont représentées par (µl/ml).
Les moyennes suivies par la même lettre dans la même colonne ne sont pas significativement différentes (P<0.05) selon le test de comparaisons multiples de Tukey.

L'effet piégeur des HEs et des EMs des plantes étudiées envers le radical DPPH augmentait de façon linéaire avec l'augmentation de la concentration et peut être considéré de modéré à bon en comparaison avec les antioxydants synthétiques utilisés. Du tableau 7, les EMs des plantes étudiées ont présenté un effet piégeur très important et significativement élevé que celui du BHT ($p<0.05$) et inférieur à celui du BHA et de l'AA. Les HEs étaient moins efficaces et ne présentaient pas de différence significative entre elles ($p<0.05$). Ces résultats montrent que nos plantes possèdent un potentiel antioxydant très intéressant.

Notre thym a montré une activité cinquante fois plus élevée à celle mentionnée par Kholkhal *et al.*, 2013 de l'extrait de la même plante poussant à l'Ouest de l'Algérie. De même pour les espèces du même genre ; *Thymus pallescens*, *T. algeriensis*, *T. dréatensis*, leur activité antioxydante déterminée par le test du DPPH est plus faible par rapport à notre *Thymus* ; elle est mentionnée allant de 235 à 900µg/ml (Hazzit *et al.*, 2009 ; 2013 ; Boulanouar *et al.*, 2013). L'HE parait d'une efficacité faible et présentant une valeur IC_{50} inférieure à celle d'autre espèces du même genre ; *T. sipyleus* (IC_{50}= 220±0.5µg/ml (0.27µl/ml) et 2670±0.5µg/ml) cité par Tepe *et al.* (2005), *T. vulgaris* L. (IC_{50}=189±2.38µg/ml) cité par Miladi *et al.* (2013). Il a été mentionné que le thym à activité antioxydante élevée contient toujours des quantités élevées en thymol et/ou carvacrol (El Ouariachi *et al.*, 2014), cependant notre thym détient d'une activité antioxydante importante mais il est exempt de ces composés, ce qui montre que les activités antioxydantes des HEs et des extraits pourrait être dues l'effet synergique de tous les constituants.

Comparé à d'autres études (Okoh *et al.*, 2011 ; Kontogianni *et al.*, 2013), notre extrait de romarin testé présentait une haute activité de piégeage du radical libre DPPH alors que l'HE présentait une activité faible par rapport à la valeur IC_{50}=437±5.46 µg/ml citée par Miladi *et al.* (2013). Ojeda-Sana *et al.* (2013) ont rapporté une grande capacité de piégeage liée à un chémotype d'HE de romarin riche en myrcène, mais Wang *et al.* (2008) et Hussain *et al.* (2010) ont mentionné une plus grande activité d'HE de *R. officinalis* mieux que ses principaux composants, à savoir le 1,8-cinéole, le camphre, l'α-pinène. Ces derniers composants forment les principaux éléments de l'HE de notre romarin. Cependant les principaux composés et également les composés mineurs peuvent apporter une contribution significative à l'activité antioxydante de l'huile essentielle.

2.3.1.4. Test de blanchiment du β- carotène

Le test de blanchiment du β-carotène/acide linoléique est l'un des essais antioxydants appropriés pour les échantillons végétaux. Dans cet essai, la capacité antioxydante est déterminée en mesurant l'inhibition de la production de composés organiques volatils et la

formation d'hydroperoxydes de diènes conjugués issus de l'oxydation de l'acide linoléique, ce qui entraîne la décoloration de β-carotène (Krishnaiah *et al.*, 2011). Le radical libre de l'acide linoléique formé lors de l'abstraction d'un atome d'hydrogène à partir de l'un de ses groupes méthylène diallyliques attaque la molécule de β-carotène fortement insaturée, donc le β-carotène est oxydé en perdant sa couleur orange qui est ensuite suivie par spectrophotométrie (Okoh *et al.*, 2011)

Les résultats obtenus à partir de cette analyse ont montré un ordre d'efficacité similaire à celui présenté au test du piégeage du radical libre DPPH (tableau 7). Néanmoins les valeurs IC_{50} sont plus élevées et notamment celles des EMs si comparées avec le BHA et le BHT qui présentaient une forte inhibition du blanchiment du β-carotène à faibles concentrations. L'HE notre *T. ciliatus* parait plus efficace (2.21mg a donné une inhibition de 91.38%) par rapport à celle de la même plante (87.39 % a été mesurée à 4 mg/ml) citée par Ghorab *et al.* (2013). D'autres espèces du genre *Thymus* ont montré une activité plus importante allant de 23.62 à 92.87µg/ml (Nickavar and Esbati, 2012)

2.3.1.5. Test du pouvoir réducteur

Le pouvoir réducteur des HEs ou des EMs a été étudié par la méthode décrite par Esmaeili et Sonboli (2010). Dans cet essai, la couleur jaune de la solution d'essai se transforme en différentes nuances de vert et de bleu en fonction de la puissance de réduction de chaque extrait. La présence d'agents réducteurs (antioxydants) dans les extraits de plantes provoque la réduction du complexe Fe^{3+}/ferricyanure à la forme ferreux. Par conséquent, le Fe^{2+} peut être surveillée en mesurant la formation du bleu de Prusse à 700 nm (Amarowicz *et al.*, 2004). D'après le tableau 7 le pouvoir réducteur des HEs, des EMs et des composés de référence le BHT et l'AA augmentait avec l'augmentation de la concentration, avec une augmentation rapide remarquable du BHT. Les valeurs EC_{50} ont montré la capacité réductrice selon l'ordre BHT> AA> EM_R> EM_T> HE_T > HE_R. A la concentration maximale testée (500µg/ml), l'EM du romarin présentait un pouvoir réducteur plus élevé que celui de l'AA. Dans cet essai l'HE du *Thymus* étudiée est faible par rapport à celles d'autres espèces spontanées ou cultivées (El Bouzidi *et al.*, 2013)

- Les composés phénoliques des plantes sont très importants parce que leurs groupes hydroxyles confèrent la capacité de piégeage. Parmi les catégories des composés phénoliques, les flavonoïdes possèdent de potentielles activités antioxydantes (Saeed *et al.*, 2012). La nature physico-chimique des composés phénoliques individuels dans les extraits peut être plus importante en contribuant à l'activité antioxydante que le contenu phénolique (Santos *et al.*, 2012). L'activité antioxydante des antioxydants putatifs a été

attribuée à divers mécanismes, parmi lesquels la prévention de l'initiation de la chaîne, liaison des catalyseurs de la transition des ions métalliques, la décomposition des peroxydes, la prévention de la poursuite de l'abstraction d'hydrogène, la capacité réductrice et piégeage des radicaux (Gülçin *et al.*, 2004). La technique du blanchiment β-carotène emploie un système d'émulsion, donc l'activité dépend de la polarité du substrat. Les antioxydants apolaires peuvent présenter des propriétés antioxydantes plus fortes dans les émulsions, car ils se concentrent dans la phase lipidique. D'autre part, les antioxydants polaires restent dans la phase aqueuse et sont donc moins efficaces dans la protection des lipides (Nickavar and Esbati, 2012).

- Du point de vue chimique sur les HEs végétales, les hydrocarbures monoterpéniques et monoterpènes oxygénés ont le rôle principal dans l'action protectrice suivis par les hydrocarbures sesquiterpéniques (Ruberto and Baratta, 2000). Yesil-Celiktas *et al.* (2007) a souligné que la composition de l'extrait du romarin change selon le type de l'échantillon, l'emplacement et le moment de la récolte ainsi les différents extraits de différentes zones géographiques et de différents points de temps varient également considérablement. Les activités antioxydantes dans les extraits du romarin pourrait être dues au carnosol, l'acide carnosique, l'acide rosmarinique, rosmanol, et aux composés phénoliques de rosemaridiphenol (Rababah *et al.*, 2004).
- le genre *Thymus* possède deux principaux groupes de métabolites secondaires, les terpènes volatiles et les composés polyphénoliques. Tous les deux sont principalement responsable des effets biologiques de ce genre, en particulier les activités antioxydantes (Charles, 2013). Les phénols monoterpénoïdes (tels que le thymol et le carvacrol) constituent les principaux composés des HEs obtenues à partir de différentes espèces de *Thymus*. D'autre part, la présence de divers constituants polyphénoliques, en particulier des flavonoïdes et des acides phénoliques, est bien connue chez le *Thymus* (Nickavar and Esbati, 2012).

3. Champignons testés

3.1. Origine

Outre les 02 groupes de champignons offerts par les 02 institutions précédemment citées, les méthodes d'isolement, de purification et d'identification ont permis d'avoir un groupe de 17 champignons isolés de fruits et légumes divers. Ces isolats appartiennent aux genres *Alternaria*, *Aspergillus*, *Botrytis*, *Cladosporium*, *Emericella*, *Eurotium*, *Fusarium*, *Moniliella* et *Penicillium* (tableau 8).

Tableau 8. les champignons isolés et leurs origines d'isolement.

Champignon isolé	Origine d'isolement	Champignon isolé	Origine d'isolement
Alternaria alternata (f)	fraise	*Fusarium oxysporum*	banane
Alternaria alternata (g)	grenade	*Moniliella suaveolens*	tomate
Aspergillus glaucus (*Eurotium herbariorum*)	grenade	*Penicillium aurantiogriseum*	citron
Aspergillus nidulans (*Emericella nidulans*)	olive	*Penicillium chrysogenum*	pamplemousse
Aspergillus niger	orange	*Penicillium digitatum*	orange
Botrytis aclada	oignon	*Penicillium expansum*	pomme
Botrytis cinerea	fraise	*Penicillium griseofulvum*	citron
Cladosporium herbarum	olive	*Penicillium italicum*	mandarine
Cladosporium sphaerospermum	carotte		

3.2. Identification des champignons isolés

3.2.1. *Alternaria alternata*

Ce champignon forme des colonies supérieures à70mm couvrant souvent la boite de Pétri. Leur diamètre sur CYA est de 64-70mm de diamètre, gris-noires avec des bords verdâtres et un revers noir. Croissance faible à 37°C (colonie de 4-5mm). A 5°C des colonies blanches de 8-10 mm. Colonies marron sur MEA atteignant 52-54mm, revers marron-jaune pâle. Colonies sur G25N de 15-18 mm marron sur les deux faces. Conidiophores septés et lisses. Conidies en chaines simples ou ramifiées, brunes et irrégulières, 16-40 x 4-14µm (Figure 21).

3.2.2. *Aspergillus glaucus* (*Eurotium herbariorum*)

Colonies sur CYA de 5-12mm de diamètre, jaunes-verdâtres, granulées, revers jaune pale. Pas de croissance à 37°C et 5°C. Colonies sur MEA de 8-14mm, caractères semblables à celles sur CYA. Les colonies sur G25N de 18-22mm blanchâtres, jaunes-verdâtres au centre, revers blanc. Conidiophores lisses de 50-80µm de longueur, phialides 8-11µm de long, conidies de 3-5µm de diamètre. Cleistothèces de 30-35µm (Figure 22).

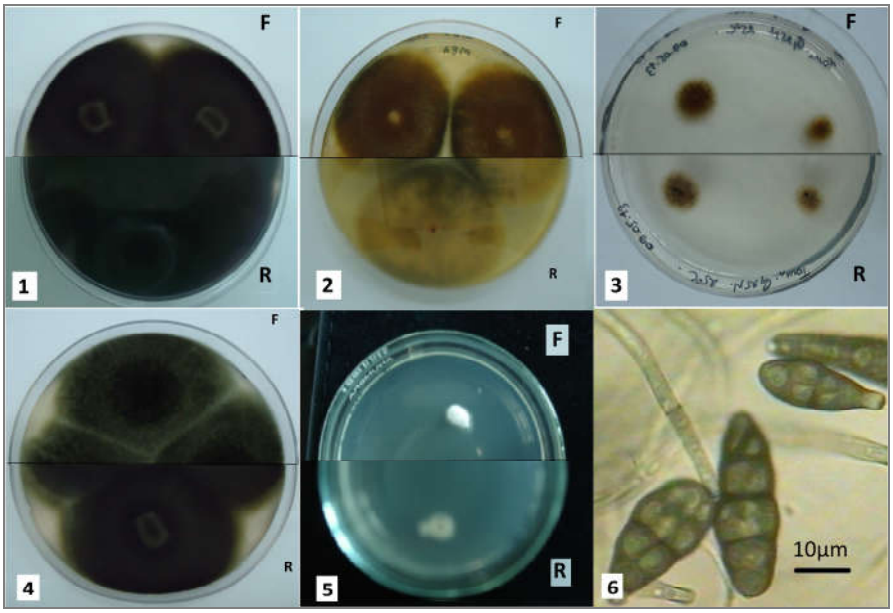


Figure 21. *Alternaria alternata* après 7 jours d'incubation à 25°C sur (1) CYA, (2) MEA, (3) G25N, (4) PDA, (5) CYA à 5°C ; (6) mycélium et conidies. (F= face ; R= revers).

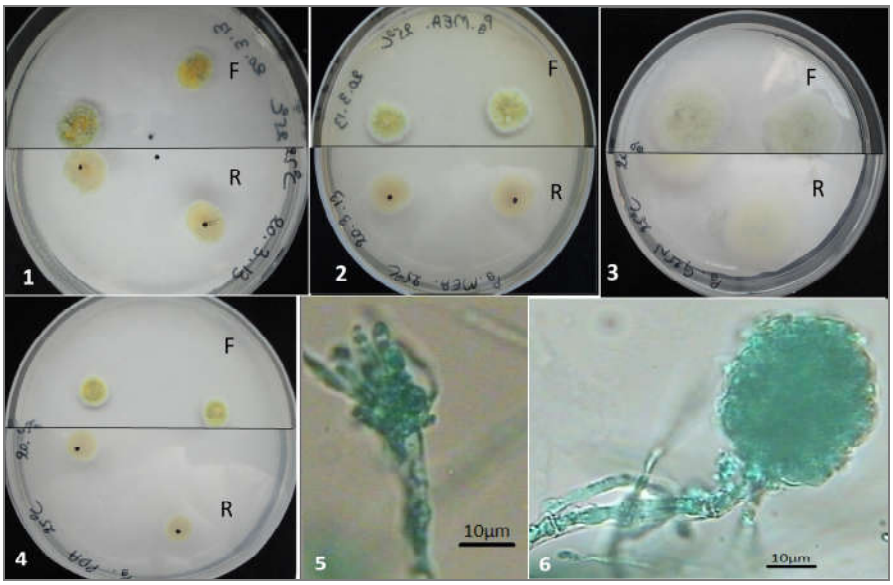


Figure 22. *Aspergillus glaucus* (*Eurotium herbariorum*) après 7 jours d'incubation à 25°C sur (1) CYA, (2) MEA, (3) G25N, (4) PDA ; (5) tête conidienne, (6) cleistothecium. (F= face ; R= revers).

3.2.3. *Aspergillus nidulans* (*Emericella nidulans*)

Colonies sur CYA de 40-50 mm de diamètre blanches, plates, vert foncé ou légèrement vert jaune claire au centre, le revers est orange (orange ou rougeâtre). A 37°C colonies de 40-50mm vert-gris, frisées, le revers est orange pale. Pas de croissance à 5°C. Colonies sur MEA 36-43mm, jaunes pâles, revers orange pâle. Colonies sur G25N de 10-15mm blanches, revers jaune pâle. Conidiophores bruns lisses de 60-120µm de long, les phialides de 6-8µm, conidies sphériques de 3-4µm. présence de cellules de Hülle de 10-20µm (Figure 23).

3.2.4. *Aspergillus niger*

Colonies sur CYA de 60-70mm de diamètre remplissant la boite de Pétri, noires, plates et frisées, revers pâle, voire jaune clair. A 37°C, les colonies atteignent 55-66mm, envahissent l'espace disponible avec parfois des sillons. Pas de croissance à 5°C. Colonies sur MEA de 30-40mm; sur G25N de 22-27mm, plates, veloutées, avec une bordure mycélienne blanche ou jaune claire, revers pâle. Conidiophores de 1-1.5mm de long, phialides de 7-10µm de long, conidies sphériques de 4-5µm (Figure 24).

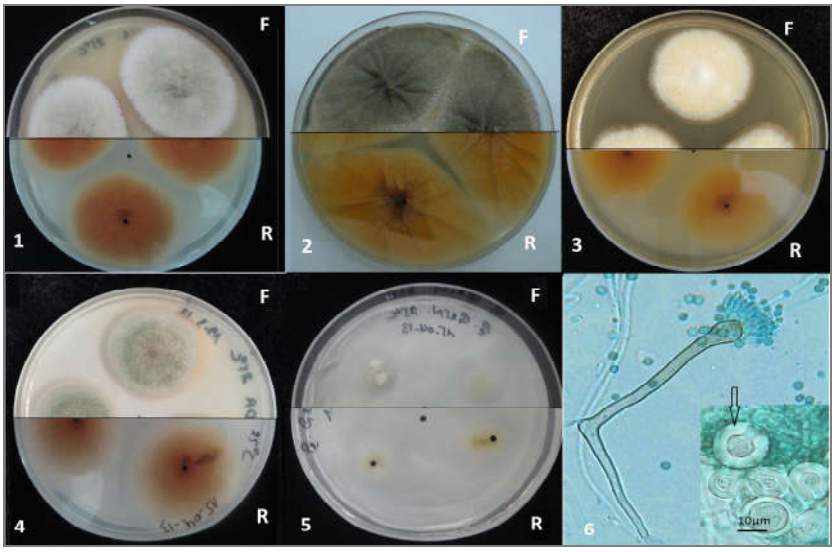


Figure 23. *Aspergillus nidulans* (*Emericella nidulans*) après 7 jours d'incubation à 25°C sur (1) CYA à 25°C, (2) CYA 37°C , (3) MEA, (4) PDA, (5) G25N ; (6) tête aspergillaire + conidies + cellules de Hülle -flèche-. (F= face ; R= revers).

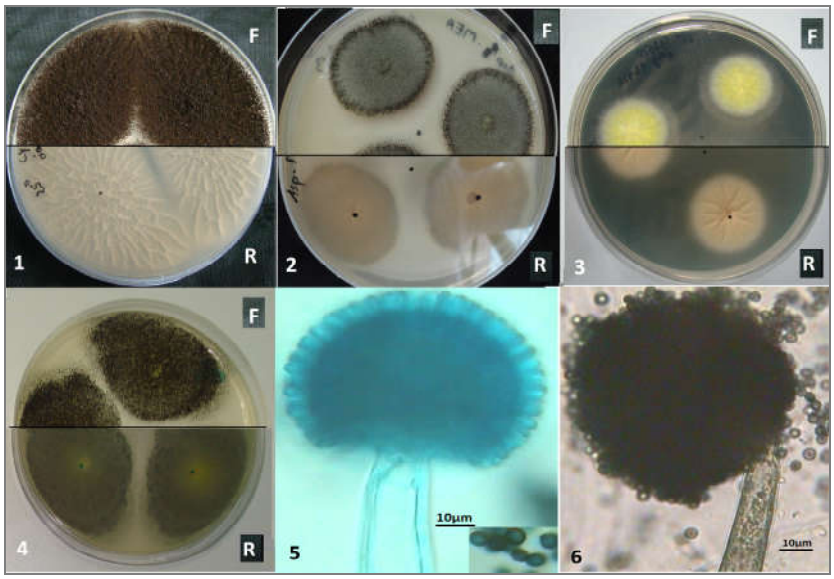


Figure 24. *Aspergillus niger* après 7 jours d'incubation à 25°C sur (1) CYA, (2); MEA, (3) G25N, (4) PDA ; (5) tête aspergillaire jeune + conidies, (6) tête sporifère mûre + conidies. (F= face ; R= revers).

3.2.5. *Cladosporium herbarum*

Colonies sur CYA de 20-23mm de diamètre verts olivacé, revers noirs. Pas de croissance à 5°C et à 37°C. Colonies sur MEA de 20-21mm verts avec des bords gris, revers noir ; sur G25N de 5-10mm verts sombre à revers noir. Les Conidiophores de 15-200µm de long, conidies de 3-9×3-5µm unicellulaires lisses (Figure 25).

3.2.6. *Cladosporium sphaerospermum*

Colonies sur CYA de 16-18mm de diamètre verts olivacés, revers noir. Pas de croissance à 5°C et à 37°C. Colonies sur MEA de 15-16mm gris, à bords marrons; revers noir au centre avec des bords marrons. Colonies sur G25N de 5-8 mm olivacées, le revers est noir. Conidiophores de 100-200µm, conidies de 3-4µm (Figure 26).

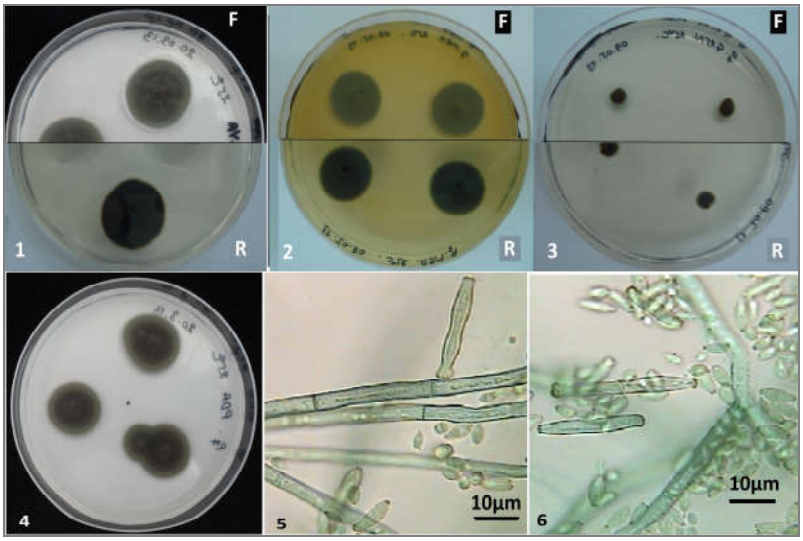


Figure 25. *Cladosporium herbarum* après 7 jours d'incubation à 25°C sur (1) CYA, (2) MEA, (3) G25N, (4) PDA ; (5) et (6) mycélium + conidies. (F= face ; R= revers).

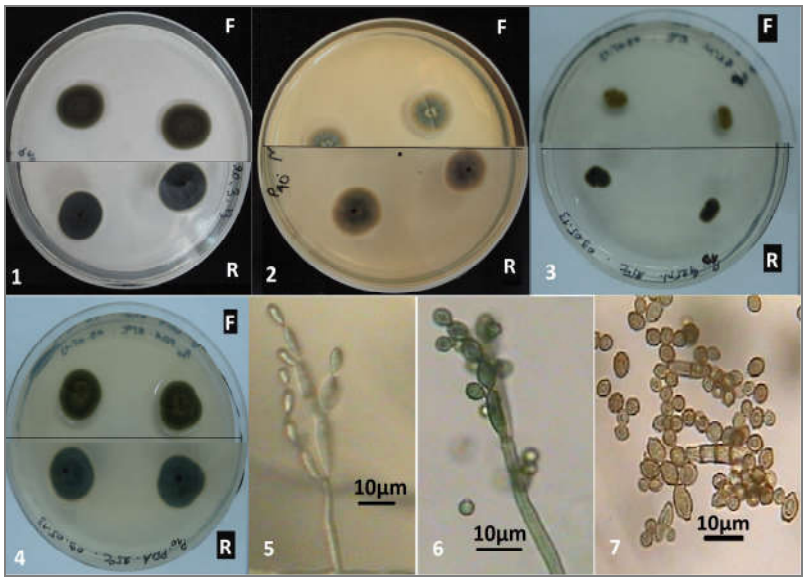


Figure 26. *Cladosporium sphaerospermum* après 7 jours d'incubation à 25°C sur (1) CYA, (2), MEA, (3) G25N, (4) PDA ; (5) aspect microscopique sur lame de culture, (6) aspect microscopique entre lame et lamelle ;(7) conidies. (F= face ; R= revers).

3.2.7. *Botrytis aclada*

Colonies sur CYA 60-62mm de diamètre; mycélium floconneux blanc devenant gris foncé au centre, revers gris pâle. Pas de croissance à 37°C et de petites colonies à 5°C de 4mm. Thalle bun pâle couvrant la boite sur MEA avec revers de même couleur. Colonies sur G25N 5-6mm marron à revers pâle. Conidies étroites elliptiques de 11-14 × 5-6µm. Conidiophores atteignant de 100-500µm. Formation de sclérotes (Figure 27).

3.2.8. *Botrytis cinerea*

Thalle à croissance rapide, floconneux, mycélium blanc, devenant gris à gris foncé sue CYA et MEA; revers gris pâle. Sur G25N, les colonies 10-20mm irrégulières grises pâles. Pas de croissance à 37°C et de petites colonies à 5°C de 4-8mm. Conidiophores de 100-500µm de long, avec des sommets sphériques gonflées. Conidies ovées et sèches de 8-15× 8-10µm. Formation de sclérotes au niveau de toute la boite (Figure 28).

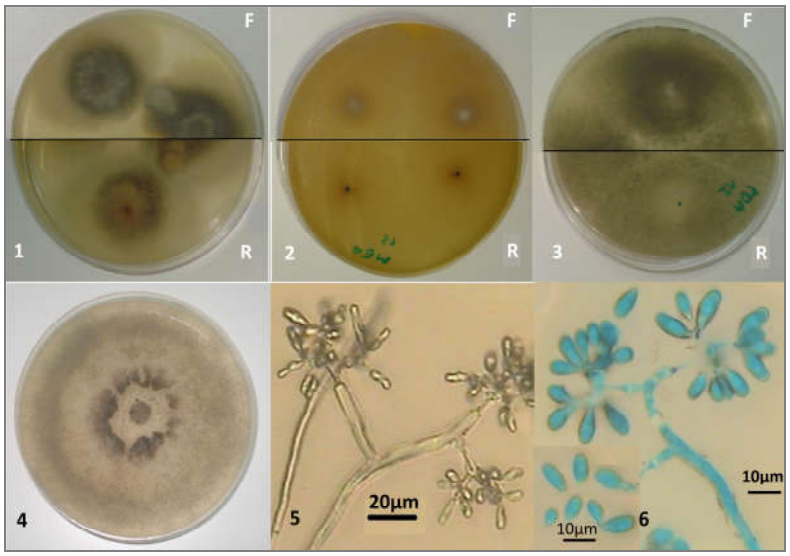


Figure 27. *Botrytis aclada* après 7 jours d'incubation à 25°C sur (1) CYA, (2); MEA, (3) PDA ; (4) formation de sclérotes ; (5) conidiophores et conidies sur lame de culture, (6) conidiophore et conidies entre lame et lamelle après coloration. (F= face ; R= revers).

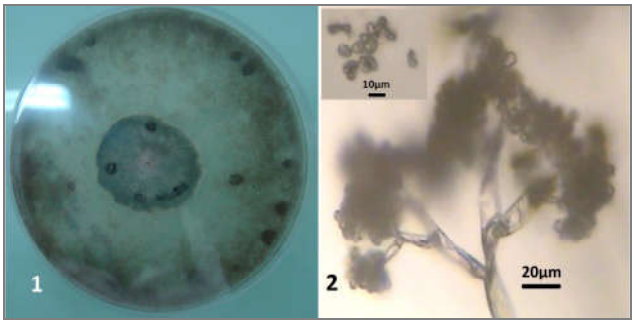


Figure 28. *Botrytis cinerea* (1) sur milieu PDA, (2) conidiophore et conidies sur lame de culture.

3.2.9. *Moniliella suaveolens*

Colonies sur CYA 48-53 mm de diamètre verts à gris, revers noir, thalle velouté ou plus au moins laineux. A 37°C colonies 10-16mm, olivacées, revers noir. Pas de croissance à 5°C. Colonies sur MEA 39-46 mm blanchâtres à beige avec des bords blanches, revers marron jaunâtres. Colonies sur G25N 6-9mm marron claires avec des bords blanches, revers pâle. Conidies fusiforme aux deux extrémités de 8-38µm (Figure 29).

3.2.10. *Fusarium oxysporum*

Colonies sur CYA 70-80mm de diamètre, couvrant la boîte de Pétri, floconneuses blanches au mycélium grisâtre; revers pâle. Colonies sur MEA 65-70mm, couvrant la boîte de Pétri, mycélium blanc floconneux pourpre pâle; revers pourpre au violet. Microcolonies sur G25N de 5mm. Pas de croissance à 37°C et à 5°C. Microconidies de 3-8µm fusiformes à réniformes issues de monophialides courtes de 7 à 10µmde diamètre (Figure 30).

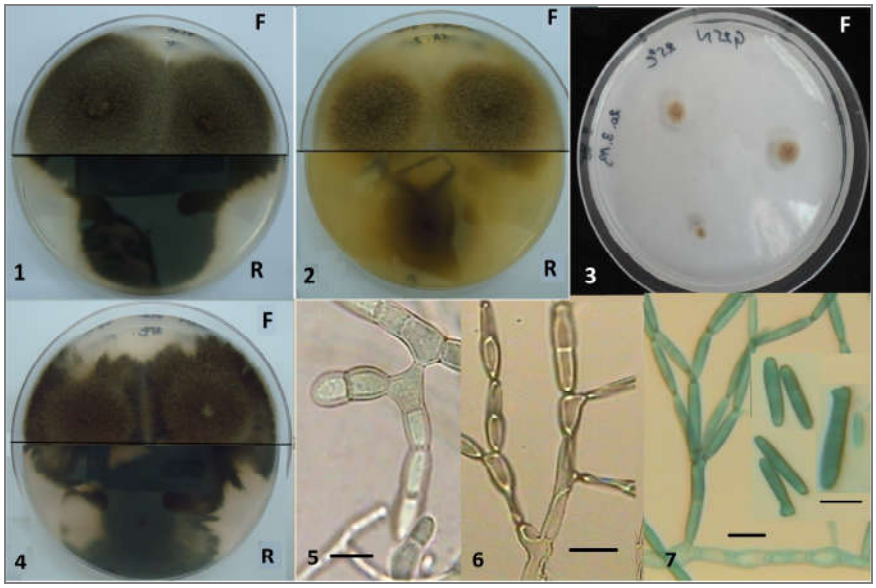


Figure 29. *Moniliella suaveolens* après 7 jours d'incubation à 25°C sur (1) CYA, (2) MEA, (3) G25N, (4) PDA ; (5) mycélium entre lame et lamelle, (6) aspect microscopique sur lame de culture, (7) mycélium et conidies ; échelle : 10µm. (F= face ; R= revers).

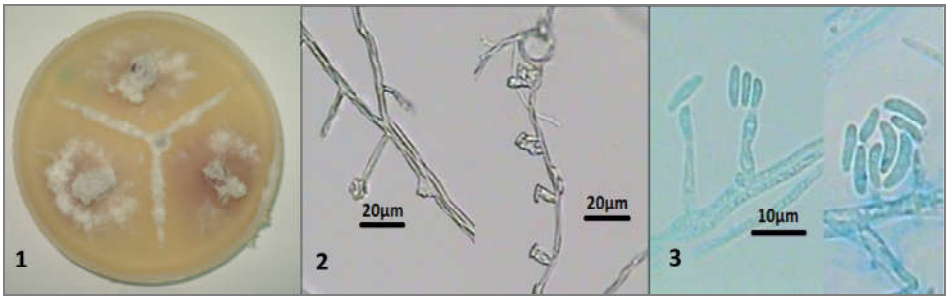


Figure 30. *Fusarium oxysporum* sur : (1) PDA, (2) aspect microscopique sur lame de culture, (3) aspect microscopique entre lame et lamelle: phialides et conidies.

3.2.11. *Penicillium aurantiogriseum*

Colonies sur CYA 32-35mm de diamètre vertes avec des bords blancs, revers pale. Pas de croissance à 37°C et formation de microcolonies de 2-4mm à 5°C. Colonies sur MEA 23-31mm brunes pâles avec des bords blanches verdâtres, revers jaune orangée. Colonies sur G25N de 22-25mm blanches à bords jaunes, revers jaune pâle. Conidiophores 100-300µm de longueur, les phialides 6-10µm de long, les conidies sphériques 3-3.5µm (Figure 31).

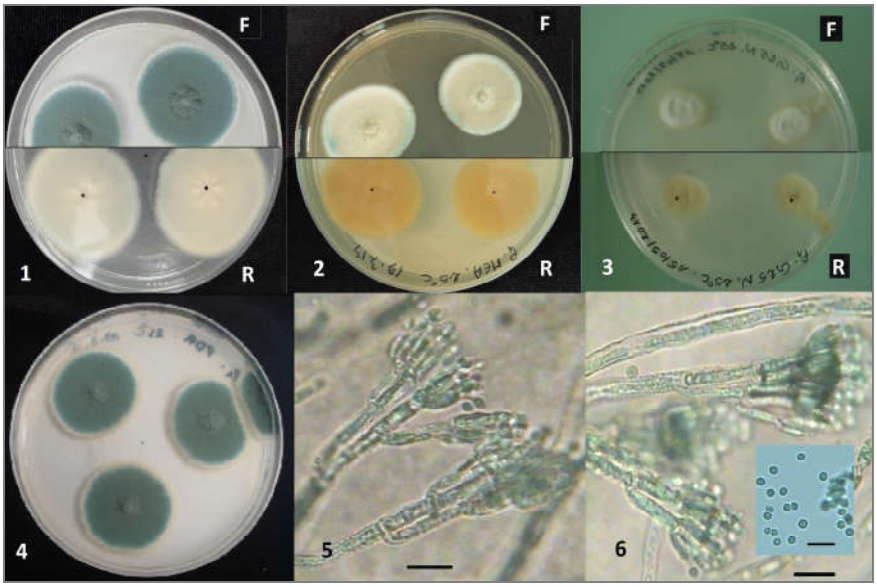


Figure 31. *Penicillium aurantiogriseum* après 7 jours d'incubation à 25°C sur (1) CYA, (2) MEA, (3) G25N, (4) PDA ; (5) et (6) conidiophores et conidies entre lame et lamelle après coloration ; échelle : 10µm. (F= face ; R= revers).

3.2.12. *Penicillium chrysogenum*

Colonies sur CYA 39-44 mm de diamètre vertes et frisées, les bords blancs, présence d'exsudats jaunes, revers jaune frisé. Pas de croissance à 37°C et 5°C. Colonies sur MEA 30-40mm, marron claires avec des bords blancs, revers jaune orangé. Colonies sur G25N 20-24 mm blancs cassée, le revers est blancs pale et frisée. Conidiophores de 200-300µm de long, phialides de 7-8µm et les de conidies lisses de 2.5-4µm de long (Figure 32).

3.2.13. *Penicillium digitatum*

Colonies sur CYA de 35-45 mm de diamètre, grises avec des bords blancs, revers gris claire. Pas de croissance à 5 et 37°C. Colonies sur MEA de 30-35mm, plates, blanches à brunes pâles, revers brun pale. Des microcolonies blanches sur G25N de 4-6mm. Conidiophores lisses de 70-150µm de long, les phialides 10-20µm de long, conidies elliptiques de 6-8µm de long (Figure 33).

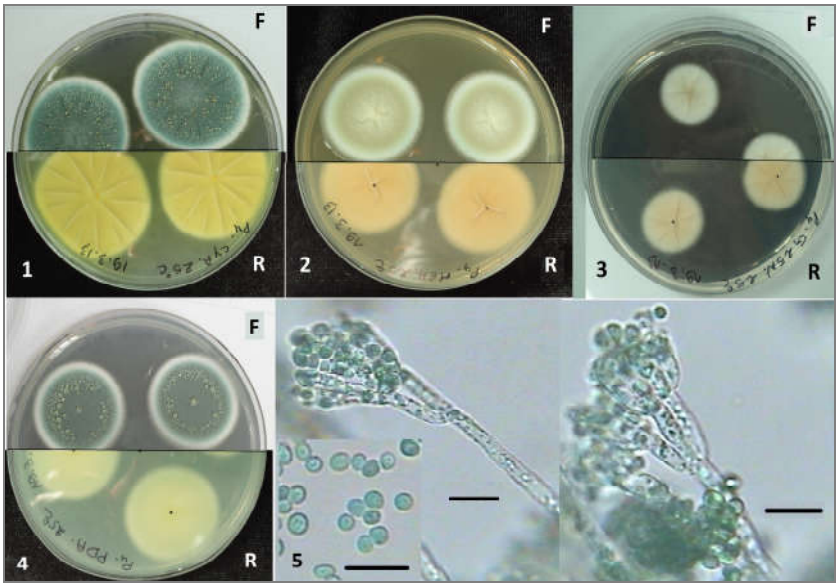


Figure 32. *Penicillium chrysogenum* après 7 jours d'incubation à 25°C sur (1) CYA, (2) MEA, (3) G25N, (4) PDA ; (5) conidiophores et conidies entre lame et lamelle après coloration ; échelle : 10µm. (F= face ; R= revers).

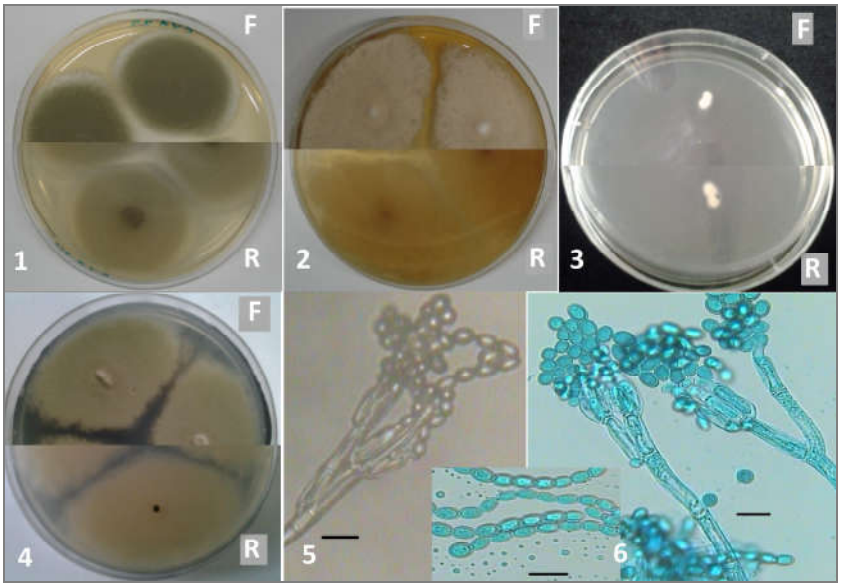


Figure 33. *Penicillium digitatum* après 7 jours d'incubation à 25°C sur (1) CYA, (2) MEA, (3) G25N, (4) PDA ; (5) pénicille sur lame de culture, (6) pénicilles et conidies entre lame et lamelle après coloration ; échelle : 10µm. (F= face ; R= revers).

3.2.14. *Penicillium expansum*

Colonies sur CYA de 36-40mm de diamètre, vert terne granulées, zonées, des bords blancs larges, revers orange pâle, présence d'exsudats transparents. A 5°C de 3-4mm de diamètre. Pas de croissance à 37°C. Colonies sur MEA de 28-33mm, marron claires, granulées, présence d'exsudat orange sur la surface, revers jaune. Colonies sur G25N de 14-18mm, blanches et pâles au centre, revers jaune pâle. Conidiophores de 200-500µm de long, phialides 8-11µm de long, conidies elliptiques lisses 3-3.5µm de long (Figure 34).

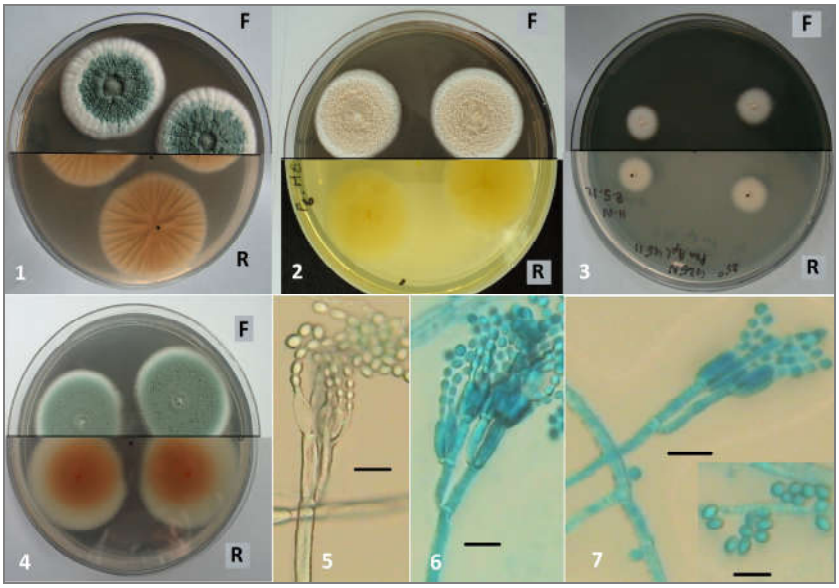


Figure 34. *Penicillium expansum* après 7 jours d'incubation à 25°C sur (1) CYA, (2) MEA, (3) G25N, (4) PDA ; (5) mycélium et tête conidienne sur lame de culture, (6) tête conidienne entre lame et lamelle après coloration, (7) mycélium et conidies ; échelle : 10µm. (F= face ; R= revers).

3.2.15. *Penicillium griseofulvum*

Colonies sur CYA 19-22mm de diamètre vert-grises, revers jaune pâle. A 37°C les colonies atteignent 12-14mm vert-grises avec un changement de couleur du milieu, revers marron foncé. Pas de croissance à 5°C. Colonies sur MEA 17-20 mm, jaune pâles, revers jaune orangé. Colonies sur G25N de 8-10mm vert claires, jaunes au centre, revers jaune. Conidiophores lisses ou très finement granuleux, conidies 3-3.5µm de long, phialides 8-12 x2.5-3.5µm (Figure 35).

3.2.16. *Penicillium italicum*

Colonies sur de CYA 35-45mm de diamètre, plates, veloutées à granulées, vertes avec des bords blancs, revers marron pâle. Pas de croissance à 37°C. A 5°C des microcolonies de 3-4 mm de diam. Colonies sur MEA 30-40 mm de diam, plate frisées au centre, brunes pâles, revers jaune pâle. Colonies sur G25N 10-15mm, blanches, revers pâle. Conidiophores 200-400µm de longueur, phialides 10-14µm de longueur, conidies elliptiques lisses de 3-5µm de long (Figure 36).

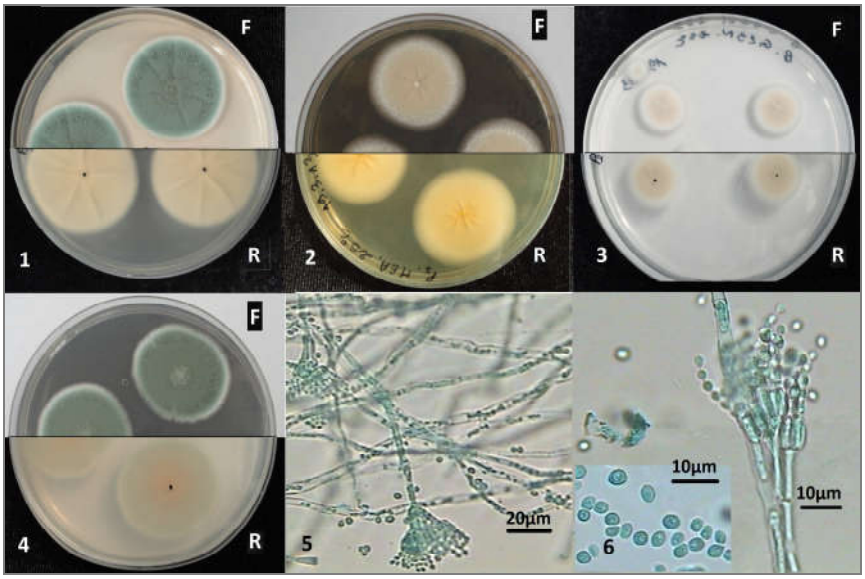


Figure 35. *Penicillium griseofulvum* après 7 jours d'incubation à 25°C sur (1) CYA, (2) MEA, (3) G25N, (4) PDA ; (5) et (6) conidiophores et conidies entre lame et lamelle après coloration. (F= face ; R= revers).

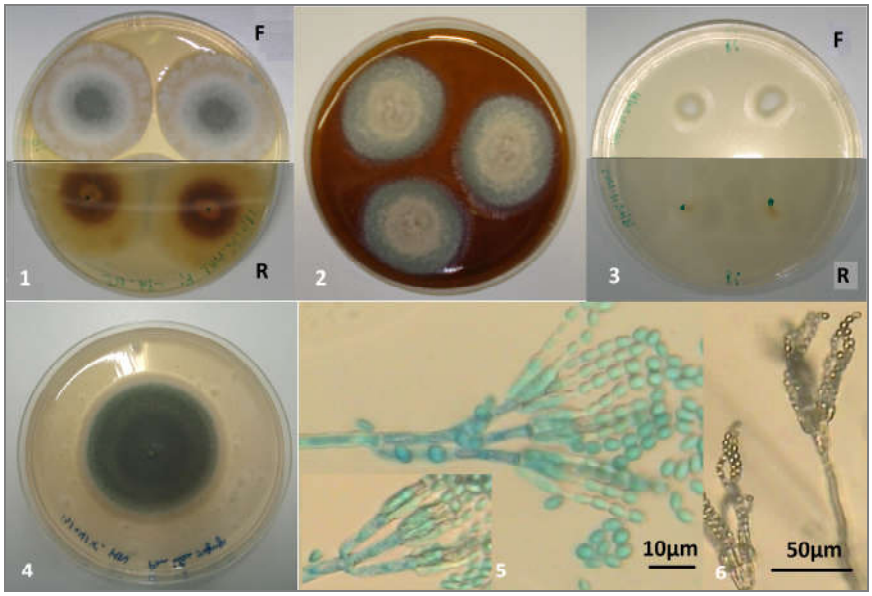


Figure 36. *Penicillium italicum* après 7 jours d'incubation à 25°C sur (1) CYA, (2) MEA, (3) G25N, (4) PDA ; (5) pénicille et conidies entre lame et lamelle après coloration, (6) pénicille sur lame de culture. (F= face ; R= revers).

3.3. Tests d'activité antifongique

L'activité antifongique des plantes étudiées a été évaluée par le test de la plante sous forme de poudre incorporée au milieu de culture, le test de leurs HEs par fumigation et incorporation au milieu de culture, et le test de leurs EMs par puits de diffusion en milieu solide. La croissance radiale de chaque champignon soumis à l'effet de concentrations progressives des HEs a été mesurée quotidiennement et comparée à celle du témoin. Le pourcentage d'inhibition est calculé au 7^{ième} jour pour toutes les techniques appliquées.

3.3.1. Effet antifongique sur chaque champignon

3.3.1.1. *Alternaria alternata* (f)

L'HE de *R. officinalis* appliquée par fumigation avait un effet faible sur la croissance du champignon (Figure 37A) ne dépassant pas 15%, alors que son incorporation au milieu de culture provoque une inhibition totale de 2 à 3 jours avec une valeur atteignant 85% au 7^{ième} jour (Figure 37C). L'HE de *T. ciliatus* a retardé la croissance du champignon jusqu'à 4 jours (Figure 37B) avec une inhibition de 76% à la fin de la durée d'incubation lors de son application par fumigation, et avait un effet moins efficace de 35% après incorporation (Figure 37D). La poudre de *R. officinalis* était la plus efficace par effet atteignant 85% par rapport à celle de *T. ciliatus* (26%). L'EM était le moins efficace et généralement ne présente pas de différence significative ($P<0.05$) avec les concentrations moyennes des HEs (Figure 37E).

3.3.1.2. *Alternaria alternata* (g)

Les HEs des deux plantes appliquées par fumigation ont totalement inhibé la croissance d'*A. alternata* isolé de la grenade pendant 4 jours et atteignant les valeurs de 81 et 89% pour le romarin et le thym respectivement à la fin de la période d'incubation avec des différences non significatives entre les concentrations supérieures et celles moyennes (Figure 38A, B et E). L'HE du romarin incorporée au milieu de culture était très faible (15%) si comparée avec celle du thym qui empêchait la croissance du champignon pendant 5 jours et a atteint 93% au 7^{ième} jour. La poudre du romarin inhibait à 34% la croissance du champignon et est significativement différente de l'EM (23%) (Figure 38C, D et E). Les valeurs de l'inhibition exercée par la poudre et l'EM de *T. ciliatus* n'étaient pas significativement différentes (autours de 20%).

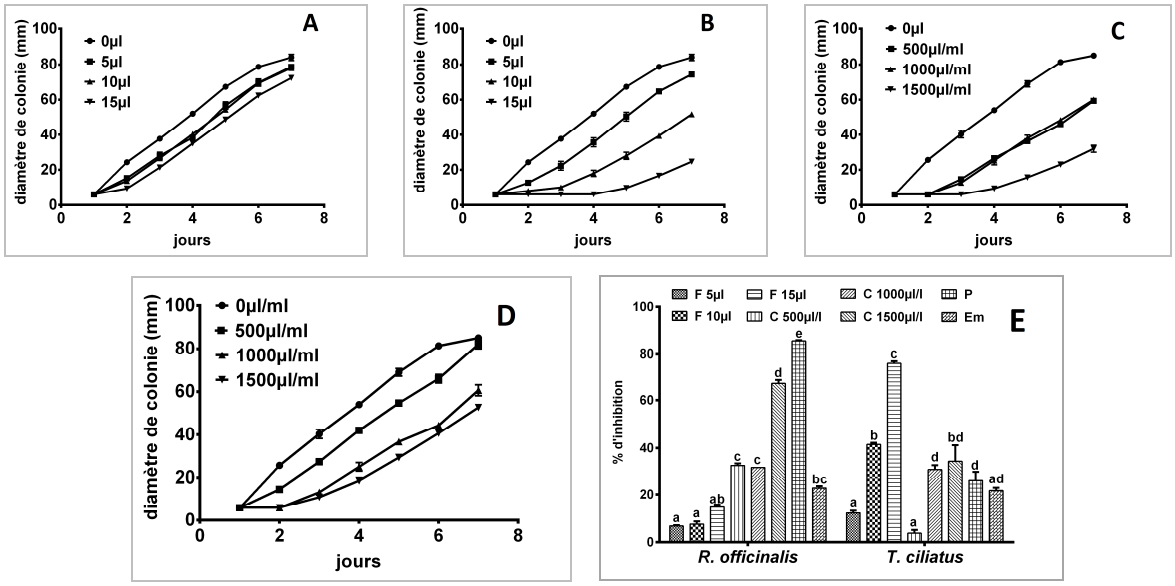


Figure 37. Croissance du champignon *A. alternata* (f) sur PDA sous l'effet des HEs, des EMs et de la poudre des plantes *R. officinalis* et *T. ciliatus* ; effet par fumigation **(A) (B)**, par contact direct **(C) (D)** des HEs de *R. officinalis* et *T. ciliatus* respectivement ; **(E)** Inhibition de de la croissance du champignon au 7ième jour par : fumigation -F- de 5, 10, 15µl ; incorporation -C- de 500,1000,1500µl/l des HEs ; de la plante en poudre -P- et de l'extrait méthanolique -Em- : Les données sont présentées sous forme de moyenne ± SEM chacune (n = 3). Pas de différence significative entre les barres de chaque plante ayant la même lettre ($p \leq 0.05$), selon le test de comparaisons multiples de Tukey.

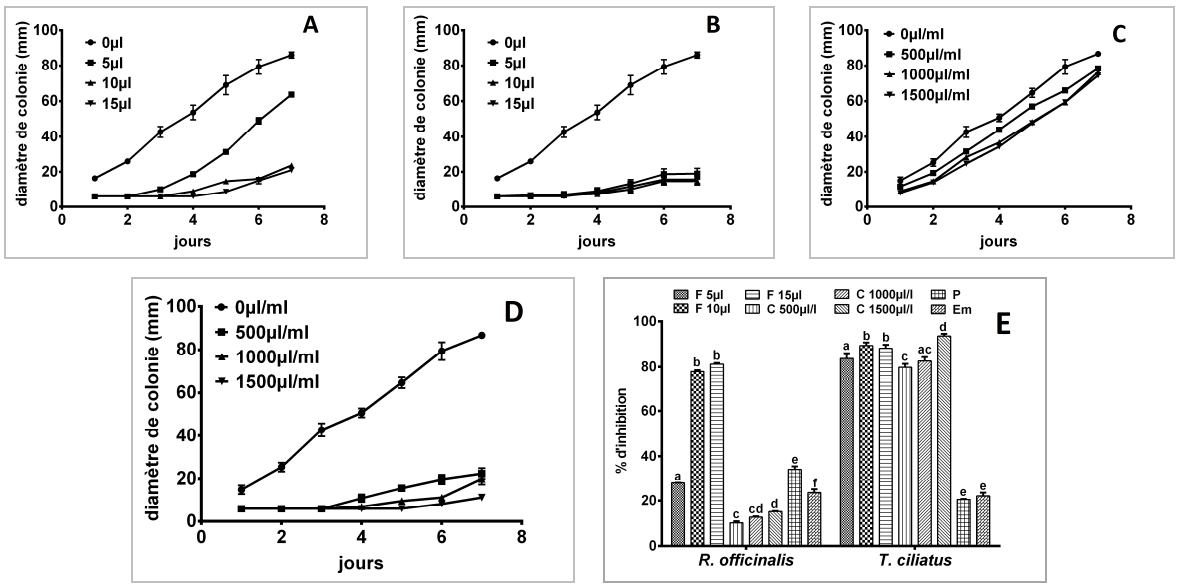


Figure 38. Croissance du champignon *A. alternata* (g) sur PDA sous l'effet des HEs, des EMs et de la poudre des plantes *R. officinalis* et *T. ciliatus* ; effet par fumigation **(A) (B)**, par contact direct **(C) (D)** des HEs de *R. officinalis* et *T. ciliatus* respectivement ; **(E)** Inhibition de de la croissance du champignon au 7ième jour par : fumigation -F- de 5, 10, 15µl ; incorporation -C- de 500,1000,1500µl/l des HEs ; de la plante en poudre -P- et de l'extrait méthanolique -Em- : Les données sont présentées sous forme de moyenne ± SEM chacune (n = 3). Pas de différence significative entre les barres de chaque plante ayant la même lettre ($p \leq 0.05$), selon le test de comparaisons multiples de Tukey.

3.3.1.3. *Aspergillus flavus*

La croissance d'*A.flavus* a été complètement empêchée pendant 3 jours puis était très lente sous l'effet des HEs par fumigation avec une différence non significative entre les concentrations moyennes et supérieures (Figure 39A, B et E). L'HE de *T. ciliatus* était plus efficace par incorporation et inhibait totalement la croissance du champignon, celle du romarin était faible (Figure 39C, D et E). L'EM était faible (18 et 7%) par rapport à la poudre (35 et 45% pour le romarin et le thym respectivement). L'inhibition par les HEs atteignait 77 à 94% après 7 jours d'incubation (Figure 39E).

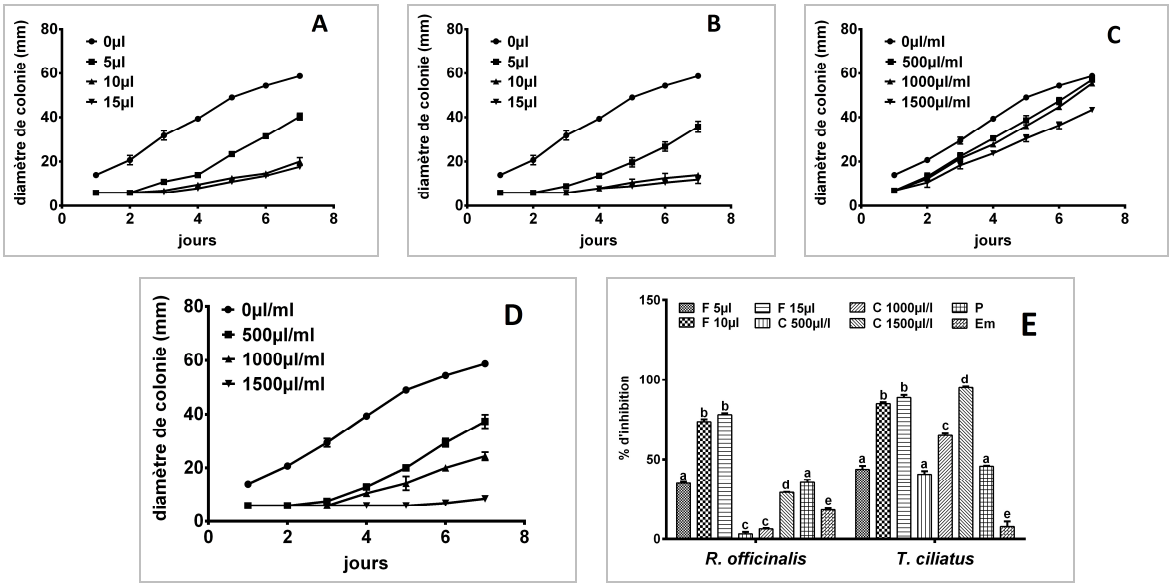


Figure 39. Croissance du champignon *A. flavus* (type sauvage) sur PDA sous l'effet des HEs, des EMs et de la poudre des plantes *R. officinalis* et *T. ciliatus* ; effet par fumigation **(A) (B)**, par contact direct **(C) (D)** des HEs de *R. officinalis* et *T. ciliatus* respectivement ; **(E)** Inhibition de de la croissance du champignon au 7ième jour par : fumigation -F- de 5, 10, 15µl ; incorporation -C- de 500,1000,1500µl/l des HEs ; de la plante en poudre -P- et de l'extrait méthanolique -Em- : Les données sont présentées sous forme de moyenne ± SEM chacune (n = 3). Pas de différence significative entre les barres de chaque plante ayant la même lettre ($p \leq 0.05$), selon le test de comparaisons multiples de Tukey.

3.3.1.4. *Aspergillus flavus* NRLL3251

La technique de fumigation a montré que l'HE de *T. ciliatus* est plus efficace (50% d'inhibition avec retardement de 3 jours) que celle du romarin (26%). Le contraire est observé pour la technique d'incorporation ; le romarin retardait la croissance de 3 jours avec 60% d'inhibition à la fin du 7ième jour par rapport au thym (20%). La poudre du romarin parait considérablement inhibitrice. L'action de l'EM était aux environs de 20% d'inhibition ne présentait pas de différence significative des concentrations minimales et moyennes appliquées par incorporation (Figure 40).

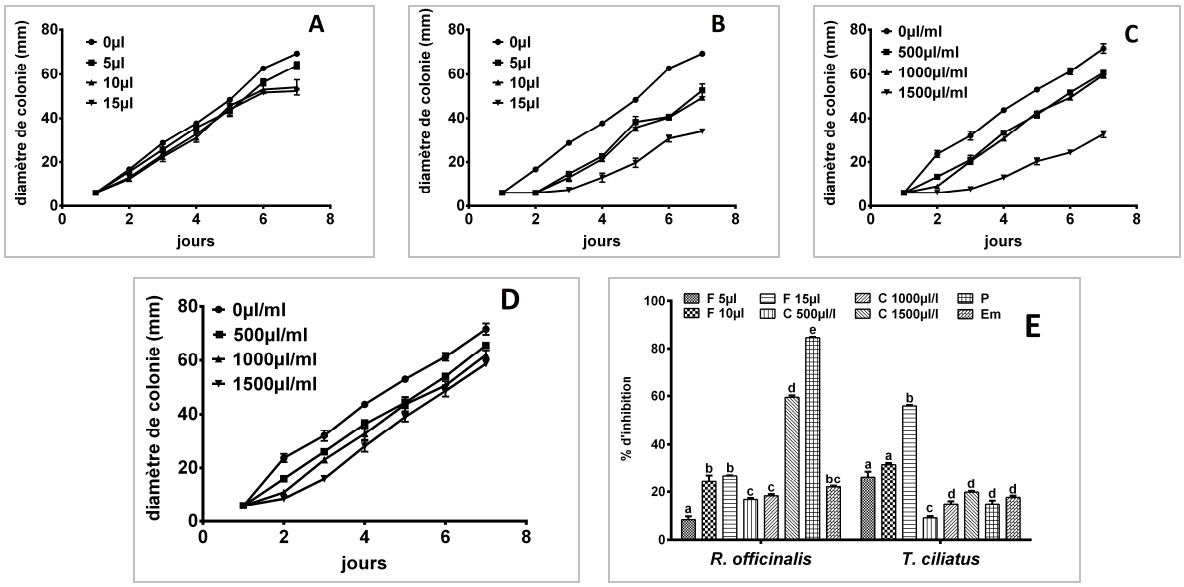


Figure 40. Croissance du champignon *A. flavus* NRLL3251 sur PDA sous l'effet des HEs, des EMs et de la poudre des plantes *R. officinalis* et *T. ciliatus* ; effet par fumigation **(A) (B)**, par contact direct **(C) (D)** des HEs de *R. officinalis* et *T. ciliatus* respectivement ; **(E)** Inhibition de de la croissance du champignon au 7ième jour par : fumigation -F- de 5, 10, 15µl ; incorporation -C- de 500,1000,1500µl/l des HEs ; de la plante en poudre -P- et de l'extrait méthanolique -Em- : Les données sont présentées sous forme de moyenne ± SEM chacune (n = 3). Pas de différence significative entre les barres de chaque plante ayant la même lettre ($p \leq 0.05$), selon le test de comparaisons multiples de Tukey.

3.3.1.5. *A. glaucus* (*Eurotium herbariorum*)

L'HE de *T. ciliatus* a complètement inhibé la croissance d'*A. glaucus* pendant toute la période d'incubation. L'HE du romarin diminue considérablement la croissance avec inhibition totale par fumigation de la concentration supérieure. Les valeurs d'inhibition sont très proches entre les deux plantes pour la poudre et l'EM (Figure 41).

3.3.1.6. *Aspergillus nidulans* (*Emericella nidulans*)

Les deux HEs inhibaient ce champignon de 2 à 3 jours avec une activité de romarin légèrement supérieure à celle du thym ; l'incorporation parait plus intéressante donnant une inhibition atteignant 66% (Figure 42A, B, C et D). L'activité de la poudre du romarin parait importante (45%) par rapport à celle du thym (21%). Les EMs diminuaient la croissance du champignon par 12-13% (Figure 42E).

3.3.1.7. *Aspergillus niger*

La poudre du romarin a été plus efficace (86% inhibition) par rapport aux autres extraits dont l'EM était de faible (*T. ciliatus*) à null (*R. officinalis*) (Figure 43E). Les concentrations supérieures des HEs retardaient la croissance pour 2 à 3 jours et atteignaient 26 et 42% par fumigation, et 46 et 32% par incorporation pour le romarin et le thym respectivement (Figure 43A, B, C et D).

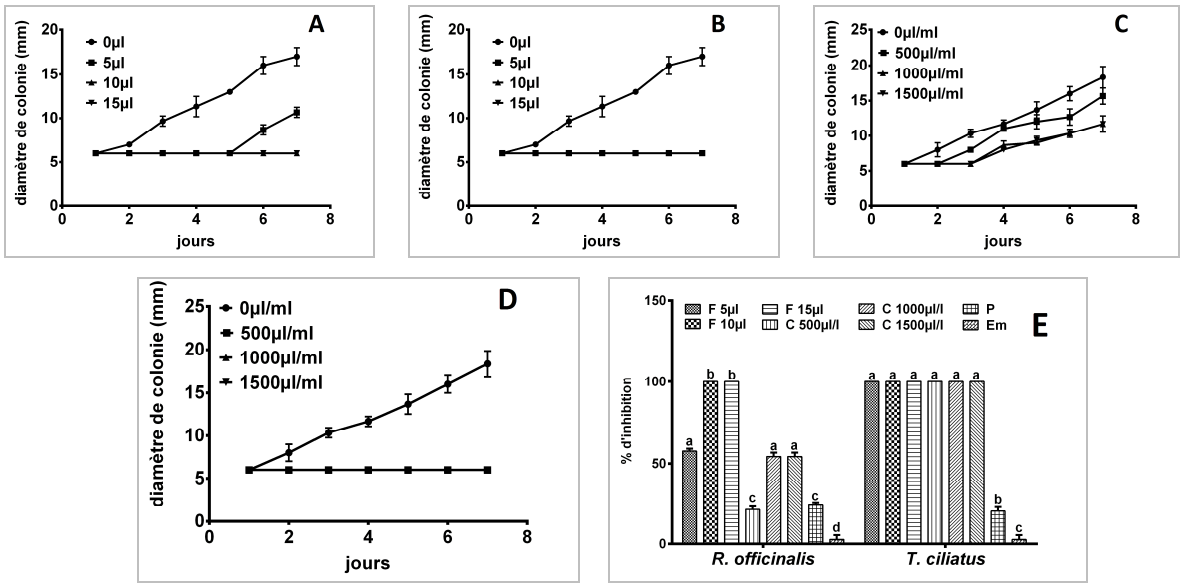


Figure 41. Croissance du champignon *A. glaucus* (*Eurotium herbariorum*) sur PDA sous l'effet des HEs, des EMs et de la poudre des plantes *R. officinalis* et *T. ciliatus* ; effet par fumigation **(A) (B)**, par contact direct **(C) (D)** des HEs de *R. officinalis* et *T. ciliatus* respectivement ; **(E)** Inhibition de de la croissance du champignon au 7ième jour par : fumigation -F- de 5, 10, 15µl ; incorporation -C- de 500,1000,1500µl/l des HEs ; de la plante en poudre -P- et de l'extrait méthanolique -Em- : Les données sont présentées sous forme de moyenne ± SEM chacune (n = 3). Pas de différence significative entre les barres de chaque plante ayant la même lettre ($p \leq 0.05$), selon le test de comparaisons multiples de Tukey.

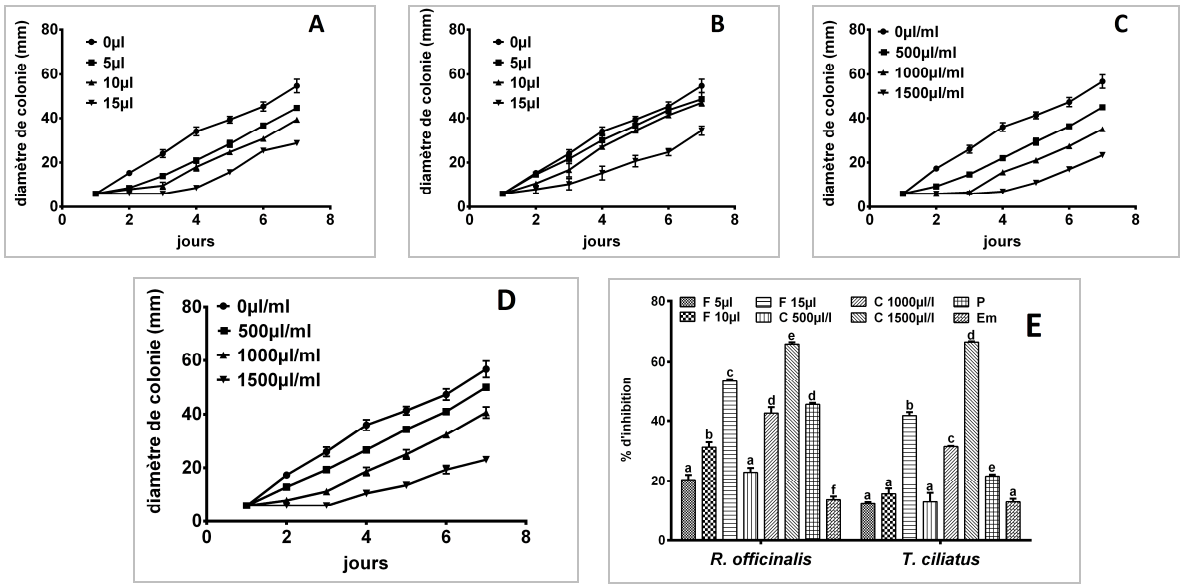


Figure 42. Croissance du champignon *A. nidulans* (*Emericella nidulans*) sur PDA sous l'effet des HEs, des EMs et de la poudre des plantes *R. officinalis* et *T. ciliatus* ; effet par fumigation **(A) (B)**, par contact direct **(C) (D)** des HEs de *R. officinalis* et *T. ciliatus* respectivement ; **(E)** Inhibition de de la croissance du champignon au 7ième jour par : fumigation -F- de 5, 10, 15µl ; incorporation -C- de 500,1000,1500µl/l des HEs ; de la plante en poudre -P- et de l'extrait méthanolique -Em- : Les données sont présentées sous forme de moyenne ± SEM chacune (n = 3). Pas de différence significative entre les barres de chaque plante ayant la même lettre ($p \leq 0.05$), selon le test de comparaisons multiples de Tukey.

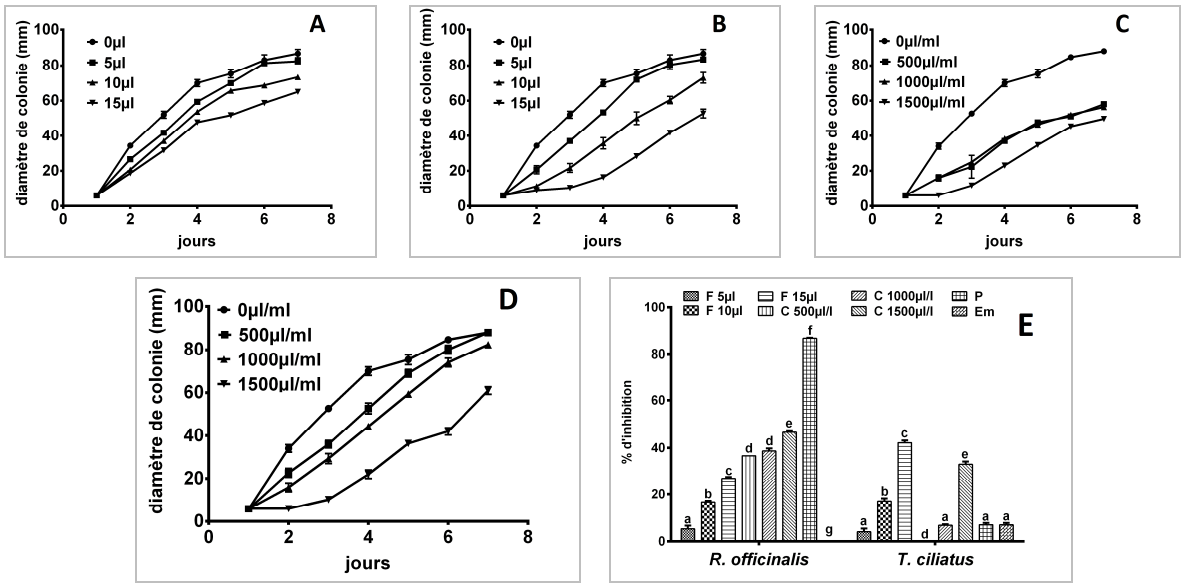


Figure 43. Croissance du champignon *A. niger* sur PDA sous l'effet des HEs, des EMs et de la poudre des plantes *R. officinalis* et *T. ciliatus* ; effet par fumigation **(A) (B)**, par contact direct **(C) (D)** des HEs de *R. officinalis* et *T. ciliatus* respectivement ; **(E)** Inhibition de de la croissance du champignon au 7ième jour par : fumigation -F- de 5, 10, 15µl ; incorporation -C- de 500,1000,1500µl/l des HEs ; de la plante en poudre -P- et de l'extrait méthanolique -Em- : Les données sont présentées sous forme de moyenne ± SEM chacune (n = 3). Pas de différence significative entre les barres de chaque plante ayant la même lettre ($p \leq 0.05$), selon le test de comparaisons multiples de Tukey.

3.3.1.8. *Aspergillus niger* ATCC16404

La concentration supérieure fumigée de l'HE de *T. ciliatus* a présenté une activité très importante par inhibition totale du champignon pendant 5 jours et 85% à la fin de l'incubation. Les HEs incorporées au milieu ralentissaient l'allure de la croissance pour donner des valeurs d'inhibition de 54 et 45% pour le romarin et le thym respectivement (Figure 44A, B, C et D). Les poudres et les EMs étaient moins efficaces ; l'EM du romarin était inactif (Figure 44E).

3.3.1.9. *Aspergillus ochraceus* ATCC 28947

Le retardement de la croissance du champignon a été observé sous l'effet des HEs appliquées par les deux méthodes et surtout L'HE de *T. ciliatus* qui inhibait la croissance de 3 à 4 jours par rapport à celle de *R. officinalis* (2 à 3 jours) (Figure 45A, B, C et D) ; l'inhibition atteignait un maximum de 63 à 75% à la fin de l'incubation pour le romarin et le thym respectivement. L'effet de la poudre du romarin était plus important que celui du thym. L'EM provoquait une inhibition ne dépassant pas 21% (Figure 45E).

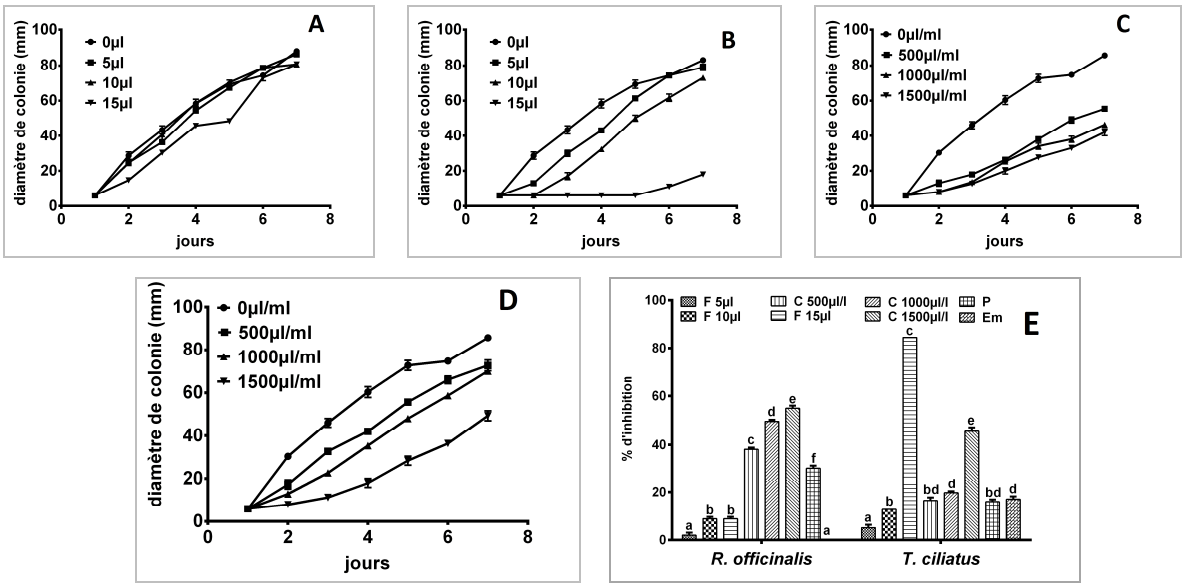


Figure 44. Croissance du champignon *A. niger* ATCC16404 sur PDA sous l'effet des HEs, des EMs et de la poudre des plantes *R. officinalis* et *T. ciliatus* ; effet par fumigation **(A) (B)**, par contact direct **(C) (D)** des HEs de *R. officinalis* et *T. ciliatus* respectivement ; **(E)** Inhibition de de la croissance du champignon au 7ième jour par : fumigation -F- de 5, 10, 15µl ; incorporation -C- de 500,1000,1500µl/l des HEs ; de la plante en poudre -P- et de l'extrait méthanolique -Em- : Les données sont présentées sous forme de moyenne ± SEM chacune (n = 3). Pas de différence significative entre les barres de chaque plante ayant la même lettre ($p \leq 0.05$), selon le test de comparaisons multiples de Tukey.

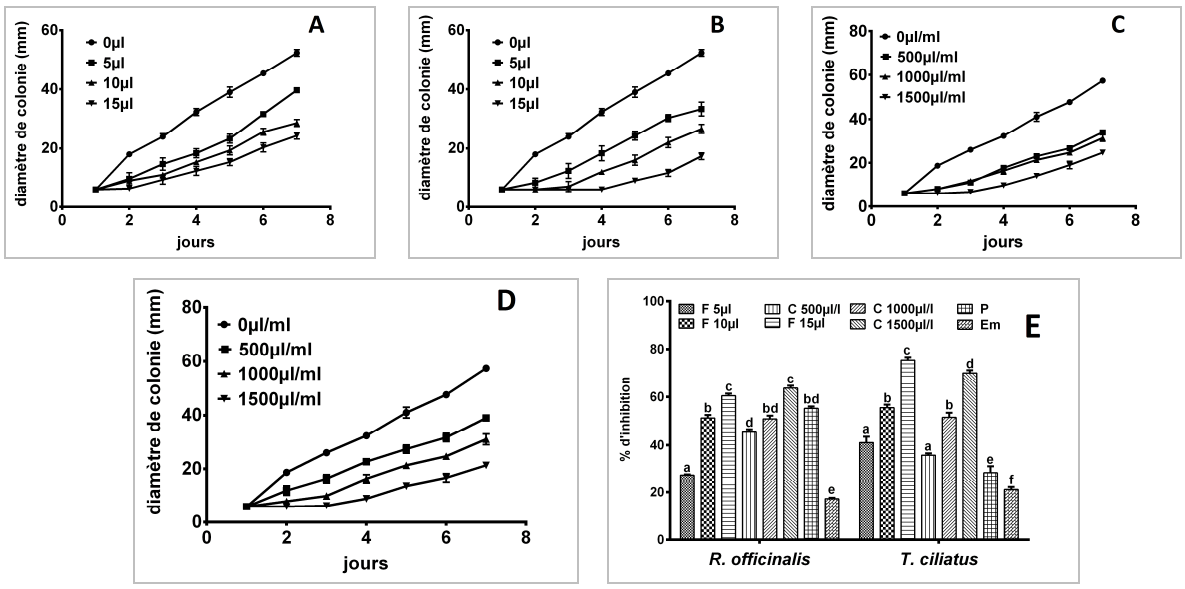


Figure 45. Croissance du champignon *A. ochraceus* ATCC 28947 sur PDA sous l'effet des HEs, des EMs et de la poudre des plantes *R. officinalis* et *T. ciliatus* ; effet par fumigation **(A) (B)**, par contact direct **(C) (D)** des HEs de *R. officinalis* et *T. ciliatus* respectivement ; **(E)** Inhibition de de la croissance du champignon au 7ième jour par : fumigation -F- de 5, 10, 15µl ; incorporation -C- de 500,1000,1500µl/l des HEs ; de la plante en poudre -P- et de l'extrait méthanolique -Em- : Les données sont présentées sous forme de moyenne ± SEM chacune (n = 3). Pas de différence significative entre les barres de chaque plante ayant la même lettre ($p \leq 0.05$), selon le test de comparaisons multiples de Tukey.

3.3.1.10. *Aspergillus parasiticus*

La concentration supérieure fumigée de l'HE de *T. ciliatus* a présenté une activité très importante par inhibition totale du champignon pendant 4 jours et 89% à la fin de l'incubation. Les concentrations maximales du romarin ne présentaient pas de différence significative ($P<0.05$) entre les deux méthodes et l'inhibition atteignait son maximum de 49%. La poudre du romarin présentait une inhibition de 38% et les EMs atteignaient un maximum autour de 20% (Figure 46).

3.3.1.11. *Aspergillus parasiticus* CBS100926

Les HEs fumigées ont exercé un bon effet inhibiteur sur ce champignon. Par incorporation l'HE de romarin avait un effet faible. Celle de *T. ciliatus* a présentait la plus forte inhibition avec toutes les concentrations appliquées. L'inhibition totale durait de 2 à 5 jours entre les deux techniques. L'inhibition maximale était de 82 et 92% pour le romarin et le thym respectivement (Figure 47A, B, C, D et E). L'effet de la poudre ne dépassait pas 35% pour les deux plantes et l'effet était minimal avec les EMs (Figure 47E).

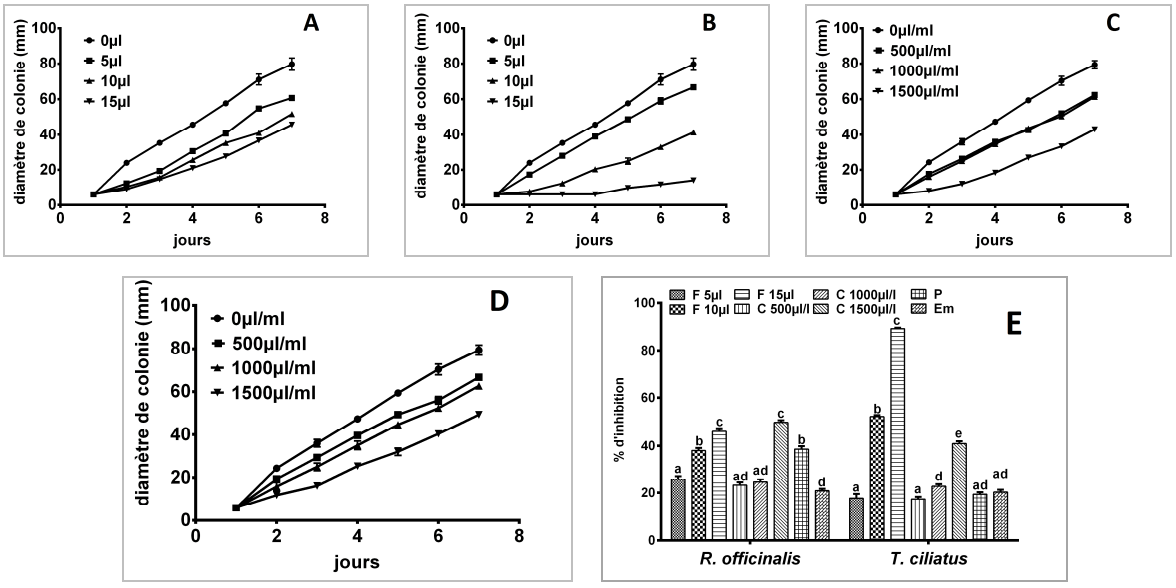


Figure 46. Croissance du champignon *A. parasiticus* sur PDA sous l'effet des HEs, des EMs et de la poudre des plantes *R. officinalis* et *T. ciliatus* ; effet par fumigation **(A) (B)**, par contact direct **(C) (D)** des HEs de *R. officinalis* et *T. ciliatus* respectivement ; **(E)** Inhibition de de la croissance du champignon au 7ième jour par : fumigation -F- de 5, 10, 15µl ; incorporation -C- de 500,1000,1500µl/l des HEs ; de la plante en poudre -P- et de l'extrait méthanolique -Em- : Les données sont présentées sous forme de moyenne ± SEM chacune (n = 3). Pas de différence significative entre les barres de chaque plante ayant la même lettre ($p \leq 0.05$), selon le test de comparaisons multiples de Tukey.

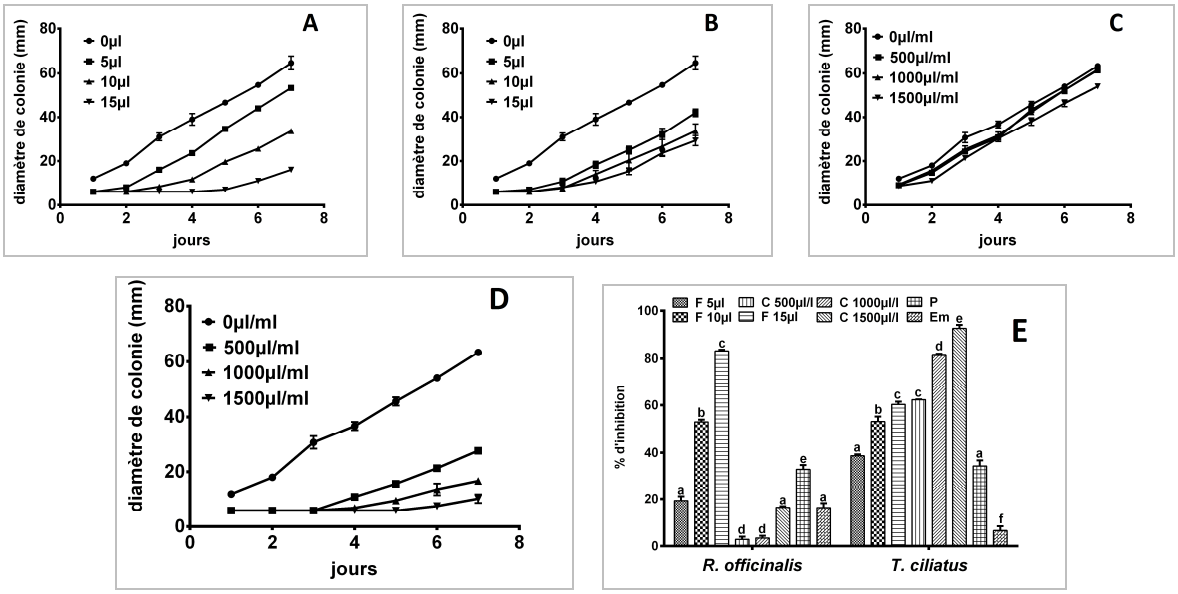


Figure 47. Croissance du champignon *A. parasiticus* CBS100926 sur PDA sous l'effet des HEs, des EMs et de la poudre des plantes *R. officinalis* et *T. ciliatus* ; effet par fumigation **(A) (B)**, par contact direct **(C) (D)** des HEs de *R. officinalis* et *T. ciliatus* respectivement ; **(E)** Inhibition de de la croissance du champignon au 7^{ième} jour par : fumigation -F- de 5, 10, 15µl ; incorporation -C- de 500,1000,1500µl/l des HEs ; de la plante en poudre -P- et de l'extrait méthanolique -Em- : Les données sont présentées sous forme de moyenne ± SEM chacune (n = 3). Pas de différence significative entre les barres de chaque plante ayant la même lettre ($p \leq 0.05$), selon le test de comparaisons multiples de Tukey.

3.3.1.12. *Botrytis aclada*

Toutes les concentrations d'HEs ont inhibé le champignon; le retardement de la croissance est observé de 3 à 5jours voir inhibition de 88% pour le romarin et de 4 jours à l'inhibition totale (100%) pour le thym (Figure 48A, B, C et D). L'action des poudres variait de 54 à 88% pour le thym et le romarin respectivement et les EMs étaient équivalents (Figure 48E).

3.3.1.13. *Botrytis cinerea*

Les concentrations maximales des HEs appliquées par fumigation ont complètement inhibé ce champignon. Seule l'HE de *T. ciliatus* appliquée par incorporation a totalement inhibé le champignon par rapport à celle du romarin qui n'avait présenté pas d'effet inhibiteur (Figure 49A, B, C et D). Les EMs avaient une action atteignant 54 et 46% pour le romarin et le thym respectivement. Les poudres étaient plus faibles (Figure 49E).

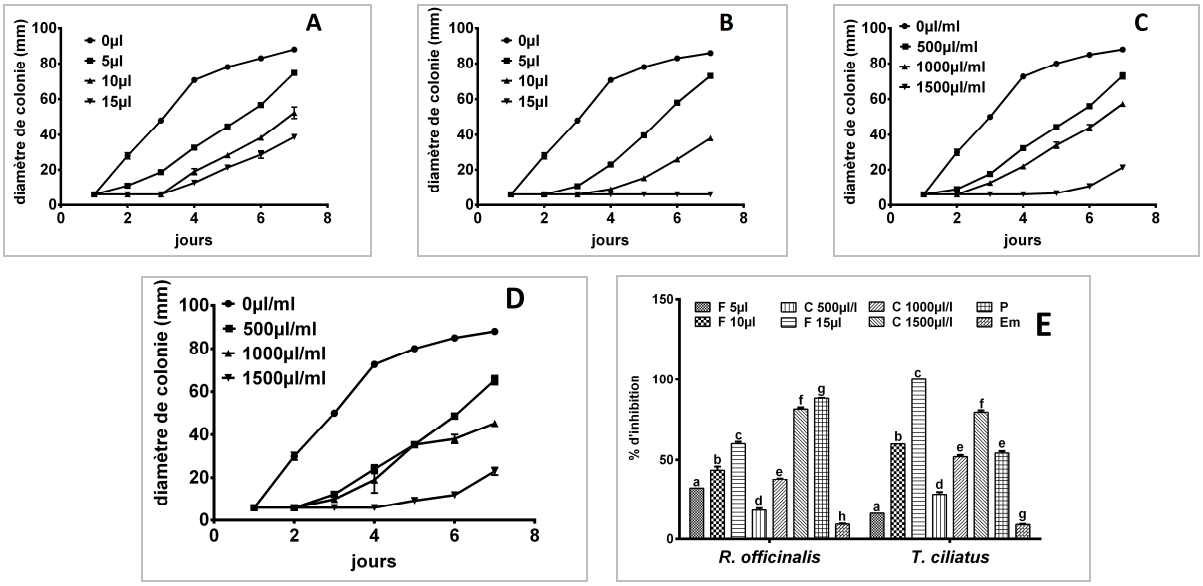


Figure 48. Croissance du champignon *B. aclada* sur PDA sous l'effet des HEs, des EMs et de la poudre des plantes *R. officinalis* et *T. ciliatus* ; effet par fumigation **(A) (B)**, par contact direct **(C) (D)** des HEs de *R. officinalis* et *T. ciliatus* respectivement ; **(E)** Inhibition de de la croissance du champignon au 7ième jour par : fumigation -F- de 5, 10, 15µl ; incorporation -C- de 500,1000,1500µl/l des HEs ; de la plante en poudre -P- et de l'extrait méthanolique -Em- : Les données sont présentées sous forme de moyenne ± SEM chacune (n = 3). Pas de différence significative entre les barres de chaque plante ayant la même lettre ($p \leq 0.05$), selon le test de comparaisons multiples de Tukey.

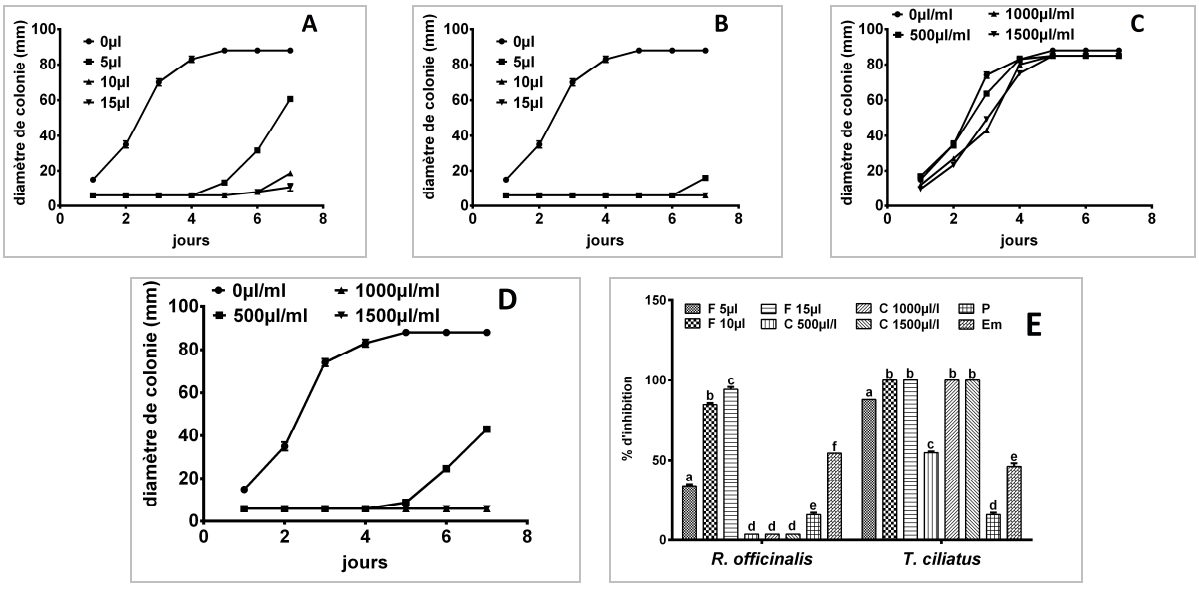


Figure 49. Croissance du champignon *B. cinerea* sur PDA sous l'effet des HEs, des EMs et de la poudre des plantes *R. officinalis* et *T. ciliatus* ; effet par fumigation **(A) (B)**, par contact direct **(C) (D)** des HEs de *R. officinalis* et *T. ciliatus* respectivement ; **(E)** Inhibition de de la croissance du champignon au 7ième jour par : fumigation -F- de 5, 10, 15µl ; incorporation -C- de 500,1000,1500µl/l des HEs ; de la plante en poudre -P- et de l'extrait méthanolique -Em- : Les données sont présentées sous forme de moyenne ± SEM chacune (n = 3). Pas de différence significative entre les barres de chaque plante ayant la même lettre ($p \leq 0.05$), selon le test de comparaisons multiples de Tukey.

3.3.1.14. *Cladosporium herbarum*

L'HE de *T. ciliatus* empêchait la croissance de ce champignon pour 6 jours par fumigation voire inhibition totale par incorporation. L'HE de *R. officinalis* avait son effet important par fumigation (82%) et pas de différences pour les concentrations de l'HE incorporée. Les poudres avaient un effet similaire (29-34%), de même pour les EMs (16-13%) (Figure 50).

3.3.1.15. *Cladosporium sphaerospermum*

Les HEs des deux plantes empêchaient la croissance de ce champignon de 2 à 6jours vers 74 à 79% inhibition à la fin de l'incubation, avec une totale inhibition par l'HE fumigée du romarin. La poudre du romarin atteignait 46%, celle du thym atteignait 24%. Les EMs avaient un effet minimal autour de 18% (Figure 51).

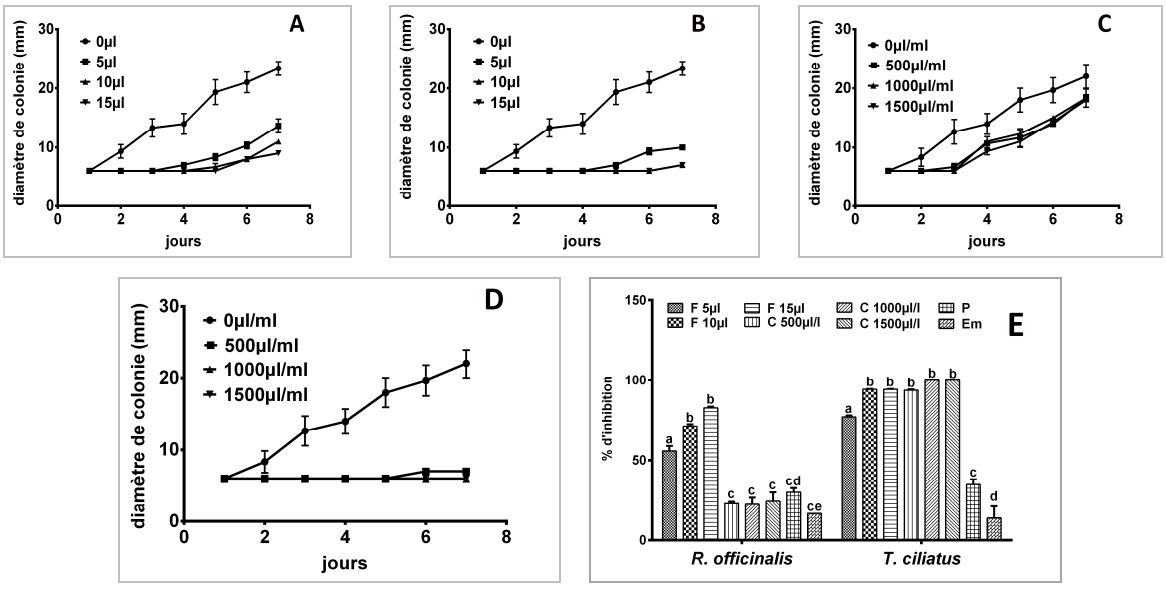


Figure 50. Croissance du champignon *C. herbarum* sur PDA sous l'effet des HEs, des EMs et de la poudre des plantes *R. officinalis* et *T. ciliatus* ; effet par fumigation **(A) (B)**, par contact direct **(C) (D)** des HEs de *R. officinalis* et *T. ciliatus* respectivement ; **(E)** Inhibition de de la croissance du champignon au 7ième jour par : fumigation -F- de 5, 10, 15µl ; incorporation -C- de 500,1000,1500µl/l des HEs ; de la plante en poudre -P- et de l'extrait méthanolique -Em- : Les données sont présentées sous forme de moyenne ± SEM chacune (n = 3). Pas de différence significative entre les barres de chaque plante ayant la même lettre ($p \leq 0.05$), selon le test de comparaisons multiples de Tukey.

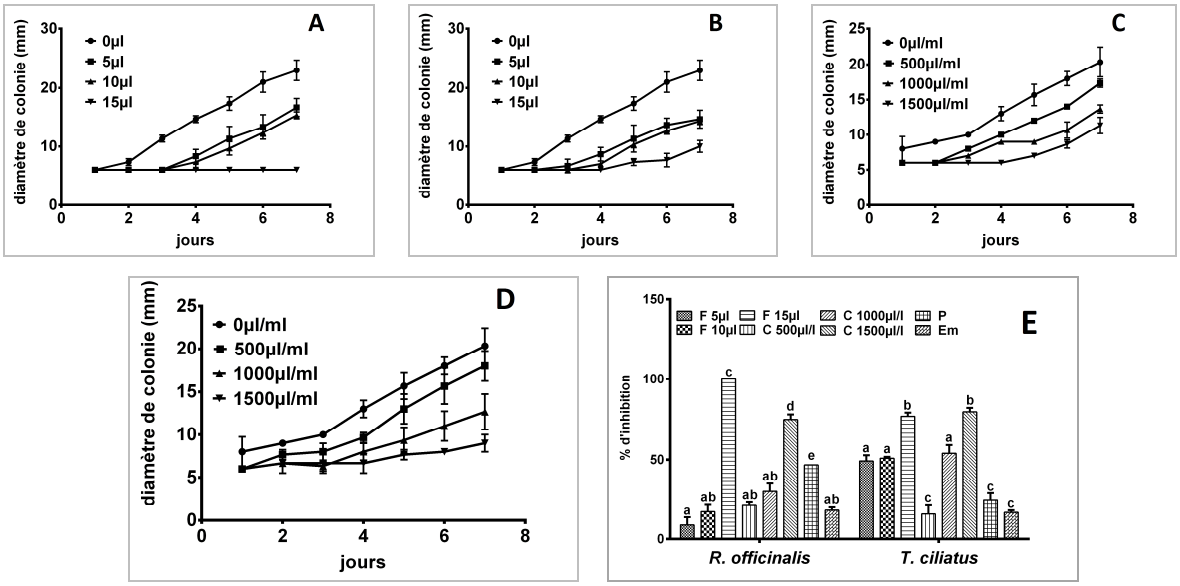


Figure 51. Croissance du champignon *C. sphaerospermum* sur PDA sous l'effet des HEs, des EMs et de la poudre des plantes *R. officinalis* et *T. ciliatus* ; effet par fumigation **(A) (B)**, par contact direct **(C) (D)** des HEs de *R. officinalis* et *T. ciliatus* respectivement ; **(E)** Inhibition de de la croissance du champignon au 7ième jour par : fumigation -F- de 5, 10, 15µl ; incorporation -C- de 500,1000,1500µl/l des HEs ; de la plante en poudre -P- et de l'extrait méthanolique -Em- : Les données sont présentées sous forme de moyenne ± SEM chacune (n = 3). Pas de différence significative entre les barres de chaque plante ayant la même lettre ($p \leq 0.05$), selon le test de comparaisons multiples de Tukey.

3.3.1.16. *Fusarium culmorum*

L'effet inhibiteur des HEs des plantes testées est clairement observé par incorporation, en particulier les concentrations maximales qui empêchaient la croissance du champignon pour 4 jours vers l'inhibition d'environ 80% à la fin de l'incubation. La poudre du romarin inhibait la croissance à 91% par rapport à celle du thym (19%). L'effet de l'EM du thym était faible et celui du romarin était nul (Figure 52).

3.3.1.17. *Fusarium graminearum*

Toutes les concentrations d'HEs ont inhibé le champignon; le retardement de la croissance est observé de 3 à 5jours voir inhibition allant de 77% pour l'HE fumigée du thym, 81% pour l'HE fumigée du romarin à 95% pour l'HE incorporée du thym. L'HE incorporée du romarin avait une action faible (25%) (Figure 53A, B, C et D). L'action des poudres variait de 40 à42% et celle des EMs variait autour de 21% (Figure 53E).

3.3.1.18. *Fusarium moniliforme*

Les d'HEs ont agi à l'image de leur action sur *F. graminiarum*. Leur action variait de 85 à 92%. L'action des poudres variait de 20 à 39% et celle des EMs variait autour de 22% (Figure 54).

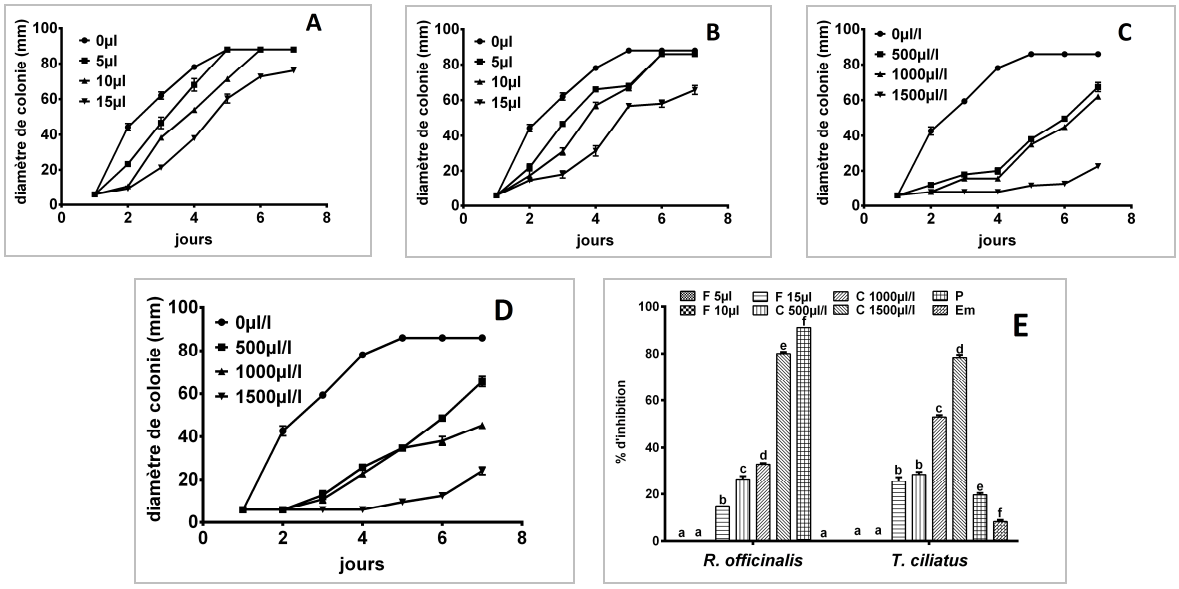


Figure 52. Croissance du champignon *F. culmorum* sur PDA sous l'effet des HEs, des EMs et de la poudre des plantes *R. officinalis* et *T. ciliatus* ; effet par fumigation **(A) (B)**, par contact direct **(C) (D)** des HEs de *R. officinalis* et *T. ciliatus* respectivement ; **(E)** Inhibition de de la croissance du champignon au 7ième jour par : fumigation -F- de 5, 10, 15µl ; incorporation -C- de 500,1000,1500µl/l des HEs ; de la plante en poudre -P- et de l'extrait méthanolique -Em- : Les données sont présentées sous forme de moyenne ± SEM chacune (n = 3). Pas de différence significative entre les barres de chaque plante ayant la même lettre ($p \leq 0.05$), selon le test de comparaisons multiples de Tukey.

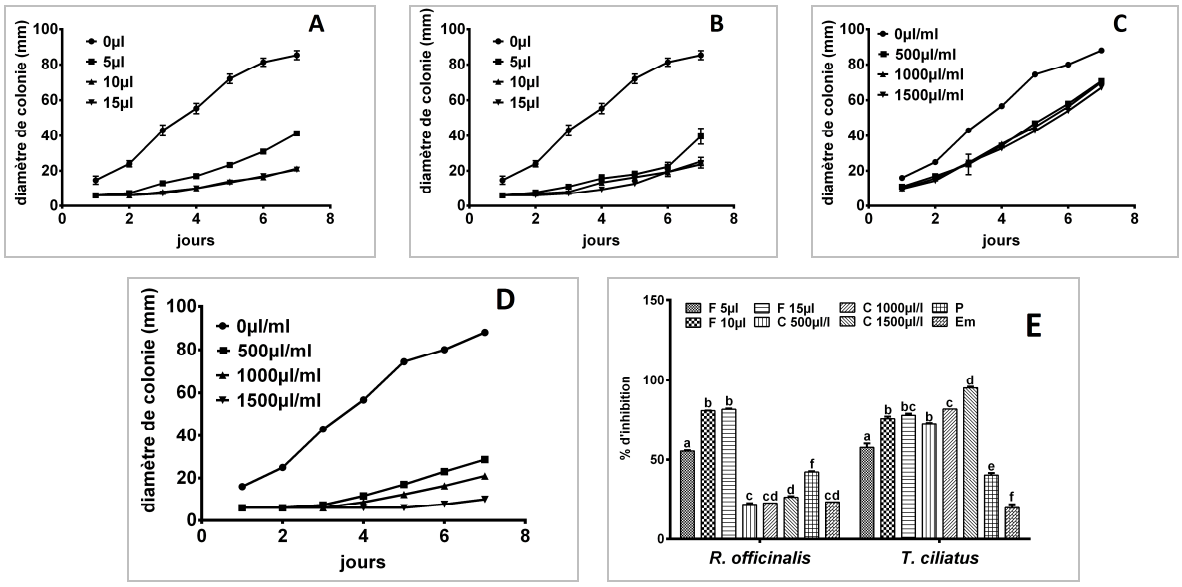


Figure 53. Croissance du champignon *F. graminearum* sur PDA sous l'effet des HEs, des EMs et de la poudre des plantes *R. officinalis* et *T. ciliatus* ; effet par fumigation **(A) (B)**, par contact direct **(C) (D)** des HEs de *R. officinalis* et *T. ciliatus* respectivement ; **(E)** Inhibition de de la croissance du champignon au 7ième jour par : fumigation -F- de 5, 10, 15µl ; incorporation -C- de 500,1000,1500µl/l des HEs ; de la plante en poudre -P- et de l'extrait méthanolique -Em- : Les données sont présentées sous forme de moyenne ± SEM chacune (n = 3). Pas de différence significative entre les barres de chaque plante ayant la même lettre ($p \leq 0.05$), selon le test de comparaisons multiples de Tukey.

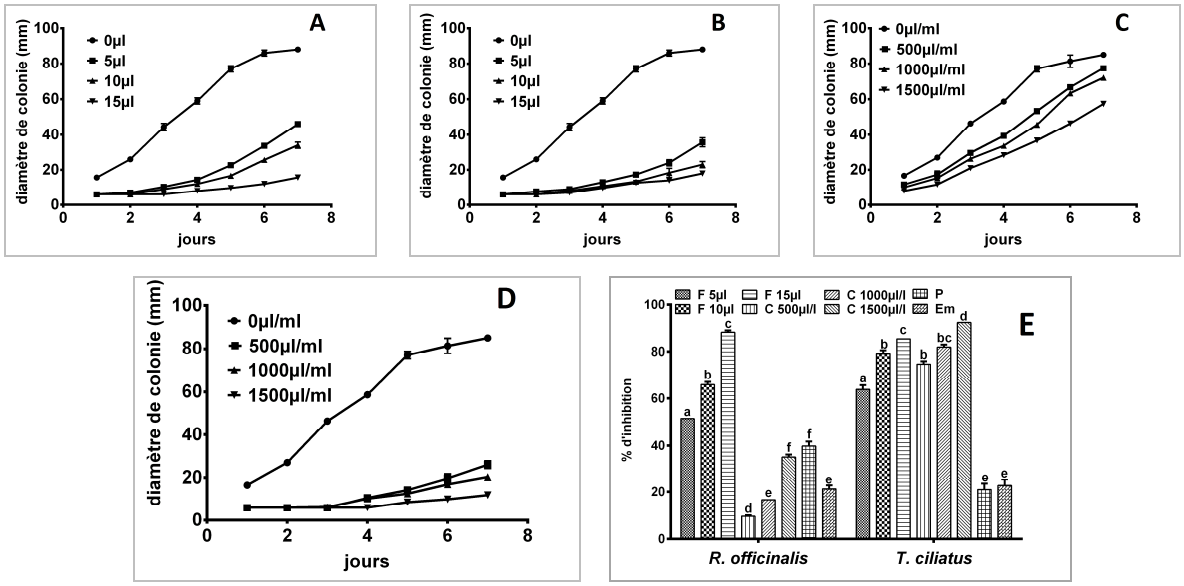


Figure 54. Croissance du champignon *F. moniliforme* sur PDA sous l'effet des HEs, des EMs et de la poudre des plantes *R. officinalis* et *T. ciliatus* ; effet par fumigation **(A) (B)**, par contact direct **(C) (D)** des HEs de *R. officinalis* et *T. ciliatus* respectivement ; **(E)** Inhibition de de la croissance du champignon au 7ième jour par : fumigation -F- de 5, 10, 15µl ; incorporation -C- de 500,1000,1500µl/l des HEs ; de la plante en poudre -P- et de l'extrait méthanolique -Em- : Les données sont présentées sous forme de moyenne ± SEM chacune (n = 3). Pas de différence significative entre les barres de chaque plante ayant la même lettre ($p \leq 0.05$), selon le test de comparaisons multiples de Tukey.

3.3.1.19. *Fusarium oxysporum* isolé de la banane

Les d'HEs ont agi à l'image de leur action sur *F. graminiarum*. Leur action variait de 40 à 81%. L'action des poudres était équivalente entre les deux plantes (36%) et celle des EMs variait de 9 à 13% (Figure 55).

3.3.1.20. *Fusarium oxysporum* (type sauvage)

Les d'HEs ont agi à l'image de leur action sur la souche *F. oxysporum* précédente. Leur action variait de 67 à 88%. L'action des poudres était de 26 à 41% entre les deux plantes (36%) et celle des EMs variait de 15 à 28% (Figure 56).

3.3.1.21. *Fusarium oxysporum* f.sp. *lini*

Toutes les concentrations des HEs appliquées par les deux techniques ont donné une bonne inhibition allant de 24 à 50% pour les concentrations minimales appliquées et de 51% à 80% pour les concentrations supérieures. Les poudres des deux plantes et l'EM du romarin avait un même effet (39%) ; l'EM du thym était de 27% (Figure 57).

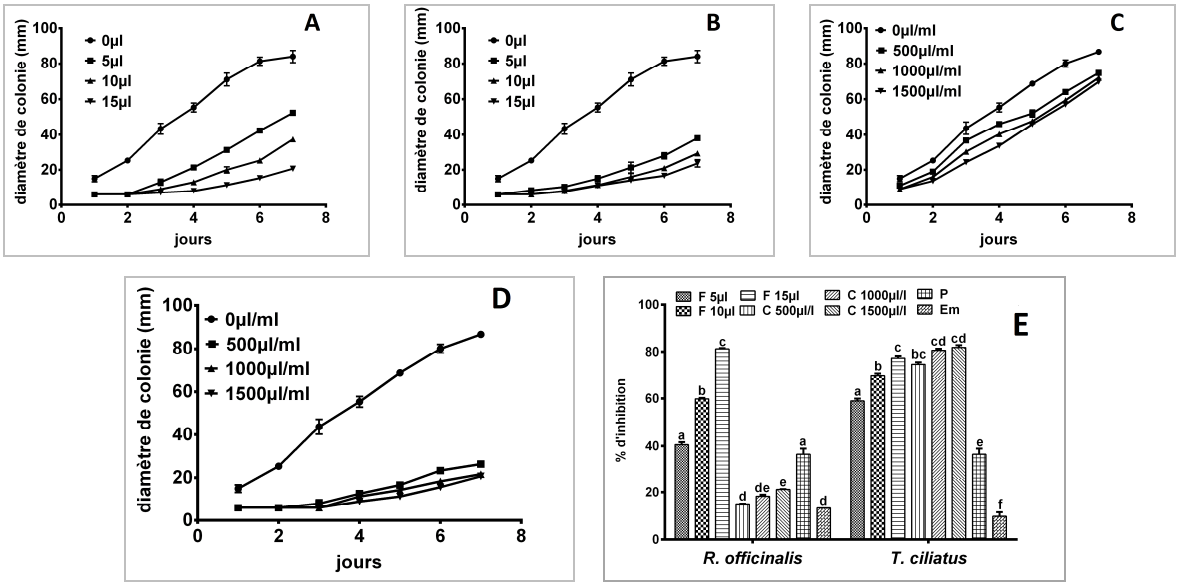


Figure 55. Croissance du champignon *F. oxysporum* (souche isolée de banane) sur PDA sous l'effet des HEs, des EMs et de la poudre des plantes *R. officinalis* et *T. ciliatus* ; effet par fumigation **(A) (B)**, par contact direct **(C) (D)** des HEs de *R. officinalis* et *T. ciliatus* respectivement ; **(E)** Inhibition de de la croissance du champignon au 7^{ième} jour par : fumigation -F- de 5, 10, 15µl ; incorporation -C- de 500,1000,1500µl/l des HEs ; de la plante en poudre -P- et de l'extrait méthanolique -Em- : Les données sont présentées sous forme de moyenne ± SEM chacune (n = 3). Pas de différence significative entre les barres de chaque plante ayant la même lettre ($p \leq 0.05$), selon le test de comparaisons multiples de Tukey.

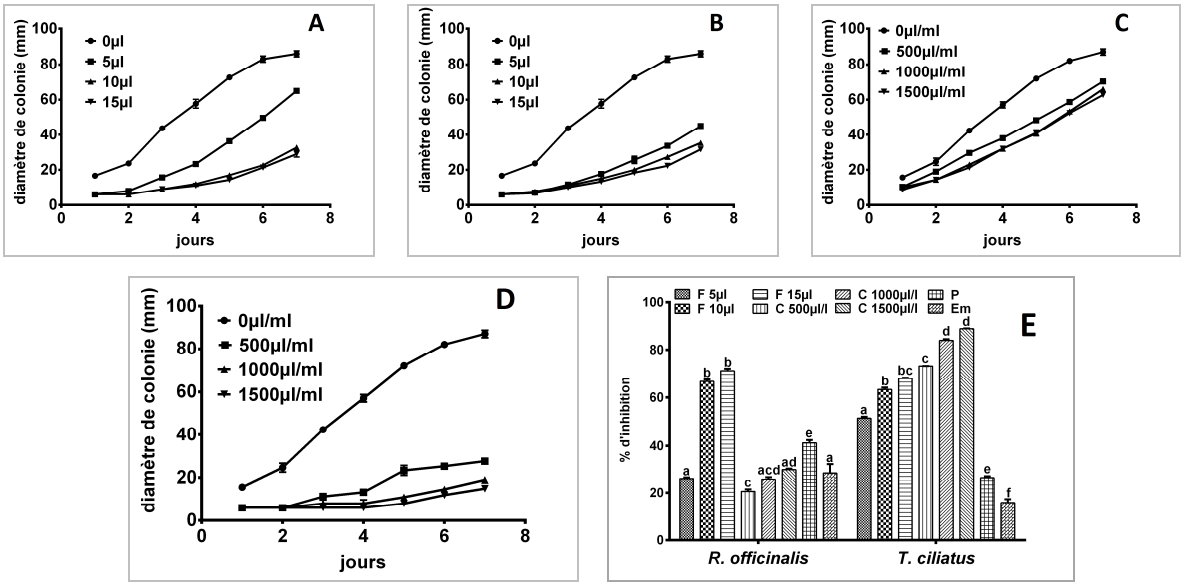


Figure 56. Croissance du champignon *F. oxysporum* (type sauvage) sur PDA sous l'effet des HEs, des EMs et de la poudre des plantes *R. officinalis* et *T. ciliatus* ; effet par fumigation **(A) (B)**, par contact direct **(C) (D)** des HEs de *R. officinalis* et *T. ciliatus* respectivement ; **(E)** Inhibition de de la croissance du champignon au 7^{ième} jour par : fumigation -F- de 5, 10, 15µl ; incorporation -C- de 500,1000,1500µl/l des HEs ; de la plante en poudre -P- et de l'extrait méthanolique -Em- : Les données sont présentées sous forme de moyenne ± SEM chacune (n = 3). Pas de différence significative entre les barres de chaque plante ayant la même lettre ($p \leq 0.05$), selon le test de comparaisons multiples de Tukey.

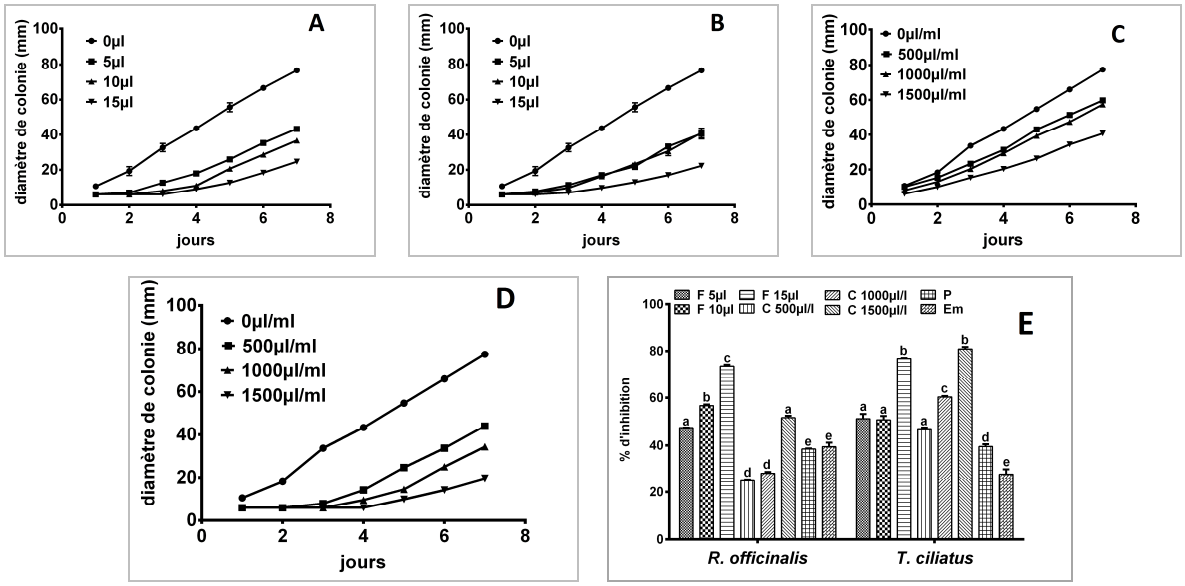


Figure 57. Croissance du champignon *F. oxysporum* f.sp. *lini* sur PDA sous l'effet des HEs, des EMs et de la poudre des plantes *R. officinalis* et *T. ciliatus* ; effet par fumigation **(A) (B)**, par contact direct **(C) (D)** des HEs de *R. officinalis* et *T. ciliatus* respectivement ; **(E)** Inhibition de de la croissance du champignon au 7ième jour par : fumigation -F- de 5, 10, 15µl ; incorporation -C- de 500,1000,1500µl/l des HEs ; de la plante en poudre -P- et de l'extrait méthanolique -Em- : Les données sont présentées sous forme de moyenne ± SEM chacune (n = 3). Pas de différence significative entre les barres de chaque plante ayant la même lettre ($p \leq 0.05$), selon le test de comparaisons multiples de Tukey.

3.3.1.22. *Fusarium proliferatum*

L'HE de *T. ciliatus* a donné un bon effet inhibiteur selon les 2 méthodes appliquées. Celle de *R. officinalis* avait la même action lors de la fumigation mais avait un faible effet par incorporation. Le blocage de la croissance a duré de 2 à 4 jours selon les HEs et les concentrations. Les pourcentages supérieurs d'inhibition variaient de 45% à 90%. Les effets des poudres et des EMs étaient similaires entre les 2 plantes (45 et 20% respectivement) (Figure 58).

3.3.1.23. *Moniliella suaveolens*

Les concentrations supérieures des HEs des 2 plates ont présenté une totale inhibition par incorporation. Par fumigation, l'inhibition totale a duré 3 et 4 jours pour le romarin et thym respectivement et à la fin d'incubation la croissance a été inhibée jusqu'au niveau de 66 et 84% respectivement (Figure 59). La poudre et l'EM du romarin ont présenté le même niveau d'inhibition (46%) ; ceux du thym ont présenté 47 et 24% respectivement (Figure 59E)

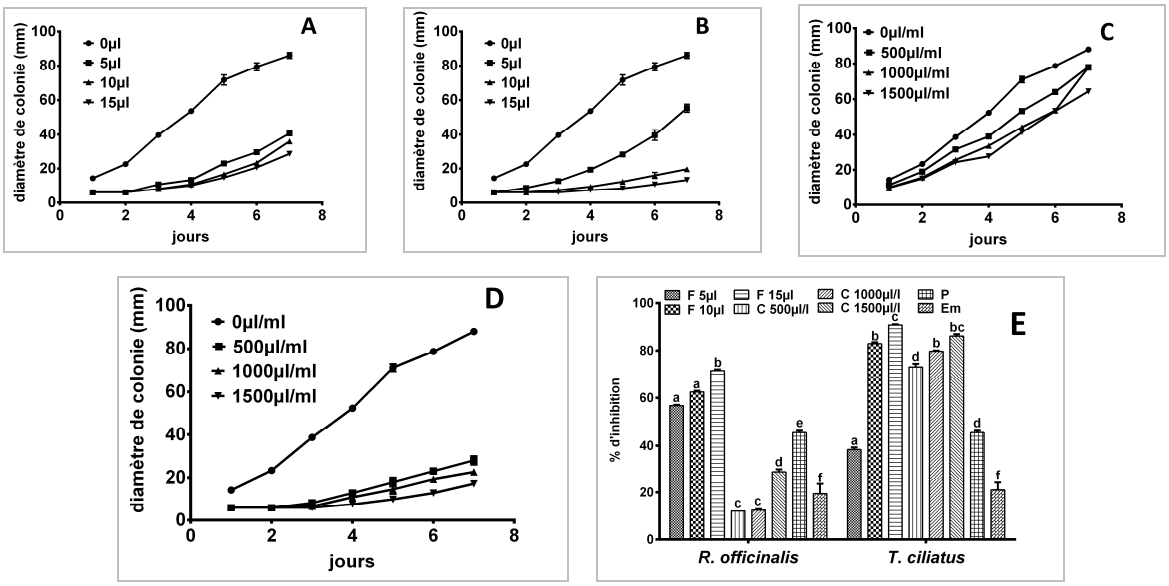


Figure 58. Croissance du champignon *F. proliferatum* sur PDA sous l'effet des HEs, des EMs et de la poudre des plantes *R. officinalis* et *T. ciliatus* ; effet par fumigation **(A) (B)**, par contact direct **(C) (D)** des HEs de *R. officinalis* et *T. ciliatus* respectivement ; **(E)** Inhibition de de la croissance du champignon au 7ième jour par : fumigation -F- de 5, 10, 15µl ; incorporation -C- de 500,1000,1500µl/l des HEs ; de la plante en poudre -P- et de l'extrait méthanolique -Em- : Les données sont présentées sous forme de moyenne ± SEM chacune (n = 3). Pas de différence significative entre les barres de chaque plante ayant la même lettre ($p \leq 0.05$), selon le test de comparaisons multiples de Tukey.

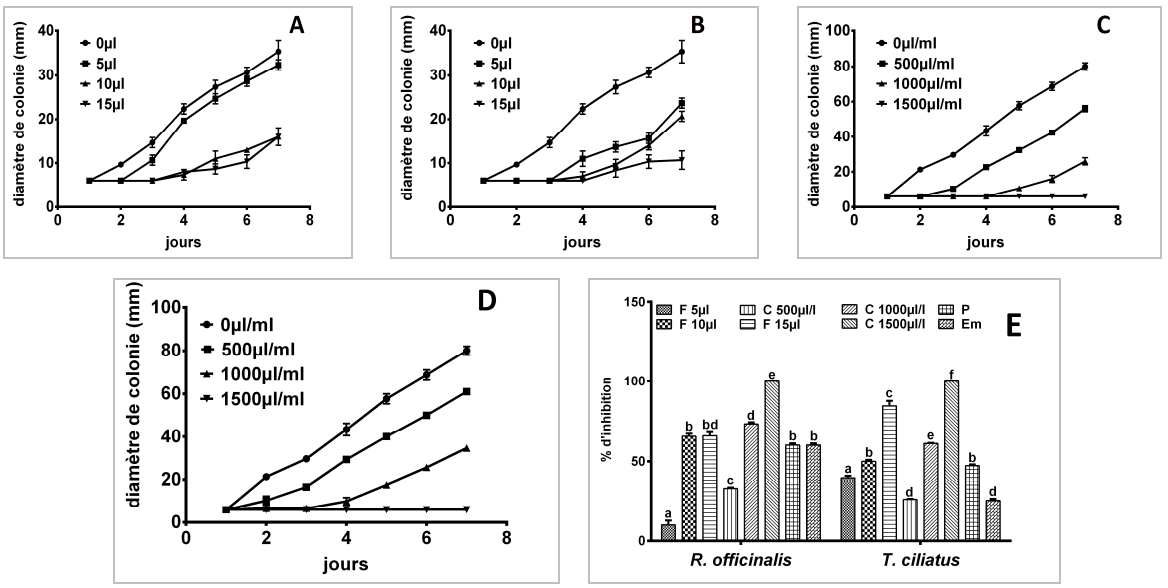


Figure 59. Croissance du champignon *M. suaveolens* sur PDA sous l'effet des HEs, des EMs et de la poudre des plantes *R. officinalis* et *T. ciliatus* ; effet par fumigation **(A) (B)**, par contact direct **(C) (D)** des HEs de *R. officinalis* et *T. ciliatus* respectivement ; **(E)** Inhibition de de la croissance du champignon au 7ième jour par : fumigation -F- de 5, 10, 15µl ; incorporation -C- de 500,1000,1500µl/l des HEs ; de la plante en poudre -P- et de l'extrait méthanolique -Em- : Les données sont présentées sous forme de moyenne ± SEM chacune (n = 3). Pas de différence significative entre les barres de chaque plante ayant la même lettre ($p \leq 0.05$), selon le test de comparaisons multiples de Tukey.

3.3.1.24. *Penicillium citreonigrum*

Le retardement de la croissance de 2 à 4 jours a été observé avec les 2 HEs et les 2 méthodes. Les concentrations supérieures atteignaient un niveau d'inhibition allant de 33% à 66% par fumigation et environ 55% pour l'incorporation. La poudre du romarin exerçait 24% d'inhibition ; celle du thym en exerçait 6%. L'EM présentait le même niveau (15%) (Figure 60E).

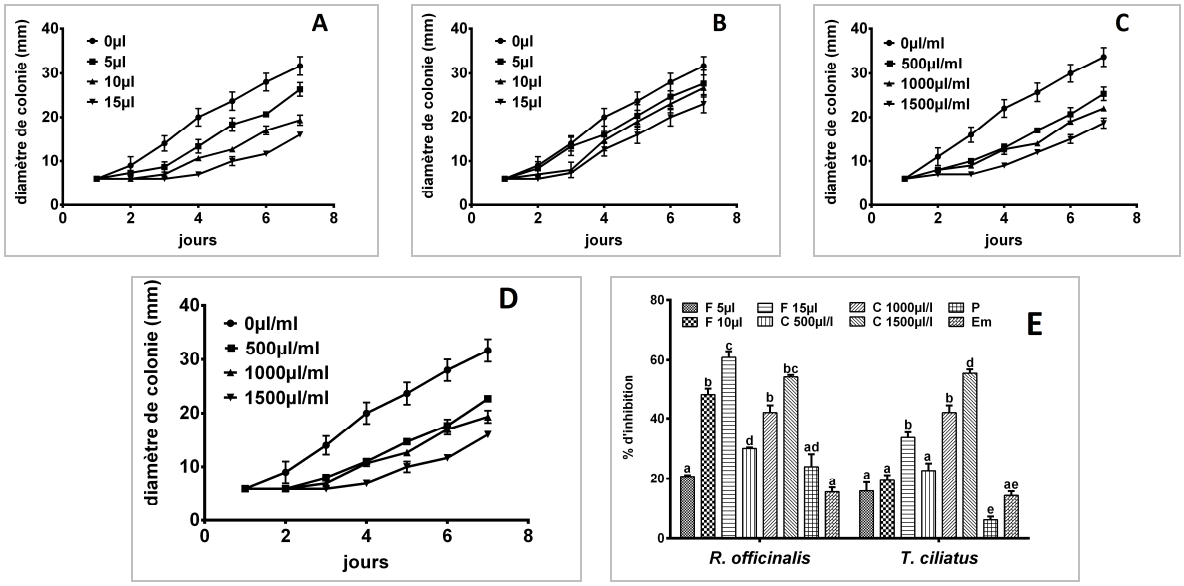


Figure 60. Croissance du champignon *P. citreonigrum* sur PDA sous l'effet des HEs, des EMs et de la poudre des plantes *R. officinalis* et *T. ciliatus* ; effet par fumigation **(A) (B)**, par contact direct **(C) (D)** des HEs de *R. officinalis* et *T. ciliatus* respectivement ; **(E)** Inhibition de de la croissance du champignon au 7ième jour par : fumigation -F- de 5, 10, 15µl ; incorporation -C- de 500,1000,1500µl/l des HEs ; de la plante en poudre -P- et de l'extrait méthanolique -Em- : Les données sont présentées sous forme de moyenne ± SEM chacune (n = 3). Pas de différence significative entre les barres de chaque plante ayant la même lettre ($p \leq 0.05$), selon le test de comparaisons multiples de Tukey.

3.3.1.25. *Penicillium aurantigriseum*

La fumigation des HEs a entrainé une inhibition totale pendant 3 à 4 jours puis ralentissement de l'allure de la croissance pour causer à la fin de l'incubation une inhibition de 54 à 80% pour le romarin et le thym respectivement. La technique d'incorporation a permis un blocage de la croissance pour 3jours par seule l'HE du romarin et l'inhibition a atteint 64%. L'HE du thym était de et 47%. Les poudres et les EMs ont provoqué les niveaux d'inhibition de 42, 26% et 32, 17% pour le romarin et le thym respectivement (Figure 61).

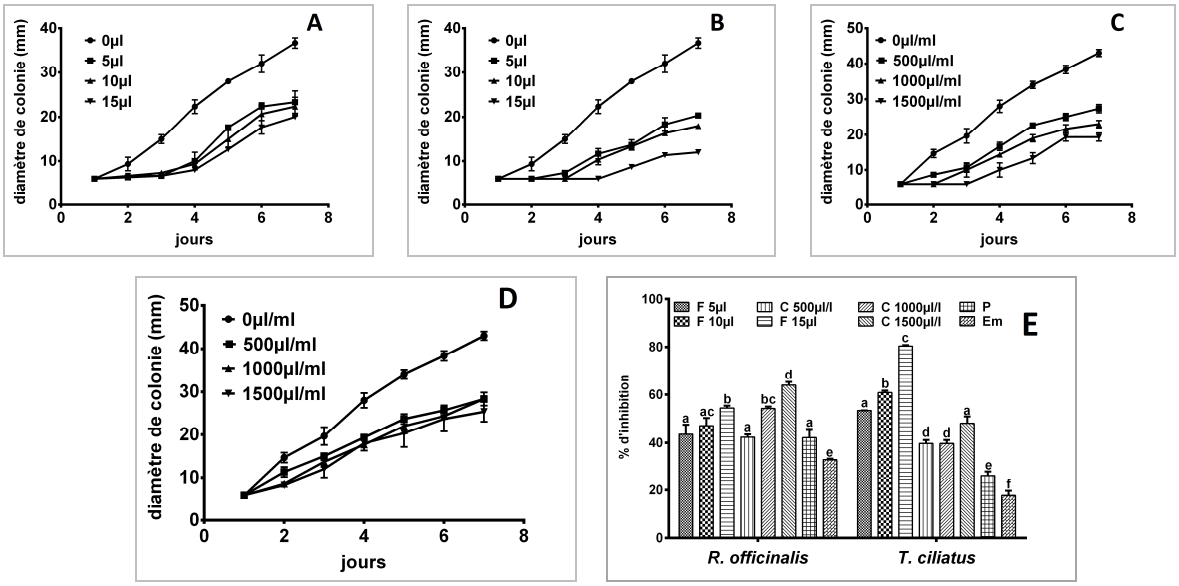


Figure 61. Croissance du champignon *P. aurantigriseum* sur PDA sous l'effet des HEs, des EMs et de la poudre des plantes *R. officinalis* et *T. ciliatus* ; effet par fumigation **(A) (B)**, par contact direct **(C) (D)** des HEs de *R. officinalis* et *T. ciliatus* respectivement ; **(E)** Inhibition de de la croissance du champignon au 7ième jour par : fumigation -F- de 5, 10, 15µl ; incorporation -C- de 500,1000,1500µl/l des HEs ; de la plante en poudre -P- et de l'extrait méthanolique -Em- : Les données sont présentées sous forme de moyenne ± SEM chacune (n = 3). Pas de différence significative entre les barres de chaque plante ayant la même lettre ($p \leq 0.05$), selon le test de comparaisons multiples de Tukey.

3.3.1.26. *Penicillium griseofulvum*

L'HE de *T. ciliatus* a entrainé un blocage de la croissance de *P. griseofulvum* pendant 4 à 5 jours par les 2 méthodes d'application; celle de *R. officinalis* avait le même effet par seule l'incorporation. L'inhibition atteignait 50 à 84% par fumigation et 76% par incorporation pour le romarin et le thym respectivement. L'effet de la poudre et les EMs atteignaient 30 ; 13% et 16 ; 7% pour le romarin et le thym respectivement (Figure 62)

3.3.1.27. *Penicillium digitatum*

La croissance a été retardée 3jours par incorporation des HEs mais seule L'HE du thym qui provoquait une inhibition importante (50%) suivie par celle du romarin (27%) par fumigation. L'effet des poudres et des EMs était remarquable par rapport à celui des HEs par un niveau situé entre 39 et 52% (Figure 63).

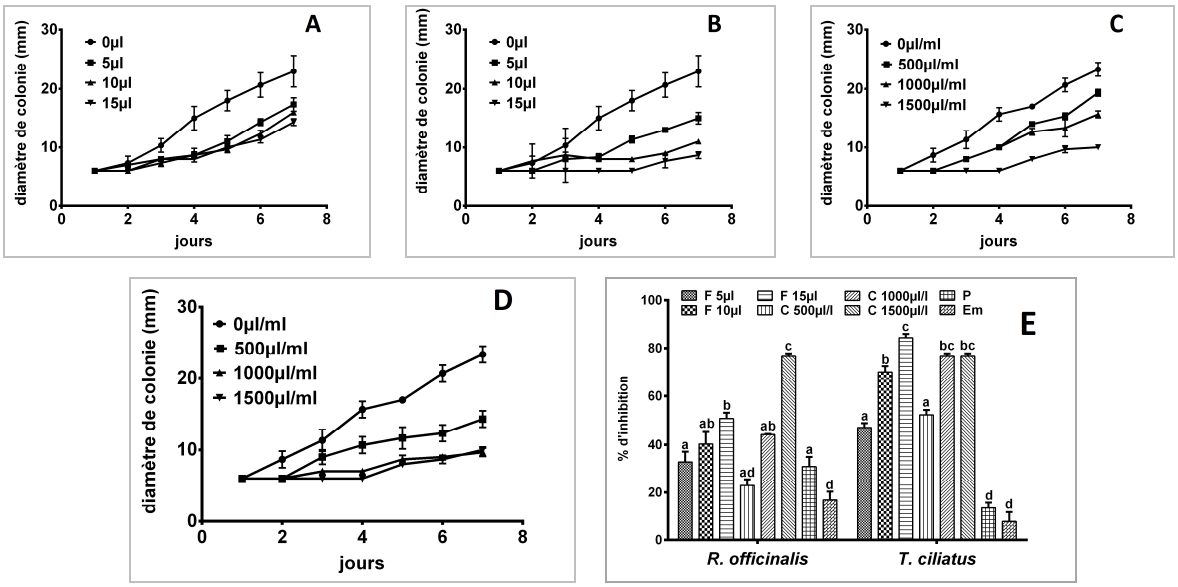


Figure 62. Croissance du champignon *P. griseofulvum* sur PDA sous l'effet des HEs, des EMs et de la poudre des plantes *R. officinalis* et *T. ciliatus* ; effet par fumigation **(A) (B)**, par contact direct **(C) (D)** des HEs de *R. officinalis* et *T. ciliatus* respectivement ; **(E)** Inhibition de de la croissance du champignon au 7ième jour par : fumigation -F- de 5, 10, 15µl ; incorporation -C- de 500,1000,1500µl/l des HEs ; de la plante en poudre -P- et de l'extrait méthanolique -Em- : Les données sont présentées sous forme de moyenne ± SEM chacune (n = 3). Pas de différence significative entre les barres de chaque plante ayant la même lettre ($p \leq 0.05$), selon le test de comparaisons multiples de Tukey.

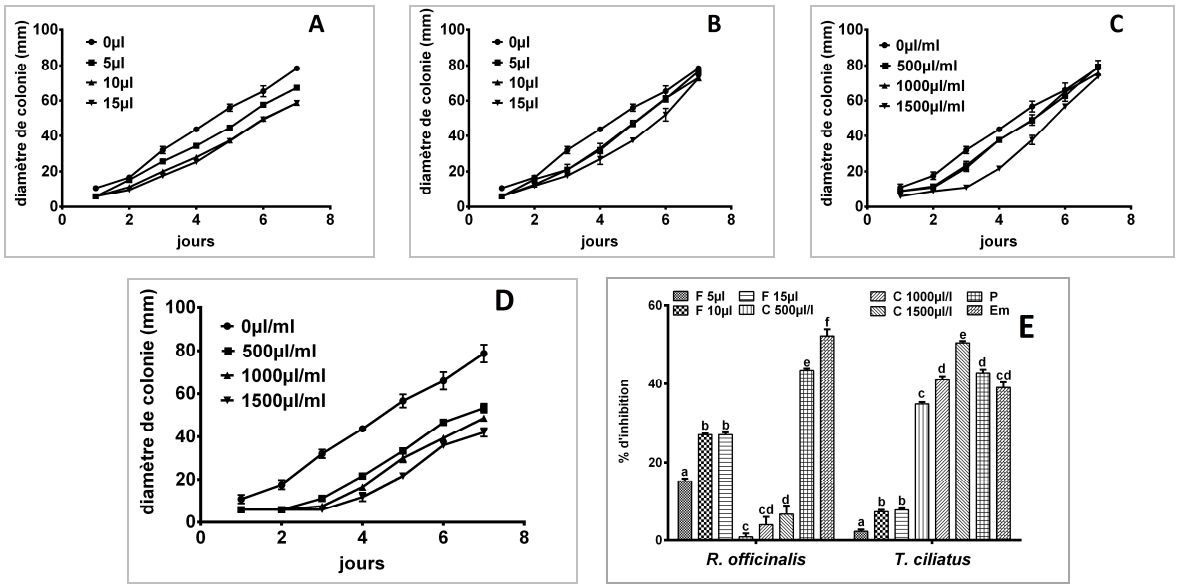


Figure 63. Croissance du champignon *P. digitatum* sur PDA sous l'effet des HEs, des EMs et de la poudre des plantes *R. officinalis* et *T. ciliatus* ; effet par fumigation **(A) (B)**, par contact direct **(C) (D)** des HEs de *R. officinalis* et *T. ciliatus* respectivement ; **(E)** Inhibition de de la croissance du champignon au 7ième jour par : fumigation -F- de 5, 10, 15µl ; incorporation -C- de 500,1000,1500µl/l des HEs ; de la plante en poudre -P- et de l'extrait méthanolique -Em- : Les données sont présentées sous forme de moyenne ± SEM chacune (n = 3). Pas de différence significative entre les barres de chaque plante ayant la même lettre ($p \leq 0.05$), selon le test de comparaisons multiples de Tukey.

3.3.1.28. *Penicillium expansum*

Les concentrations supérieures de l'HE du thym provoquaient la même inhibition à la fin d'incubation (68%) champignon par les deux méthodes. Le même niveau d'inhibition est observé avec l'HE du romarin par incorporation et 46% a été observé par fumigation. L'action des EMs des deux plantes était la même (13%). L'effet de la poudre du thym était plus important (23%) par rapport au romarin (7%) (Figure 64).

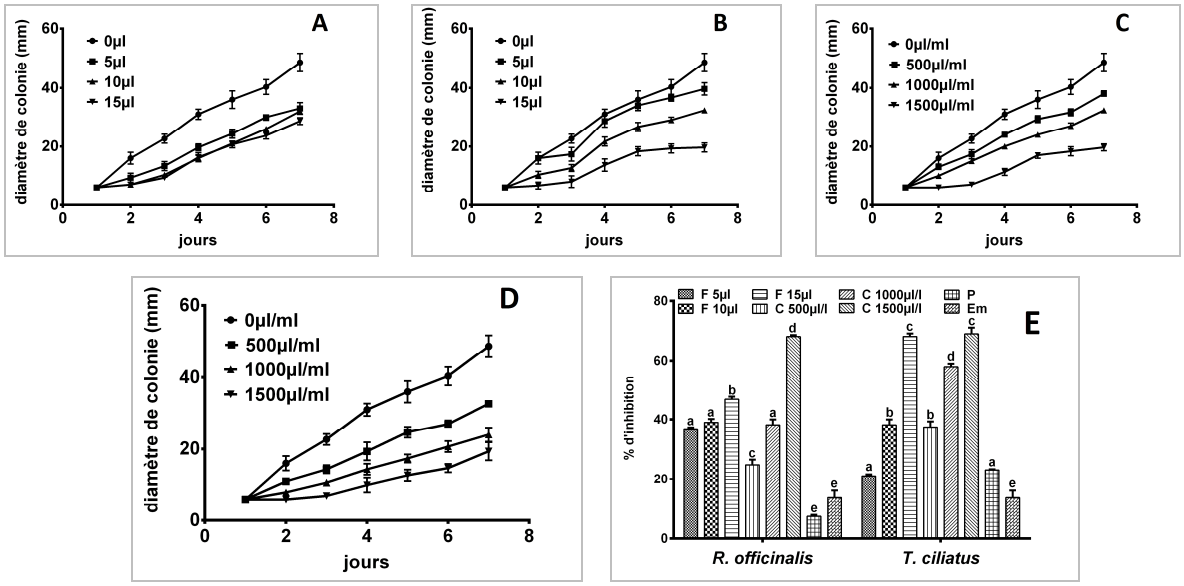


Figure 64. Croissance du champignon *P. expansum* sur PDA sous l'effet des HEs, des EMs et de la poudre des plantes *R. officinalis* et *T. ciliatus* ; effet par fumigation **(A) (B)**, par contact direct **(C) (D)** des HEs de *R. officinalis* et *T. ciliatus* respectivement ; **(E)** Inhibition de de la croissance du champignon au 7ième jour par : fumigation -F- de 5, 10, 15µl ; incorporation -C- de 500,1000,1500µl/l des HEs ; de la plante en poudre -P- et de l'extrait méthanolique -Em- : Les données sont présentées sous forme de moyenne ± SEM chacune (n = 3). Pas de différence significative entre les barres de chaque plante ayant la même lettre ($p \leq 0.05$), selon le test de comparaisons multiples de Tukey.

3.3.1.29. *Penicillium chrysogenum*

Seule L'HE du thym qui a inhibé considérablement la croissance de ce champignon par retardement de 4jours suivi de ralentissement de croissance jusqu'à 61% d'inhibition. Pas de différences significatives ($p<0.05$) entre les concentrations des autres applications des HEs de la même plante. L'action de la poudre était de 37% pour le romarin et 22% pour le thym. Les EMs étaient proches et ne dépassaient pas 20% (Figure 65).

3.3.1.30. *Penicillium frequentens*

L'action des HEs n'a pas dépassé 45%. Pas de différence significative entre les concentrations d'HE du romarin des 2 techniques. La concentration supérieure des 2 était la plus importante par incorporation. L'action de la poudre était très faible (thym) à nulle (romarin). L'effet de l'EM était le même pour les 2 plantes (11%) (Figure 66).

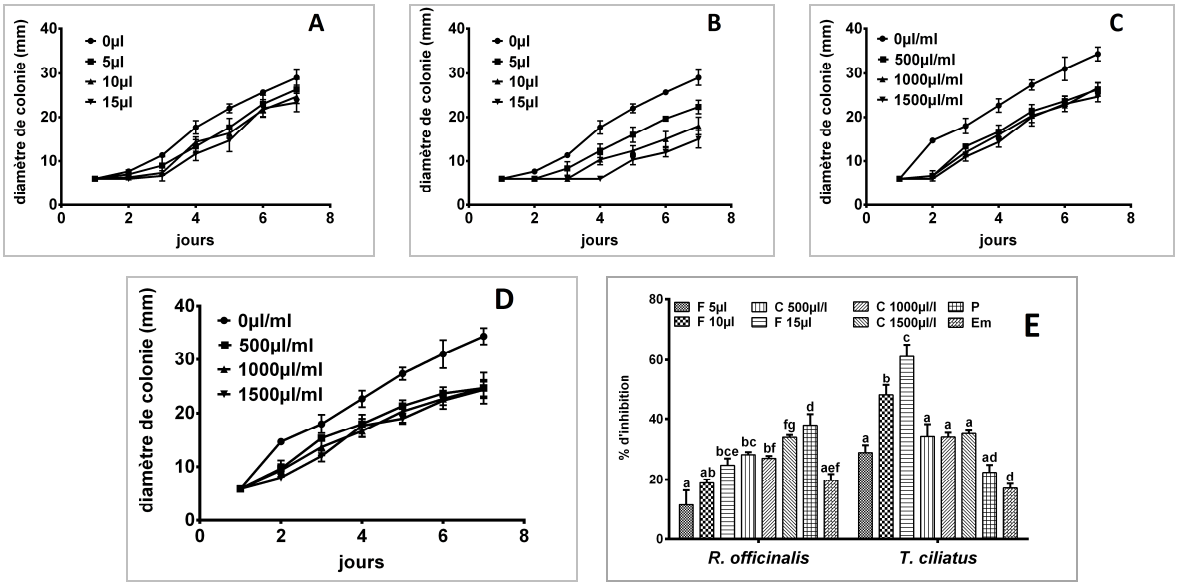


Figure 65. Croissance du champignon *P. chrysogenum* sur PDA sous l'effet des HEs, des EMs et de la poudre des plantes *R. officinalis* et *T. ciliatus* ; effet par fumigation **(A) (B)**, par contact direct **(C) (D)** des HEs de *R. officinalis* et *T. ciliatus* respectivement ; **(E)** Inhibition de de la croissance du champignon au 7ième jour par : fumigation -F- de 5, 10, 15µl ; incorporation -C- de 500,1000,1500µl/l des HEs ; de la plante en poudre -P- et de l'extrait méthanolique -Em- : Les données sont présentées sous forme de moyenne ± SEM chacune (n = 3). Pas de différence significative entre les barres de chaque plante ayant la même lettre ($p \leq 0.05$), selon le test de comparaisons multiples de Tukey.

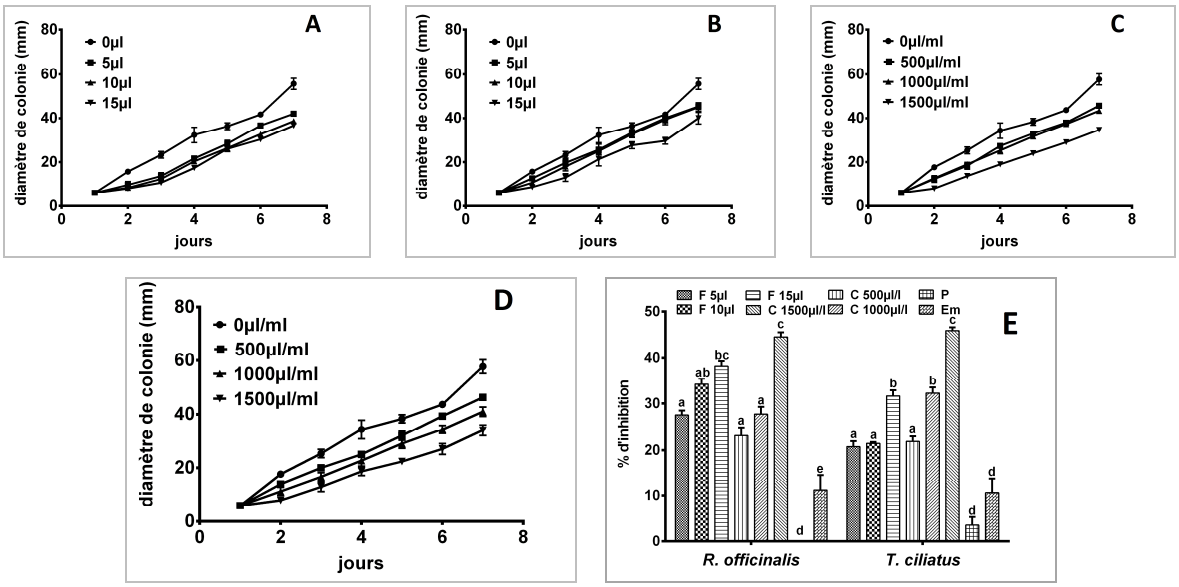


Figure 66. Croissance du champignon *P. frequentens* sur PDA sous l'effet des HEs, des EMs et de la poudre des plantes *R. officinalis* et *T. ciliatus* ; effet par fumigation **(A) (B)**, par contact direct **(C) (D)** des HEs de *R. officinalis* et *T. ciliatus* respectivement ; **(E)** Inhibition de de la croissance du champignon au 7ième jour par : fumigation -F- de 5, 10, 15µl ; incorporation -C- de 500,1000,1500µl/l des HEs ; de la plante en poudre -P- et de l'extrait méthanolique -Em- : Les données sont présentées sous forme de moyenne ± SEM chacune (n = 3). Pas de différence significative entre les barres de chaque plante ayant la même lettre ($p \leq 0.05$), selon le test de comparaisons multiples de Tukey.

3.3.1.31. *Penicillium italicum*

L'HE du thym était plus efficace par rapport à celle du romarin qui était faible par incorporation. L'effet n'est pas significativement différent entre les concentrations moyennes et supérieures des HEs fumigées des 2 plantes. L'effet des poudres était autour de 40% et celui des EMs était autour de 11%. Le retardement de la croissance est enregistré entre 2 et 4 jours selon L'HE et la technique appliquée (Figure 67).

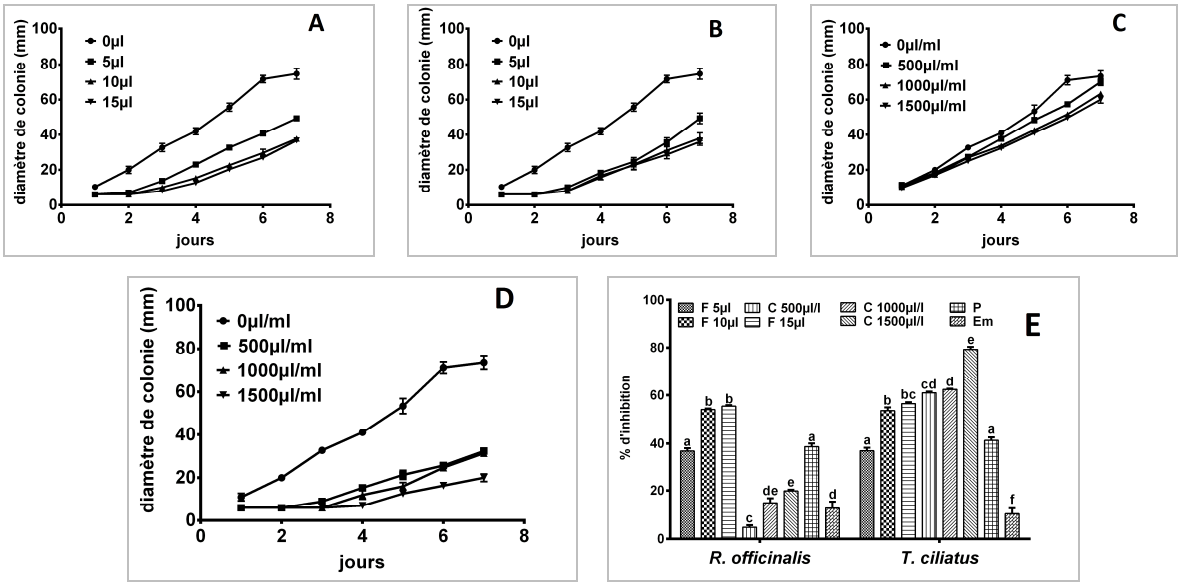


Figure 67. Croissance du champignon *P. italicum* sur PDA sous l'effet des HEs, des EMs et de la poudre des plantes *R. officinalis* et *T. ciliatus* ; effet par fumigation **(A) (B)**, par contact direct **(C) (D)** des HEs de *R. officinalis* et *T. ciliatus* respectivement ; **(E)** Inhibition de de la croissance du champignon au 7ième jour par : fumigation -F- de 5, 10, 15µl ; incorporation -C- de 500,1000,1500µl/l des HEs ; de la plante en poudre -P- et de l'extrait méthanolique -Em- : Les données sont présentées sous forme de moyenne ± SEM chacune (n = 3). Pas de différence significative entre les barres de chaque plante ayant la même lettre ($p \leq 0.05$), selon le test de comparaisons multiples de Tukey.

3.3.1.32. *Ulocladium chartarum*

L'HE du thym a totalement inhibé ce champignon par fumigation de la concentration de supérieure ; l'HE du romarin n'avait d'effet considérable. L'application des HEs par incorporation de concentrations supérieures retardait la croissance pendant 3 à 4 jours et provoquait une inhibition aux environs de 81% à la fin de l'incubation. L'effet des poudres était de 30 et 35% pour le romarin et le thym respectivement. Les EMs provoquaient le même niveau d'inhibition (20%) (Figure 68).

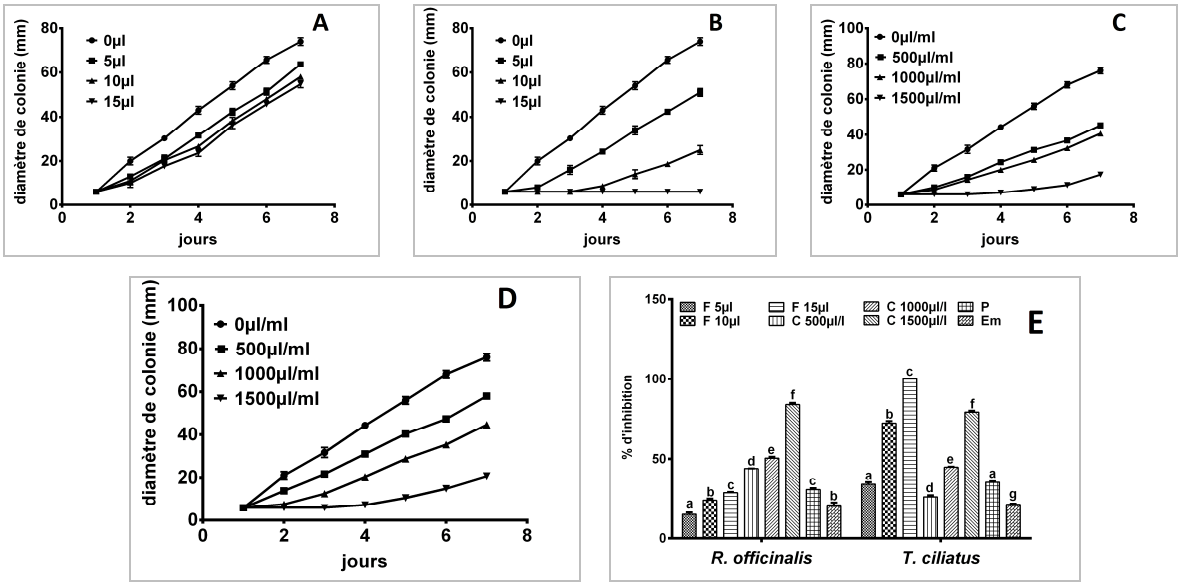


Figure 68. Croissance du champignon *U. cartarum* sur PDA sous l'effet des HEs, des EMs et de la poudre des plantes *R. officinalis* et *T. ciliatus* ; effet par fumigation **(A) (B)**, par contact direct **(C) (D)** des HEs de *R. officinalis* et *T. ciliatus* respectivement ; **(E)** Inhibition de de la croissance du champignon au 7ième jour par : fumigation -F- de 5, 10, 15µl ; incorporation -C- de 500,1000,1500µl/l des HEs ; de la plante en poudre -P- et de l'extrait méthanolique -Em- : Les données sont présentées sous forme de moyenne ± SEM chacune (n = 3). Pas de différence significative entre les barres de chaque plante ayant la même lettre ($p \leq 0.05$), selon le test de comparaisons multiples de Tukey.

3.3.2. Viabilité des champignons totalement inhibés

L'inhibition totale de la croissance fongique a été observée chez quelques champignons et uniquement sous l'effet des HEs (tableau 9). Ces champignons sont transférés au milieu PDA exempt d'HE puis incubés à 25°C pendant 7 jours. Aucune croissance n'a été observée chez tous ces champignons, ce qui signifie que les concentrations appliquées sont fongicides pour les dits champignons.

Tableau 9. Champignons totalement inhibés selon la technique et la concentration appliquées.

	Contact direct (incorporation) (µl/l)						**Fumigation (µl)**					
	R. officinalis			***T. ciliatus***			***R. officinalis***			***T. ciliatus***		
	500	1000	1500	500	1000	1500	5	10	15	5	10	15
Aspergillus glaucus				IT	IT	IT		IT	IT	IT	IT	IT
Botrytis cinerea					IT	IT					IT	IT
Botrytis aclada												IT
Cladosporium herbarum						IT						
C. sphaero spermum									IT			
Moniliella suaveolens			IT			IT						
Ulocladium chartarum												IT

IT : inhibition totale.

3.3.3. Discussion de l'activité antifongique des plantes étudiées

En général, toutes les concentrations appliquées par les différentes méthodes, ont réduit la croissance des champignons testés. Certaines ont réduit significativement ou ont complètement inhibé la croissance.

R. officinalis appliqué sous forme de poudre incorporée (à raison de 10%) a présenté un effet inhibiteur supérieur à 10% sur 30 champignons soit 93.75%. Sept d'entre eux soit 21.88% du total ont été inhibés à un niveau supérieur à 50% dont parfois supérieur de 90%. Parallèlement, *T. ciliatus* a présenté une inhibition supérieure à 10% sur 28 champignons soit 87.5% dont deux (6.25%) sont inhibés à un niveau entre 50 et 60% (Figure 69A). Comparés aux témoins, les champignons soumis à l'effet de la poudre ont montré un aspect cultural plus ou moins différent ; quelques champignons ont subits un changement de la couleur de la colonie (*A. parasiticus, P. chrysogenum, A. nidulans…*), restriction de ses marges (*A. alternata*) ou parfois abondance du mycélium aérien avec restriction de la sporulation (*A. flavus*) ou encore apparition de corémies et absence d'exsudats superficiels (*P. expansum* et *P. aurantiogriseum…*) (Figure 70). L'analyse statistique a montré qu'il n'y a pas de différence significative ($P<0.05$) entre l'effet des deux plantes sur 11 champignons soit 34.37% du total, selon le test de comparaisons multiples de Sidak.

L'EM de *R. officinalis* appliqué par la technique des puits (à raison de 0.7g/ml) a présenté un niveau d'inhibition supérieur à 10% sur 28 champignons soit 87.50%. Trois d'entre eux soit 9.38% du total ont été inhibés à un niveau compris entre 50 et 70%. Parallèlement, L'EM de *T. ciliatus* a présenté une inhibition supérieure à 10% sur 24 champignons soit 75%, avec un maximum inférieur à 50% (Figure 69B). Comparés aux témoins les champignons soumis à l'effet de l'EM ont montré une insuffisance sporale aux degrés différents d'un champignon à un autre avec apparition de sécrétions pigmentées dans le milieu de culture et restriction de la marge des colonies (Figure 71). L'analyse statistique a montré qu'il n'y a pas de différence significative ($P<0.05$) entre l'effet des EMs des deux plantes sur 22 champignons soit 68.75% du total, selon le test de comparaisons multiples de Sidak.

L'HE de *R. officinalis* appliquée par incorporation de concentrations croissantes au milieu de culture a provoqué une inhibition supérieure à 10% sur 81.25, 87.50 et 93.75% des champignons pour les concentrations 500, 1000 et 1500µl/l respectivement. Cinquante pour cent (50%) des champignons ont subi une inhibition allant de 50% à 100% pour la concentration supérieure. Parallèlement, L'HE de *T. ciliatus* a présenté une inhibition supérieure à 10% sur 90.63, 96.88 et 100% des champignons pour les mêmes concentrations

dessus respectivement (500, 1000 et 1500µl/l). Soixante-quinze pour cent (75%) des champignons ont subi une inhibition allant de 50% à 100% pour la concentration supérieure. Comme le montre la figure 72, l'HE du thym parait plus efficace que celle du romarin ; la différence significative (P<0.05) a concerné 28 champignons soit 87.5% du total dont 18 (56.25% du total) parmi eux sont plus sensibles à L'HE du thym (500µl/l) (Figure 72A) ; pour la concentration 1000µl/l la différence significative a concerné 25 champignons soit 78.13% du total dont 20 (62.5% du total) parmi eux sont plus sensibles à l'HE du thym (Figure 72B) ; pour la concentration 1500µl/l la différence significative a été liée 22 champignons soit 68.75% du total dont 16 (50% du total) parmi eux sont plus sensibles à L'HE du thym (Figure 72C).

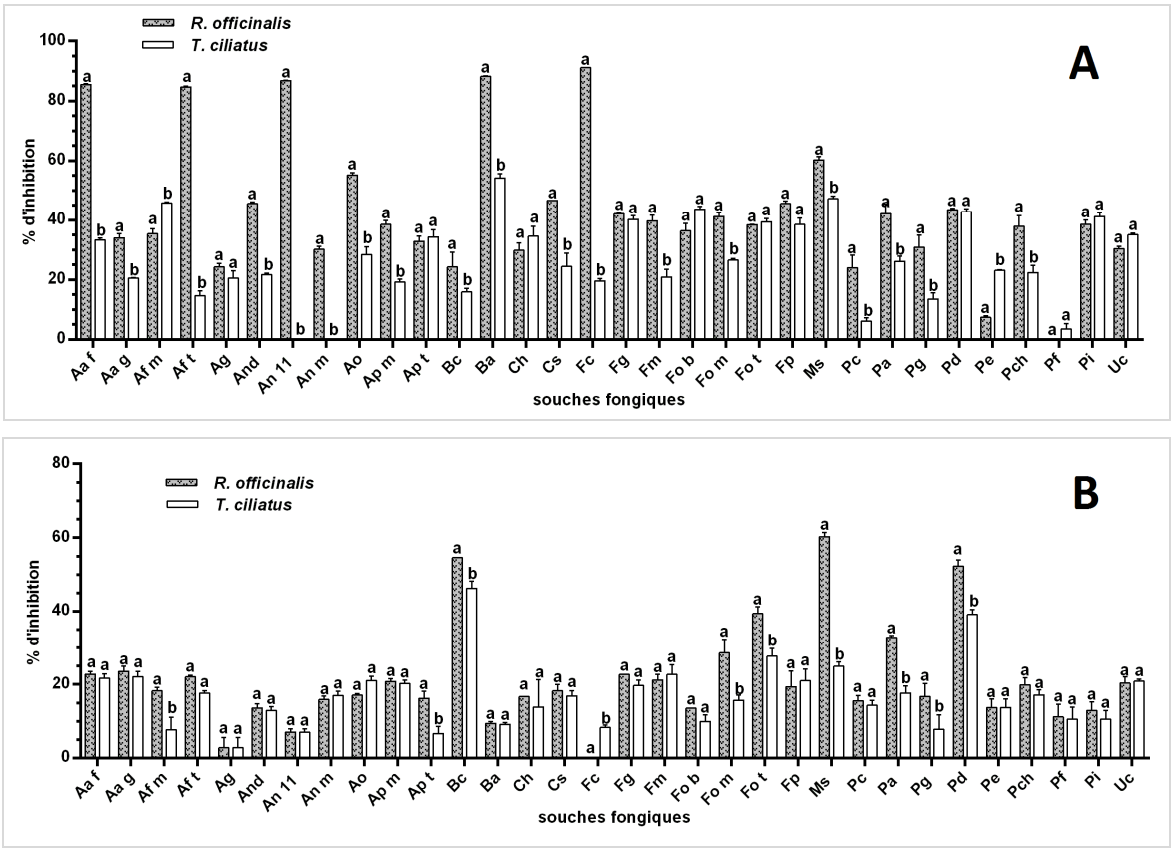


Figure 69. Effet des poudres et extraits méthanoliques de *R.officinalis* et *T. ciliatus* sur la croissance radiale des champignons testés sur PDA ; **(A)** poudre à 10% (w/v), **(B)** Extrait méthanolique à 0.7g/ml. Les données sont représentées sous forme de moyenne ± SEM chacune (n = 3). Les lettres différentes indiquent des différences significatives (P<0.05) entre les deux plantes testées, sur chaque champignon, selon le test de comparaisons multiples de Sidak.

Aa f: *Alternaria alternata* (fraise)
Aa g: *Alternaria alternata* (grenade)
Af m: *Aspergillus flavus* (type sauvage)
Af t: *Aspergillus flavus* NRRL3251
Ag: *Aspergillus glaucus*
And: *Aspergillus nidulans*
An 11: *Aspergillus niger* (orange)
An m: *Aspergillus niger* ATCC16404
Ao: *Aspergillus ochraceus* ATCC 28947
Ap m: *Aspergillus parasiticus* (type sauvage)
Ap t: *Aspergillus parasiticus* CBS100926
Bc: *Botrytis cinerea*
Ba: *Botrytis aclada*
Ch: *Cladosporium herbarum*
Cs: *Cladosporium sphaerospermum*
Fc: *Fusarium culmorum*
Fg: *Fusarium graminearum*
Fm: *Fusarium moniliforme*
Fo b: *Fusarium oxysporum* (banane)
Fo m: *Fusarium oxysporum* (type sauvage)
Fo t: *Fusarium oxysporum* f. sp. *lini*
Fp: *Fusarium proliferatum*
Ms : *Moniliella suaveolens*
Pc: *Penicillium citreonigrum*
Pa: *Penicillium aurantiogriseum*
Pg: *Penicillium griseofulvum*
Pd: *Penicillium digitatum*
Pe: *Penicillium expansum*
Pch: *Penicillium chrysogenum*
Pf: *Penicillium frequentens*
Pi: *Penicillium italicum*
Uc: *Ulocladium chartarum*

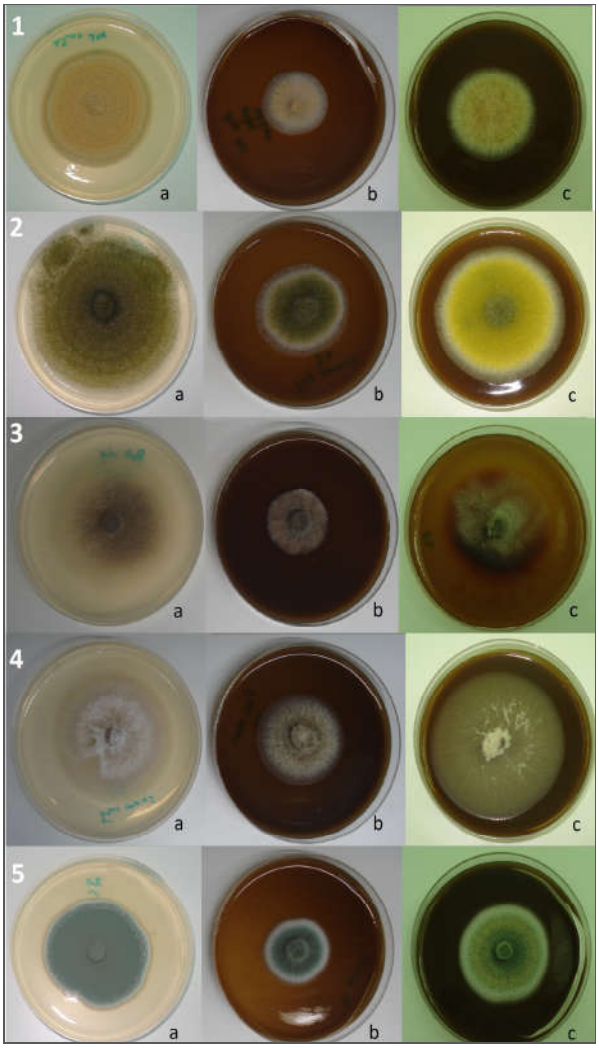


Figure 70.

Effet de la plante en poudre sur la croissance radiale de quelques champignons testés ; **1-** *A. ochraceus*, **2-** *A. parasiticus*, **3-** *B. aclada*, **4-** *F. oxysporum*, **5-** *P. expansum* ; (**a**) témoin, (**b**) milieu PDA supplémenté de *R. officinalis*, (**c**) milieu PDA supplémenté de *T. ciliatus*.

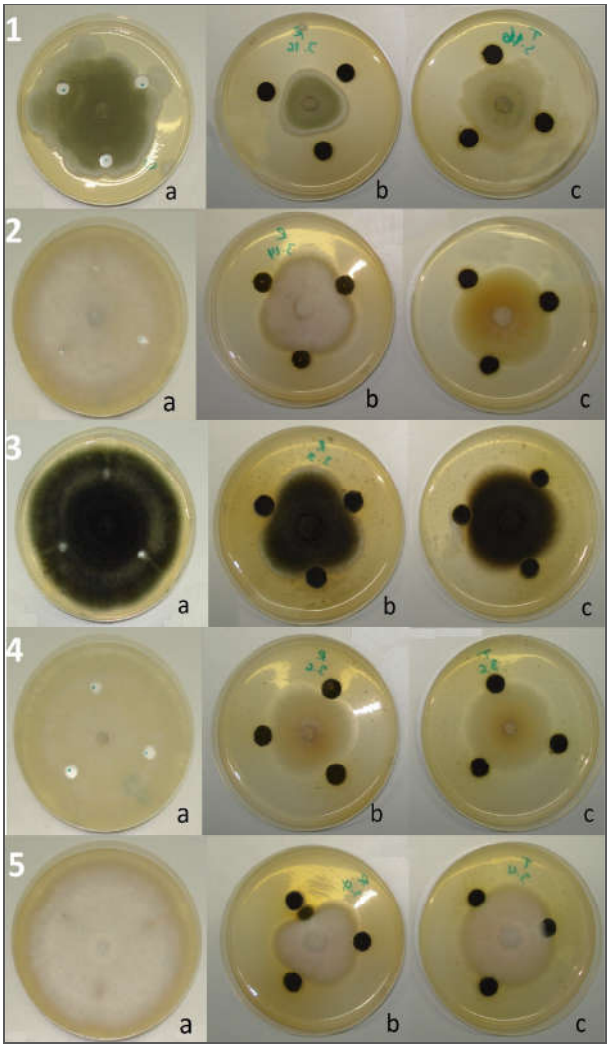


Figure 71.

Effet de l'extrait méthanolique sur la croissance radiale de quelques champignons testés ; **1-** *P. digitatum*, **2-** *F. graminearum*, **3-** *A. alternata*, **4-** *F. oxysporum*, **5-** *F. proliferatum*; (**a**) témoin, (**b**) milieu PDA supplémenté de *R. officinalis*, (**c**) milieu PDA supplémenté de *T. ciliatus*.

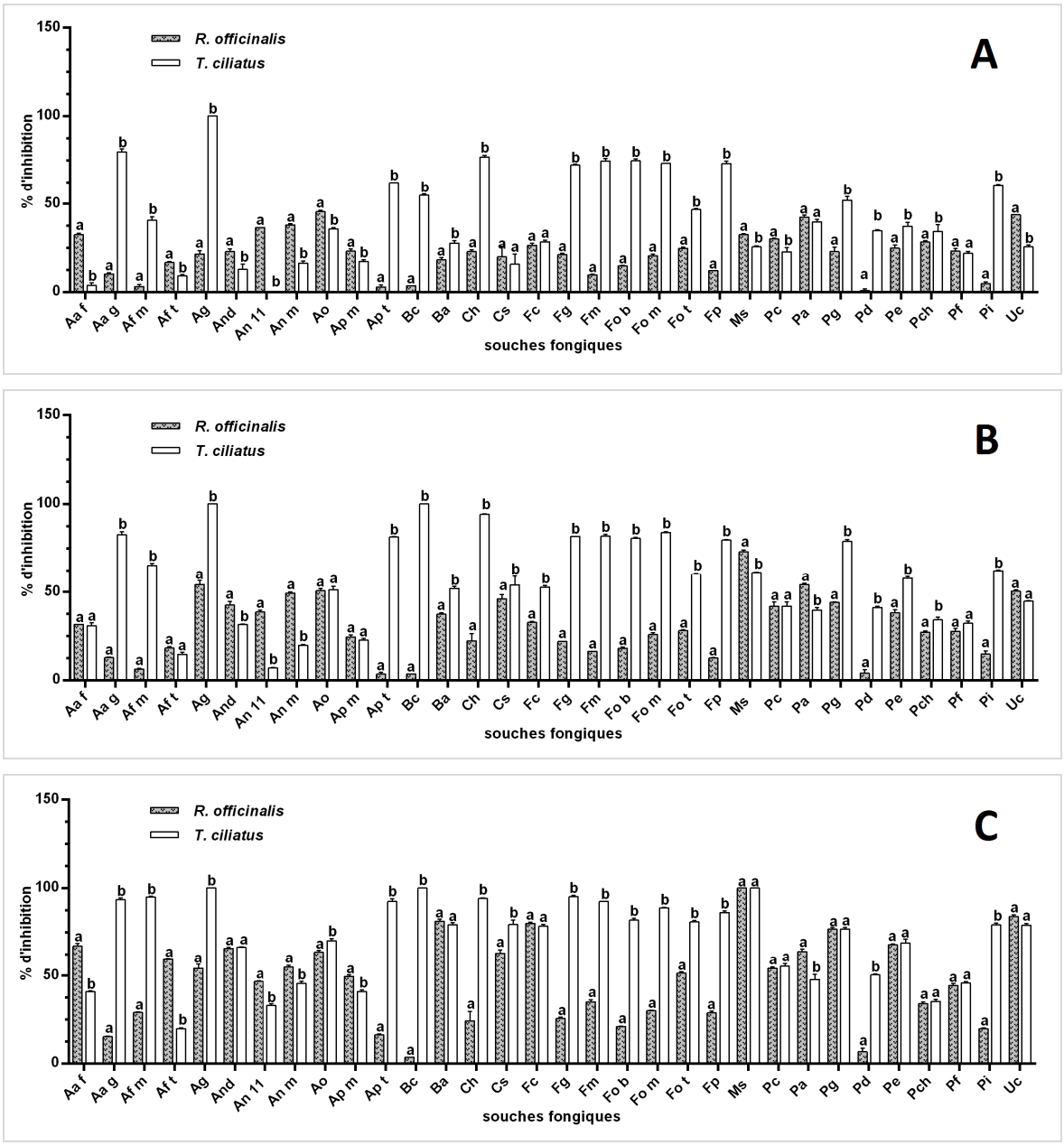


Figure 72. Effet des HEs de *R.officinalis* et *T. ciliatus* sur la croissance radiale des champignons testés sur PDA par la méthode de contact direct de **(A)** 500, **(B)** 1000,**(C)** 1500µl/l. Les données sont représentées sous forme de moyenne ± SEM chacune (n = 3). Les lettres différentes indiquent des différences significatives (P<0.05) entre les deux plantes testées, sur chaque champignon, selon le test de comparaisons multiples de Sidak.

Aa f: *Alternaria alternata* (fraise)
Aa g: *Alternaria alternata* (grenade)
Af m: *Aspergillus flavus* (type sauvage)
Af t: *Aspergillus flavus* NRRL3251
Ag: *Aspergillus glaucus*
And: *Aspergillus nidulans*
An 11: *Aspergillus niger* (orange)
An m: *Aspergillus niger* ATCC16404
Ao: *Aspergillus ochraceus* ATCC 28947
Ap m: *Aspergillus parasiticus* (type sauvage)
Ap t: *Aspergillus parasiticus* CBS100926
Bc: *Botrytis cinerea*
Ba: *Botrytis aclada*
Ch: *Cladosporium herbarum*
Cs: *Cladosporium sphaerospermum*
Fc: *Fusarium culmorum*
Fg: *Fusarium graminearum*
Fm: *Fusarium moniliforme*
Fo b: *Fusarium oxysporum* (banane)
Fo m: *Fusarium oxysporum* (type sauvage)
Fo t: *Fusarium oxysporum* f. sp. *lini*
Fp: *Fusarium proliferatum*
Ms : *Moniliella suaveolens*
Pc: *Penicillium citreonigrum*
Pa: *Penicillium aurantiogriseum*
Pg: *Penicillium griseofulvum*
Pd: *Penicillium digitatum*
Pe: *Penicillium expansum*
Pch: *Penicillium chrysogenum*
Pf: *Penicillium frequentens*
Pi: *Penicillium italicum*
Uc: *Ulocladium chartarum*

L'HE de *R. officinalis* appliquée par fumigation de concentrations croissantes (5, 10 et 15µl/boite) a provoqué une inhibition supérieure à 10% sur 78.13, 87.50 et 96.88% des champignons pour les concentrations 5, 10 et 15µl/boite respectivement. Un nombre de 21 champignons (65.63%) ont subi une inhibition allant de 50% à 100% pour la concentration supérieure. Parallèlement, l'HE de *T. ciliatus* a présenté une inhibition supérieure à 10% sur 87.5, 90.63 et 96.88% des champignons pour les mêmes concentrations. Un nombre de de 20 (62.5%) et 26 (81.25%) des champignons ont subi une inhibition allant de 50% à 100% pour les concentrations moyenne et supérieure respectivement. Comme le montre la figure 73, l'HE du thym parait plus efficace que celle du romarin ; la différence significative ($P<0.05$) a concerné 23 champignons soit 71.88% du total dont 17 (53.13% du total) parmi eux sont plus sensibles à l'HE du thym (5µl/boite) (Figure 73A) ; pour la concentration 10µl/boite la différence significative a concerné 22 champignons soit 68.75% du total dont 16 (50% du total) parmi eux sont plus sensibles à l'HE du thym (Figure 73B) ; pour la concentration 15µl/boite la différence significative a concerné 25 champignons soit 78.13% du total dont 19 (59.38% du total) parmi eux sont plus sensibles à l'HE du thym (Figure 73C).

Comparés aux témoins, mis à part des champignons totalement inhibés, les champignons soumis à l'effet des HEs des 2 plantes ont montré un aspect cultural plus ou moins différent; la diminution de la densité des spores était remarquable chez la grande majorité des champignons et ce surtout sous l'action des concentrations supérieures et en fonction de la technique appliquée (fumigation ou incorporation). L'aspect cultural a plus ou moins changé chez certains champignons tels que les espèces de *Fusarium* et d'*Aspergillus* ; le mycélium devenait dense et restreint avec des marges rétrécies, ou accompagné de l'apparition de corémies (*A. parasiticus* et *F. oxysporum*), ou sporulation disséminée avec condensation du mycélium atour du centre de la colonie (*A. niger*, *B. aclada*). Certains champignons ont sécrété des pigments et d'autres présentaient des exsudats superficiels (*P. frequentens, P. expansum*) (Figures 74 et 75).

Beaucoup de plantes, en particulier celles appartenant à la famille des Lamiacées sont connues pour leur activité antimicrobienne; surtout leurs HEs. Les différentes méthodes utilisées nous ont permis de savoir que *R. officinalis* et *T. ciliatus* sont des plantes douées d'activité antifongique remarquable. Les HEs ont montré leurs efficacité par rapport aux EMs et à la poudre. La technique de vaporisation des HEs était la plus efficace.

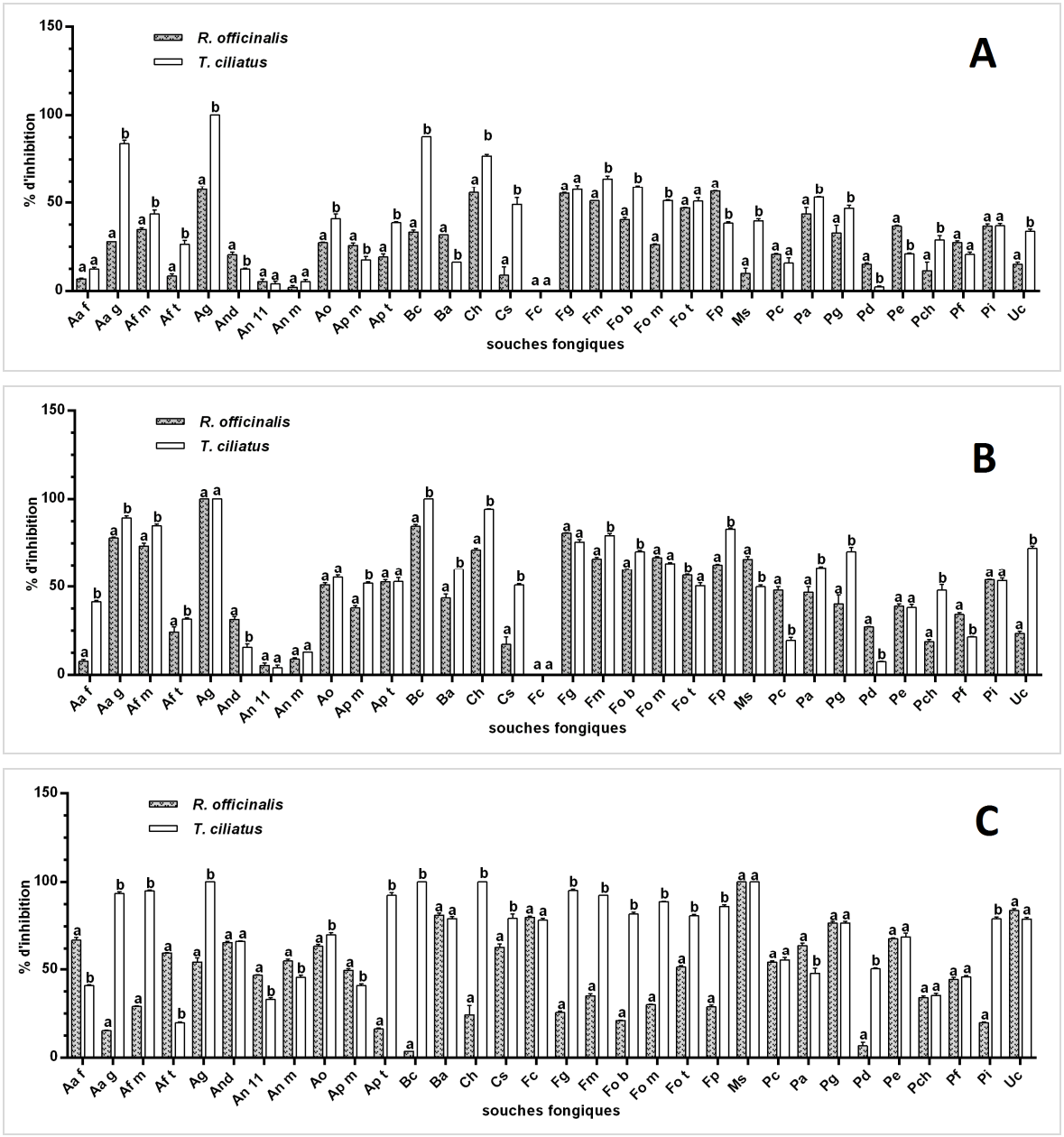


Figure 73. Effet des HEs de *R.officinalis* et *T. ciliatus* sur la croissance radiale des champignons testés sur PDA par la méthode de fumigation de **(A)** 5, **(B)** 10,**(C)** 15µl. Les données sont représentées sous forme de moyenne ± SEM chacune (n = 3). Les lettres différentes indiquent des différences significatives (P<0.05) entre les deux plantes testées, sur chaque champignon, selon le test de comparaisons multiples de Sidak.

Aa f: *Alternaria alternata* (fraise)
Aa g: *Alternaria alternata* (grenade)
Af m: *Aspergillus flavus* (type sauvage)
Af t: *Aspergillus flavus* NRRL3251
Ag: *Aspergillus glaucus*
And: *Aspergillus nidulans*
An 11: *Aspergillus niger* (orange)
An m: *Aspergillus niger* ATCC16404
Ao: *Aspergillus ochraceus* ATCC 28947
Ap m: *Aspergillus parasiticus* (type sauvage)
Ap t: *Aspergillus parasiticus* CBS100926
Bc: *Botrytis cinerea*
Ba: *Botrytis aclada*
Ch: *Cladosporium herbarum*
Cs: *Cladosporium sphaerospermum*
Fc: *Fusarium culmorum*
Fg: *Fusarium graminearum*
Fm: *Fusarium moniliforme*
Fo b: *Fusarium oxysporum* (banane)
Fo m: *Fusarium oxysporum* (type sauvage)
Fo t: *Fusarium oxysporum* f. sp. *lini*
Fp: *Fusarium proliferatum*
Ms : *Moniliella suaveolens*
Pc: *Penicillium citreonigrum*
Pa: *Penicillium aurantiogriseum*
Pg: *Penicillium griseofulvum*
Pd: *Penicillium digitatum*
Pe: *Penicillium expansum*
Pch: *Penicillium chrysogenum*
Pf: *Penicillium frequentens*
Pi: *Penicillium italicum*
Uc: *Ulocladium chartarum*

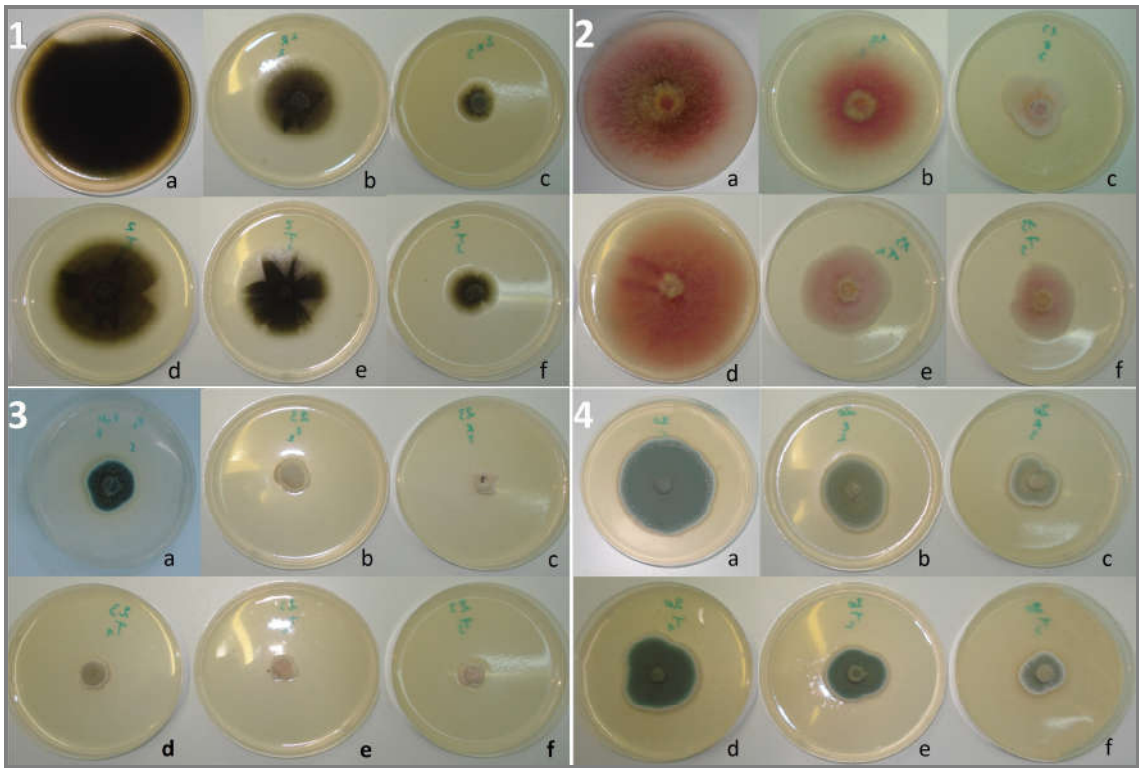


Figure 74. Effet de l'HE par contact direct sur la croissance radiale de **(1)** *M. suaveolens*, **(2)** *F. culmorum,* **(3)** *P. griseofulvum* et **(4)** *P. expansum* ; **a:** témoin ; **b**, **c:** champignon exposé aux concentrations 1000 et 1500µl/ml respectivement de l'HE de *R. officinalis* ; **d**, **e**, **f:** champignon exposé aux concentrations 500, 1000 et 1500µl/ml respectivement de l'HE de *T. ciliatus*.

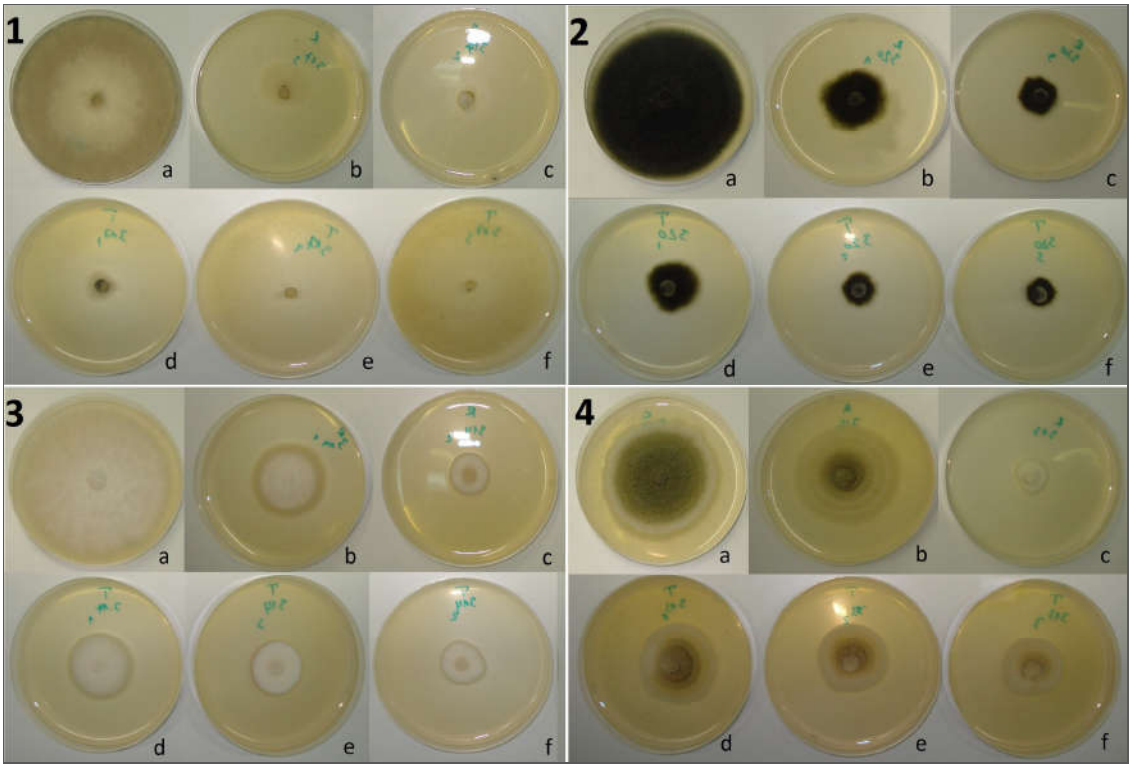


Figure 75 Effet de l'HE par fumigation sur la croissance radiale de **(1)** *B. cinerea*, **(2)** *A. alternata*, **(3)** *F. graminearum* et **(4)** *A. flavus*; **a:** témoin ; **b**, **c:** champignon exposé à la fumigation de 10 et 15µl respectivement de l'HE de *R. officinalis* ; **d**, **e**, **f:** champignon exposé à la fumigation de 5, 10 et 15µl respectivement de l'HE de *T. ciliatus*.

Yigit *et al.* (2000) a indiqué que l'effet de d'huile évaporée de romarin a inhibé la croissance de *P. digitatum* à 71.4% et a réduit la pourriture de 12.5% sur les fruits d'orange traités avec 900 ppm, mise à part l'inhibition de la sporulation. Néanmoins, Marandi *et al.* (2011) ont montré que l'HE du romarin a montré un pourcentage d'inhibition supérieur à celui du *Thymus kotschyanus* et *Ocimum basilicum* lorsqu'elle est testée sur *P. digitatum*. D'autres études ont signalé la grande sensibilité de *P. digitatum* aux HEs et extraits de plantes selon le type de solvant (Ameziane *et al.*, 2007). Yesil-Celiktas *et al.* (2007) ont rapporté l'efficacité de l'HE du romarin que l'extrait méthanolique contre *Candida albicans*. L'examen de activité antifongique des HEs de *Thymus daenensis* Celak., *Zataria multiflora* Boiss et *Thymbra spicata* L., contre *Aspergillus flavus*, *A. fumigatus*, *A. niger* et *A. parasiticus* a montré une forte activité chez *Thymus daenensis* Celak par rapport aux autres plantes (Ghasemi *et al.*, 2011). Des études antérieures sur l'activité antimicrobienne des HEs de certaines espèces de *Thymus* ont montré que la plupart des espèces qui possèdent de grandes quantités de monoterpènes phénoliques ont montré une activité contre les virus, les bactéries, les champignons et des souches microbiennes d'origine alimentaire. L'HE de *T. striatus* L. présentait de forts effets inhibiteurs contre tous les champignons testés (Rasooli *et al.*, 2006). Une étude de l'activité antifongique de plusieurs HEs, appliquées par les techniques de microdilution et de fumigation, sur 44 souches fongiques appartenant à divers genres, a montré que parmi les HEs étudiées celles d'*Origanum vulgare* L., *Thymus serpyllum* L., *T. vulgaris*, *Lavandula latifolia* Medik., *L. angustifolia* ont inhibé la croissance fongique. L'action antifongique a été attribuée aux composés phénoliques dont le carvacrol et le thymol (Tullio *et al.*, 2007). Ceux-ci étant les inhibiteurs les plus puissants du champignon *Botrytis cinerea in vitro* (Bouchra *et al.*, 2003).

Les extraits et les HEs des plantes ont prouvé leur action efficace *in vitro* sur une grande variété de champignons (Apisariyakul *et al.*, 1995; Zabka *et al.*, 2009; Prakash *et al.*, 2012; Askarne *et al.*, 2013). Ces activités antimicrobiennes sont dues à la composition chimique des HEs et des feuilles qui contiennent des composés importants à savoir α-pinène, acétate de bornyle, camphre, acide rosmarinique, 1,8 cinéol, thymol, carvacrol, γ-terpinene et *p*-cymène (Kocić-Tamackov and Dimić, 2013). En outre, l'eugénol dérivé de phénylpropane est d'une importance particulière car il a montré une activité antifongique contre une large gamme de différents champignons phytopathogènes (Böhme *et al.*, 2014). Benjilali *et al.* (1986) ont étudié l'activité antifongique des HEs du romarin, du thym, de l'armoise et de l'eucalyptus sur 37champignons dont les genres *Aspergillus*, *Penicillium*, *Alternaria*, *Cladosporium*, *Ulocladium* et d'autres espèces fongiques ; ils ont estimé que l'HE du thym

est la plus active par rapport aux autres. L'essence de thym testée est très phénolée (environ 80 % de carvacrol), celle de l'armoise comporte entre 84 et 94 % de cétones (α-thujone, β-thujone et camphre), les deux autres étant des essences à oxydes: 1,8cinéole notamment. L'oxyde de caryophyllène dans l'HE, et des concentrations élevées de l'acide rosmarinique, l'hespéridine, et carnosol dans les extraits polyphénoliques du romarin, montrent des activités antimicrobienne et antioxydante significativement élevées (Jordán *et al.*, 2013).

Le mode d'action des HEs sur les microorganismes n'est pas clairement déterminé et il a été montré que leur activité antimicrobienne est fonction de leur hydrophobicité et de partition dans les membranes microbiennes. En général, les HEs antimicrobiennes causent des dommages aux structures et aux fonctions des microbes en perturbant la perméabilité de la membrane et l'équilibre osmotique de la cellule. Les composés phénoliques jouent un rôle primordial (Palou *et al.*, 2008; Prakash *et al.*, 2015). En utilisant des HEs d'origan et deux de ses constituants principaux, le thymol et le carvacrol, contre les bactéries, Lambert *et al.* (2001) suggèrent que ces composés altèrent l'intégrité des membranes bactériennes ainsi que des acides nucléiques. L'HE de *Thymus pulegioides* (thymol/carvacrol chémotype) a été rapportée avoir une activité antifongique significative contre différentes espèces d'*Aspergillus*, *Candida* et d'autres dermatophytes. Néanmoins ses composants principaux thymol et carvacrol sont plus actifs et provoquent la formation de lésions dans les membranes cytoplasmiques et une réduction de la teneur en ergostérol (Pinto *et al.*, 2006). L'étude de l'activité antimicrobienne du carvacrol reliée à sa structure chimique par Ben Arfa *et al.* (2006) a soutenu l'hypothèse selon laquelle la caractéristique hydrophobe permet l'accumulation du composé dans la membrane ; la fonction hydroxyle libre s'est avérée essentielle pour l'activité antimicrobienne du carvacrol. Outre son caractère hydrophobe approprié, le carvacrol peut s'accumuler dans la membrane cellulaire et sa capacité de lier l'hydrogène et de libérer le proton peut induire une modification de conformation de la membrane entraînant la mort de la cellule. Une étude récente (da Silva Bomfim *et al.*, 2015) a confirmé que l'HE de *R. officinalis* composé principalement de 1,8 cinéole (52.2%), du camphre (15.2%) et l'α-pinène (12.4%) appliquée à 150 µg/ml a réduit significativement la croissance du mycélium de *Fusarium verticillioides* ; à 300 µg/ml des changements morphologiques importants ont été visualisés au microscope, telles que la rupture de la paroi cellulaire et la fuite du cytoplasme, donc la perte des composants cellulaires. Notre romarin est composé principalement de camphre (41.2%), camphène (18.1%) et α-pinène (17.4%) et a gravement affecté toute les espèces testées du *Fusarium* par technique de fumigation sauf l'espèce *F. culmorum*, donc l'effect antifongique est dépendant de la composition de l'HE d'une part, et de la technique appliquée, d'autre part. Il a été mentionné que les vapeurs de

l'HE ont la capacité d'attaquer le cycle de vie des moisissures à l'étape de germination, ainsi que dans les phases de la croissance hyphale et de la sporulation. L'inactivation des conidies dans l'air par les vapeurs d'HE est un processus clé de l'inhibition, puisque les conidies (aéroportées) sont stables à la chaleur, à la lumière, et aux composés chimiques, étant très difficile à enlever. Cet effet n'a été observé que lors du contact avec les vapeurs des HEs et non dans la forme liquide (Reyes-Jurado *et al.*, 2015).

Bien que la littérature cite les composés phénoliques carvacrol et thymol comme étant responsables de l'activité antimicrobienne du thym, notre HE ne contient aucune trace de ces composés, cependant son efficacité était remarquable par rapport à celle du romarin. Mis à part son effet inhibiteur élevé sur la majorité des champignons testés, l'HE de *T. ciliatus* a marqué un effet fongicide sur 6 champignons par rapport à *R. officinalis* (tableau 9). Ceci montre qu'il y a un effet synergique de tous les composants de l'HE dans son pouvoir antioxydant et antimicrobien.

CONCLUSION GÉNÉRALE

CONCLUSION GENERALE

La sécurité microbienne des aliments continue d'être une préoccupation majeure pour les consommateurs, les organismes de réglementation et les industries alimentaires à travers le monde. Bien que les antimicrobiens synthétiques sont approuvés dans de nombreux pays, la tendance récente a été pour l'utilisation de conservateurs naturels, ce qui nécessite l'exploration de sources alternatives de conservateurs naturels sûrs, efficaces et acceptables. De nombreux extraits de plantes possèdent une activité antimicrobienne contre une gamme de bactéries, de levures et de champignons, mais les variations dans la qualité et la quantité de leurs constituants bioactifs est un inconvénient majeur à leurs utilisations industrielles.

Ce travail a pour objectif de valoriser la flore locale d'intérêt médicinal afin de maintenir les connaissances de la médecine populaire et d'exploiter les ressources végétales de la région d'étude pour la recherche d'alternatives aux pesticides et conservateurs chimiques.

Sur la base d'une enquête éthnobotanique dans la région de M'sila, une liste des labiées utilisées en médecine traditionnelle est dressée dont 2 plantes à hautes fréquences d'utilisation ; *R. officinalis* L. et *T. ciliatus* (Desf.) Benth., poussant spontanément dans la région et riches en huiles essentielles sont choisies pour l'étude des activités antioxydante et antifongique.

En même temps des moisissures de maladies post-récolte sont isolées de fruits et légumes commercialisés au marché local. L'utilisation des techniques d'identification de pitt et Hocking, basée sur des milieux de culture spécifiques, et de la culture sur lame a permis d'identifier des espèces appartenant aux genres importants dont *Aspergillus*, *Penicillium*, *Alternaria*, *Botrytis*, *Fusarium*, *Cladosporium* et *Moniliella*. D'autres moisissures, comportant des souches de référence ont été offertes par 2 laboratoires de recherche. Au total, 32 souches fongiques ont été mises à l'étude de l'activité antifongique des plantes choisies.

L'analyse, des HEs obtenues par hydrodistillation, par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CG-SM), a permis d'identifier les composants chimiques aux niveaux dépassant 97.3 et 95.68% pour le romarin et le thym respectivement. L'HE de *R. officinalis* est composée de 31 éléments dont principalement le camphre (41.2%), camphène (18.1%) et α-pinène (17.4%) ; celle de *T. ciliatus* est composée de 58 éléments dont principalement en pourcentage α-pinène (22.18), myrcène (13.13), β-pinène (7.69), β-caryophyllène (10.23) et germacrène D (9.86). Il est à noter que l'HE de *T. ciliatus*

ne contient que 5.29% monoterpènes oxygénés dont les 2 composés, thymol et carvacrol, reliés au genre *Thymus* sont totalement absents.

La quantification par méthodes spectrophotométriques nous a permis de déterminer les teneurs des plantes étudiées en phénols totaux par le réactif du Folin-Ciocalteu et en flavonoïdes par le trichlorure d'aluminium. Les résultats obtenus ont montré la richesse des extraits méthanoliques en phénols totaux et flavonoïdes par rapport aux HEs ; ce qui est traduit par l'activité antioxydante importante présentée par les extraits méthanoliques, notamment l'extrait de romarin qui s'est avéré le plus puissant, et le plus proche aux antioxydants synthétiques BHA, BHT et acide ascorbique, selon les trois méthodes utilisées ; DPPH (IC_{50}= 13.33 ± 0.13 µg/ml), β-carotène/acide linoléique (IC_{50}= 38.11 ± 2.26µg/ml) et pouvoir réducteur (EC_{50}= 14.03 ± 1.35µg/ml).

L'activité antifongique appliquée *in vitro* selon trois méthodes impliquant l'utilisation de la plante entière sous forme de poudre incorporée dans le milieu de culture, l'extrait méthanolique par la méthode des puits de diffusion et l'application des HEs en différentes concentrations par 2 méthodes à savoir la méthode de fumigation et celle d'incorporation de l'HE dans le milieu de culture. En général, toutes les concentrations appliquées par les différentes méthodes, ont réduit la croissance des champignons testés. Certaines ont réduit significativement ou ont complètement inhibé la croissance.

- L'application de l'extrait méthanolique (à raison de 0.7g/ml) était la moins efficace des méthodes appliquées et a permis de réduire la croissance de 9.38% de l'ensemble des champignons à un niveau supérieur à 50%, pour *R. officinalis* ; l'inhibition par *T. ciliatus* n'a pas atteint 50%.

- L'application de la plante en poudre (à raison de 10%, w/v) a permis de réduire la croissance de 21.88% et 6.25% de l'ensemble des champignons, à un niveau supérieur à 50%, pour *R. officinalis* et *T. ciliatus* respectivement.

- L'application des concentrations croissantes 500, 1000 et 1500µl/l de l'HE par incorporation au milieu de culture a permis de réduire la croissance de plus de 80% de l'ensemble des champignons, à un niveau entre 10 et 100% selon les concentrations. Cinquante pour cent (50%) des champignons ont subi une inhibition allant de 50% à 100% pour la concentration supérieure de *R. officinalis*, et 75% des champignons ont subi une inhibition allant de 50% à 100% pour la concentration supérieure de *T. ciliatus*. La différence significative a été liée à 22 champignons soit 68.75% du total dont 16 (50% du total) parmi eux sont plus sensibles à L'HE du thym.

- L'application des concentrations croissantes 5, 10 et 15µl/boite de l'HE par fumigation a permis de réduire la croissance de plus de 87% de l'ensemble des champignons, à un niveau entre 10 et 100% selon les concentrations. Environ 65% des champignons ont subi une inhibition allant de 50% à 100% pour la concentration supérieure de *R. officinalis*, et 81.25% des champignons ont subi une inhibition allant de 50% à 100% pour les concentrations moyenne et supérieure de *T. ciliatus*. La différence significative a été liée à 25 champignons soit 78.13% du total dont 19 (59.38% du total) parmi eux sont plus sensibles à L'HE du thym.
- On note que l'effet inhibiteur a été accompagné par une diminution légère voire accentuée ou totale de la sporulation, rétrécissement des marges des colonies, excrétion d'exsudats et de pigments sur les colonies et dans le milieu de culture.
- Les HEs appliquées aux différentes concentrations ont été fongicides pour 6 champignons dont *Aspergillus glaucus, Botrytis cinerea, B. aclada, Cladosporium herbarum*, *C. sphaerospermum, Moniliella suaveolens* et *Ulocladium chartarum*.

On peut conclure que l'HE était plus efficace que l'extrait méthanolique et celle de *T. ciliatus* était la plus forte vu que plus de 50% des champignons testés en sont sensibles. Il convient de souligner que l'HE de *T. ciliatus* ne contient aucune trace de thymol et/ou carvacrol; ces deux phénols monoterpéniques sont intimement liés aux espèces de *Thymus* et l'effet antimicrobien en est toujours attribué. Par conséquent notre thym a présenté une particularité antifongique indépendante des autres espèces du thym.

Au cours des dernières années, la nécessité de développer les conservateurs alimentaires à base de plantes comme alternative aux produits chimiques synthétiques pour réduire les pertes qualitatives et quantitatives de produits alimentaires causées par les moisissures, la contamination par les mycotoxines est devenue une priorité des scientifiques du monde entier (Prakash *et al.*, 2015). Dans ce contexte, nos résultats ont révélé une partie du fort potentiel des extraits de plantes pour lutter contre les maladies fongiques dans les aliments. Par conséquent, cela constituera une bio-alternative à l'utilisation de pesticides ou d'agents chimiques de conservation car ces extraits forment des piégeurs naturels de radicaux libres, des antimicrobiens, biodégradables et recommandés. D'autres études sont nécessaires pour trouver les techniques d'application adéquates dans le domaine de sécurité alimentaire. Les recherches futures devraient se concentrer sur l'efficacité des différentes HEs dans diverses matrices alimentaires. La synergie entre les HEs et d'autres composés ou avec d'autres techniques de traitement devra également être étudiée avant d'être appliquée dans le domaine commercial.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Adams, RP. (2007). Identification of essential oil components by gas chromatographic/quadrupole mass spectrometry. Allured Publishing Corporation: Carol Stream, IL, USA.

2. Agrios, G.N. (2005). Plant pathology. Academic Press, 5th ed. eBook ISBN: 9780080473789. 952p.

3. Aidi Wannes, W., Mhamdi, B., Sriti, J., Ben Jemia, M., Ouchikh, O., Hamdaoui, G., Elyes Kchouk, M., Marzouk, B. 2010. Antioxidant activities of the essential oils and methanol extracts from myrtle (*Myrtus communis* var. *italica* L.) leaf, stem and flower. *Food Chem. Toxicol.* 48: 1362–1370.

4. Ak, T. and Gülçın, I. (2008). Antioxidant and radical scavenging properties of curcumin. *Chem-Biol. Interact.*, 174: 27–37.

5. Aktumsek, A., Zengin, G., Guler, G.O., Cakmak, Y.S. and Duran, A. (2013) Assessment of the antioxidant potential and fatty acid composition of four *Centaurea* L. taxa from Turkey. *Food Chem.*, 141: 91–97.

6. Al-Fatimi, M., Wurster, M., Schröder G. and Lindequist, U. (2010). *In vitro* antimicrobial, cytotoxic and radical scavenging activities and chemical constituents of the andemic *Thymus laevigatus* (Vahl). *Rec. Nat. Prod*. 4 (1): 49-63.

7. Ali, S.S., Kasoju, N., Luthra, A., Singh, A., Sharanabasava, H., Sahu, A., Bora, U. (2008). Indian medicinal herbs as sources of antioxidants, a review. *Food Res. Int.*, 41: 1–15.

8. Amarowicz, R., Peggb, R.B., Rahimi-Moghaddam, P., Barld, B., and Weilc, J.A. (2004). Free-radical scavenging capacity and antioxidant activity of selected plant species from the Canadian prairies. *Food Chem.*, 84: 551–562.

9. Amarti, F., Satrani, B., Ghanmi, M., Farah, A., Aafi, A., Aarab, L., El Ajjouri, M., A. Chaouch. (2010). Composition chimique et activité antimicrobienne des huiles essentielles de *Thymus algeriensis* Boiss. & Reut. et *Thymus ciliatus* (Desf.) Benth. du Maroc. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.*, **14**(1): 141-148.

10. Ameziane, N., Boubaker, H., Boudyach, H., Msanda, F., Jilal, A., and Ait Benaoumar, A. (2007). Antifungal activity of Moroccan plants against citrus fruit pathogens. *Agron. Sustain. Dev.,* 27: 273–277.

11. Amrouni, S., Touati, M., Hadef, Y. and Djahoudi, A. (2014). Effet de l'huile essentielle *d'Origanum vulgare* et de *Thymus ciliatus* sur *Pseudomonas aeruginosa* VIM-2 carbapénèmase. *Phytothérapie*, 12: 309-313.

12. Annuaire statistique. (2014). Annuaire statistique. http://www.msila-dz.org/ar/baoff/bibliotheque/fichiers/fle1428570993ANNUAIRE STATISTIQUE_01_.pdf. [Consulté le 03/09/2015].

13. Apisariyakul, A., Vanittanakom, N. and Buddhasukh, D. (1995). Antifungal activity of turmeric oil extracted from *Curcuma longa* (Zingiberaceae). *J. Ethnopharmacol.*, 49:163-169.

14. Askarne, L., Talibi, I., Boubaker, H., Boudyach, E.H., Msanda, F., Saadi, B., Serghini, M.A. and Ait Ben Aoumar, A. (2012). *In vitro* and *in vivo* antifungal activity of several Moroccan plants against *Penicillium italicum*, the causal agent of citrus blue mold. *Crop Prot.*, 40: 53-58.

15. Askarne, L., Talibi, I., Boubaker, H., Boudyach, E.H., Msanda, F., Saadi, B. and Ait Ben Aoumar, A. (2013). Use of Moroccan medicinal plant extracts as botanical fungicide against citrus blue mould. *Lett. Appl. Microbiol.*, 56(1): 37-43.

16. Atik Bekkara, F., Bousmaha, L., Taleb Bendiab, S.A., Boti, J.B. and Casanova, J. (2007). Composition chimique de l'huile essentielle de *Rosmarinus officinalis* L. poussant à l'état spontané et cultivé de la région de Tlemcen. *Biologie et Santé*, 7(1): 6-11.

17. Baba Aissa, F. (1999). Encyclopédie des plantes utiles. Flore d'Algérie et du Maghreb, substances végétales d'Afrique, d'orient et d'occident. EDAS. Alger. 368 p.

18. Bahlouli, F., Tiaiba, A. et Slamani, A. (2008). Etude des différentes méthodes de séchage d'abricot, point sur les méthodes de séchage traditionnelles dans la région du Hodna, wilaya de M'Sila. *Revue des Energies Renouvelables* SMSTS'08. Alger. (2008) : 61 – 66.

19. Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D. and Idaomar, M. (2008). Biological effects of essential oils – A review. *Food Chem. Toxicol.*, 46: 446–475.

20. Bányai, E.S., Tulok, M.H., Hegedûs, A., Renner, C., Varga, I.S. (2003). Antioxidant effect of various rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) clones. *Acta Biol. Szeged.*, 47(1-4):111-113.

21. Basílio, I.J.L.D., Araujo, N.D. and Silva, R.C. (2015). Pharmacobotanical aspects of aromatic plants. Ch., 3. ***In:*** Bioactive Essential Oils and Cancer. D.P. de Sousa (ed.), Springer International Publishing Switzerland 2015. DOI 10.1007/978-3-319-19144-7_4.

22. Beloued, A. (1998). Plantes médicinales d'Algérie. O.P.U. Alger. 277p.

23. Ben Arfa, A., Combes, S., Preziosi-Belloy, L., Gontard, N. and Chalier, P. (2006). Antimicrobial activity of carvacrol related to its chemical structure. *Lett. Appl. Microbiol.*, 43: 149–154.

24. Benjilali, B., Tantaoui-Elaraki, A., Ismaïli-Alaou, M. and Avadi, A. (1986). Méthode d'étude des propriétés antiseptiques des huiles essentielles par contact direct en milieu gélosé. *Plantes médicinales et phytothérapie*, 20 (2) :155-167.

25. Bluma, R. and Etcheverry, M. (2008). Application of essential oils in maize grain: impact on Aspergillus section Flavi growth parameters and aflatoxin accumulation. *Food Microbiol.*, 25, 324e334.

26. Böhme, K., Barros-Velázquez, J., Calo-Mata, P. and Aubourg, S.P. (2014). Antibacterial, Antiviral and antifungal activity of essential oils: mechanisms and applications, Ch.3, *In*: T. G. Villa and P. Veiga-Crespo (eds.), Antimicrobial Compounds, DOI: 10.1007/978-3-642-40444-3_3, Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2014.

27. Botton, B., Breton, A., Fevre, M., Gauthier, S., Guy, P.H., Larpent, J. P., Reymond, P., Sanglier, J.J., Vayssier, Y. and Veau, P. (1990). Moisissures utiles et nuisibles, importance industrielle. Masson 1990. 2e ed. revue et complétée. 512p.

28. Bouchra, C., Achouri, M., Idrissi, H.L.M. and Hmamouchi, M. (2003). Chemical composition and antifungal activity of essential oils of seven Moroccan Labiatae against *Botrytis cinerea* Pers: Fr. *J. Ethnopharmacology*, (89): 165-169.

29. Boudjelal, A., Henchiri, Ch., Siracusa, L., Sari, M. and Ruberto, G. (2012). Compositional analysis and in vivo anti-diabetic activity of wild Algerian *Marrubium vulgare* L. infusion. *Fitoterapia*, 83: 286–292.

30. Boulanouar, B., Abdelaziz, G., Aazza, S., Gago, C. and Miguel, M.G. (2013). Antioxidant activities of eight Algerian plant extracts and two essential oils. *Ind. Crop. Prod.*, 46: 85–96.

31. Boulanouar, B., Abdelaziz, G., Aazza, S., Gago, C., Miguel, M.G. (2013). Antioxidant activities of eight Algerian plant extracts and two essential oils. *Ind. Crop. Prod.*, 46: 85–96.

32. Bourrain, J.-L. (2013). Allergies aux huiles essentielles: aspects pratiques. *Rev. Fr. Allergol.*, 53 S30-S32.

33. Bousbia, N., Abert, M., Ferhat, M., Petitcolas, E., Meklati, B. and Chemat, F. (2009). Comparison of two isolation methods for essential oil from rosemary leaves: Hydrodistillation and microwave hydrodiffusion and gravity. *Food Chem.*, 114: 355-362.

34. Bousmaha-Marroki, L., Atik-Bekkara, F., Tomi, F. and Casanova, J. (2007). Chemical Composition and Antibacterial Activity of the Essential Oil of *Thymus ciliatus* (Desf.) Benth. ssp. *eu-ciliatus* Maire from Algeria. *J. Essent. Oil Res.*, 19 (5): 490-493.

35. Boutekedjiret, C., Bentahar, F., Belabbes, R. and Bessiere, J.M. (1998). The essential oil from *Rosmarinus officinalis* L. in Algeria. *J. Essent. Oil Res.*, 10(6): 680-682.

36. Boutekedjiret, C., Bentahar, F., Belabbes, R. and Bessiere, J.M. (2003). Extraction of rosemary essential oil by steam distillation and hydrodistillation. *Flavour Frag. J.*, 18: 481-484.

37. Burt, S. (2004). Essential oils: Their antibacterial properties and potential applications in foods – A review. *Int. J. Food Microbiol.*, 94: 223-53.

38. Charles, D.J. (2013). Thyme, Ch. 54, ***In***: Charles, D.J., Antioxidant Properties of Spices, Herbs and Other Sources, pp.553 – 561. DOI 10.1007/978-1-4614-4310-0_54, Springer Science+Business Media New York 2013 ISBN 978-1-4614-4309-4 ISBN 978-1-4614-4310-0 (eBook).

39. Chiasson, H. et Beloin, N. (2007). Les huiles essentielles, des biopesticides « nouveau genre ». *Antennae*, 14(1):3-6.

40. Choi, C.W., Kim, S.C., Hwang, S.S., Choi, B.K., Ahn, H.J., Lee, M.Y., Park, S.H. and Kim, S.K., (2002). Antioxidant activity and free radical scavenging capacity between Korean medicinal plants and flavonoids by assay-guided comparison. *Plant sci.*, 163: 1161-1168.

41. Campbell, C.K., Johnson, E.M., and Warnock, D.W. (2013). Identification of pathogenic fungi, 2nd Ed. Wiley-Blackwell. 350 p.

42. Da Silva Bomfim, N., Nakassugi, L.P., Oliveira, J.F.P., Kohiyama, C.Y., Mossini, S.A.G., Grespan, R., Nerilo, S.B., Mallmann, C.A., Filho, B. A. A. and Machinski Jr., M. (2015). Antifungal activity and inhibition of fumonisin production by *Rosmarinus officinalis* L. essential oil in *Fusarium verticillioides* (Sacc.) Nirenberg. *Food Chem.*, 166: 330–336.

43. Deravel, J., Krier, F. and Jacques, P. (2014). Les biopesticides, compléments et alternatives aux produits phytosanitaires chimiques (synthèse bibliographique). *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.*, 18 (2): 220-232.

44. Dijksterhuis, J., Houbraken, J., Samson, R.A. (2013). Fungal Spoilage of Crops and Food, Ch.2, In: F. Kempken (Ed.), Agricultural Applications, 2nd Ed. The Mycota XI. Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2013.

45. Djeddi, S., Bouchenah, N., Settar, I. and Skaltsa, H.D. (2007). Composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Rosmarinus officinalis* from Algeria. *Chem. Nat. Compd.*, 43(4): 487-490.

46. Djeridane, A., Yousfi, M., Nadjemi, B., Boutassouna, D., Stocker, P. and Vidal N. (2006). Antioxidant activity of some Algerian medicinal plants extracts containing phenolic compounds. *Food Chem.*, 97:654-660.

47. El Bouzidi, L., Jamali, C.A., Bekkouche, K., Hassani, L., Wohlmuth, H., Leach, D., Abbad, A. (2013). Chemical composition, antioxidant and antimicrobial activities of essential oils obtained from wild and cultivated Moroccan Thymus species. *Ind. Crop. Prod.*, 43: 450–456.

48. El Ouariachi, E-M., Hamdani, I., Bouyanzer, A., Hammouti, B., Majidi, L., Costa, J., Paolini, J., Chetouani, A. (2014). Chemical composition and antioxidant activity of essential oils of *Thymus broussonetii* Boiss. and *Thymus algeriensis* Boiss. from Morocco. *Asian. Pac. J. Trop. Dis.*, 4(4): 281-286.

49. El-Nekeety, AA., Mohamed, S.R., Hathout, A.S., Hassan, N.S., Aly, S.E. and Abdel-Wahhab, M.A. (2011). Antioxidant properties of *Thymus vulgaris* oil against aflatoxin-induce oxidative stress in male rats. *Toxicon*, 57: 984–991.

50. Erkan, N., Ayranci, G., and Ayranci, E., (2008). Antioxidant activities of rosemary (*Rosmarinus Officinalis* L.) extract, blackseed (*Nigella sativa* L.) essential oil, carnosic acid, rosmarinic acid and sesamol. *Food Chem.*, 110: 76-82.

51. Esmaeili, M.A. and Sonboli, A. (2010). Antioxidant, free radical scavenging activities of *Salvia brachyantha* and its protective effect against oxidative cardiac cell injury. *Food Chem. Toxicol.*, 48: 846-853.

52. Feliachi, K. (2003). Rapport National Sur les Ressources Génétiques Animales en Algérie. Octobre 2003.46p.

53. Feng, W., Chen, J., Zheng, X. and Liu, Q. (2011). Thyme oil to control *Alternaria alternata in vitro* and *in vivo* as fumigant and contact treatments. *Food Control*, 22: 78-81.

54. Ferhat, M., Ghorab, H., Laggoune, S., Ghannadi, A., Sajjadi, S. E., Touzani, R., Kabouche, A. and Z. Kabouche. (2014). Composition and antioxidant activity of the essential oil of *thymus dreatensis* from Algeria. *Chem. Nat. Compd.*, 50(4): 747-749.

55. Filtenborg, O.J., Frisvad, C. and Thrane, U. (1996). Moulds in food spoilage. *Int. J. Food Microbiol.*, 33: 85-102.

56. Gemeda, N., Woldeamanuel, Y., Asrat, D., and Debella, A. (2014). Effect of essential oils on Aspergillus spore germination, growth and mycotoxin production: a potential source of botanical food preservative. *Asian Pac. J. Trop. Biomed.*, (4) (Suppl 1): S373-S381.

57. Ghasemi, A.P., Hamedi, B., Abdizadeh, R., and Malekpoor, F. (2011). Antifungal activity of the essential oil of Iranian medicinal plants. *J. Med. Plants Res.*; 5: 5089-5093.

58. Ghorab, H., Kabouche, A., Kabouche, Z. (2014). Comparative compositions of essential oils of *Thymus* growing in various soils and climates of North Africa. *J. Mater. Environ. Sci.* 5 (1): 298-303.

59. Ghorab, H., Kabouche, A., Semra, Z., Ghannadi; A., Sajjadi, E.B., Touzani, R., and Kabouche, Z. (2013). Biological activities and compositions of the essential oil of *Thymus ciliatus* from Algeria. *Der Pharmacia Lettre*, 5 (1): 28-32.

60. Giordani, R., Hadef, Y. and Kaloustian, J. (2008). Compositions and antifungal activities of essential oils of some Algerian aromatic plants. *Fitoterapia*, 79: 199-203.

61. Goetz, P. et Ghédira K. (2012). Phytothérapie anti-infectieuse. Springer ed. 382 p. ISBN: 978-2-8178-0057-8 Springer Paris Berlin Heidelberg New York. Springer-Verlag France, Paris, 2012.

62. Gülçin, I., Sat, I.G., Beydemir, S., Elmastas, M., Kufrevioglu, O.I. (2004). Comparison of antioxidant activity of clove (*Eugenia caryophylata* Thunb) buds and lavender (*Lavandula stoechas* L.). *Food Chem.*, 87: 393–400.

63. Haddouchi, F., Lazouni, H.A., Meziane, A. and Benmansour, A. (2009). Etude physicochimique et microbiologique de l'huile essentielle de *Thymus fontanesii* Boiss & Reut. *Afrique science*, 05(2): 246-259.

64. Hanamanthagouda, M.A., Kakkalameli, S.B., Naik, P.M., Nagella, P., Seetharamareddy, H.R. and Murthy, H.N. (2010). Essential oils of Lavandula bipinnata and their antimicrobial activities. *Food Chem.*, (118): 836–839.

65. Harley, R.M., Atkins, S., Budantsev, A.L., Cantino, P.D., Conn, B.J., Grayer, R., Harley, M.M., de Kok, R., Krestovskaja, T., Morales, R., Paton, A.J., Ryding, O. and Upson, T. (2004). Labiatae, ***In:*** J. W. Kadereit (ed.), Volume VII. Flowering plants. Dicotyledons: Lamiales (except Acanthaceae including Avicenniaceae). Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2004.

66. Hazzit, M., Baaliouamer, A, Veríssimo, A.R., Faleiro, M.L. and Miguel, M.G. (2009). Chemical composition and biological activities of Algerian *Thymus* oils. *Food Chem.*, 116: 714–721.

67. Hazzit, M., Baaliouamer, A., and Douar-Latreche, S. (2013). Effect of heat treatment on the chemical composition and the antioxidant activity of essential oil of *Thymus pallescens* de Noé from Algeria, *J. Essential Oil Res.*, 25 (4): 308-314.

68. Heinrich, M. (2000). Ethnobotany and its Role in Drug Development. *Phytother. Res.*, 14: 479–488.

69. Hussain, A. I., Anwar, F., Chatha, S. A.S., Jabbar, A., Mahboob,S., Nigam, P.S. (2010). *Rosmarinus officinalis* essential oil: antiproliferative, antioxidant and antibacterial activities. *Braz. J. Microbiol.*, 41: 1070-1078.

70. IUCN (International Union for Conservation of Nature and Natural Resources). (2005). A Guide to Medicinal Plants in North Africa. Málaga: IUCN Centre for Mediterranean Cooperation Ed. 256p. ISBN: 2-8317-0893-1.

71. Ivancheva, S. and Stantcheva, B. (2000). Ethnobotanical inventory of medicinal plants in Bulgaria. *J. Ethnopharmacol.*, 69:165–172.

72. Jaafari, A., Ait Mouse, H., El Mostapha, R., Ait M'barek, L., Tilaoui1, M., Benbakhta, C., Boulli, A., Abbad, A. and Zyad, A. (2007). Chemical composition and antitumor activity of different wild varieties of Moroccan thyme. *Braz. J. Pharmacogn.*, 17(4): 477-491.

73. Jamali, C.A.; El Bouzidi, L.; Bekkouche, K.; Lahcen, H.; Markouk, M.; Wohlmuth, H.; Leach, D.; Abbad, A. (2012). Chemical composition and antioxidant and anticandidal activities of essential oils from different wild Moroccan *Thymus* species. *Chem. Biodiversity*, (9): 1188-1197.

74. Jamshidi, R., Afzali, Z. and Afzali, D. (2009). Chemical composition of hydrodistillation essential oil of rosemary in different origins in Iran and comparison with other countries. *Am. Eurasian J. Agric. Environ. Sci.*, 5(1): 78-81.

75. Jordán, M.J., Lax, V., Rota, M.C., Lorán, S. and Sotomayor, J.A. (2013). Effect of the phenological stage on the chemical composition, and antimicrobial and antioxidant properties of *Rosmarinus officinalis* L. ssential oil and its polyphenolic extract. *Ind. Crop. Prod.*, 48: 144–152.

76. Kabouche, A.; Ghannadi, A.; Kabouche, Z. (2009). *Thymus ciliatus* – The highest thymol containing essential oil of the genus. *Nat. Prod. Commun.*, 4(9): 1251-1252.

77. Kadoglidou, K., Lagopodi, A., Karamanoli, K., Vokou, D., Bardas, G.A., Menexes, G.and Constantinidou, H.A. (2011). Inhibitory and stimulatory effects of essential oils and individual monoterpenoids on growth and sporulation of four soil-borne fungal isolates of *Aspergillus terreus*, *Fusarium oxysporum*, *Penicillium expansum*, and *Verticillium dahlia*. *Eur. J. Plant Pathol.*, (130): 297–309.

78. Kasrati, A., Jamali, C.A., Fadli, M., Bekkouche, K., Hassani, L., Wohlmuth, H., Leach, D., Abbad, A. (2014). Antioxidative activity and synergistic effect of *Thymus saturejoides* Coss. essential oils with cefixime against selected food-borne bacteria. *Ind. Crop. Prod.*, 61: 338–344.

79. Khan, M.S.A. and Ahmad, I. (2011). *In vitro* antifungal, anti-elastase and anti-keratinase activity of essential oils of *Cinnamomum*-, *Syzygium*- and *Cymbopogon*-

species against *Aspergillus fumigatus* and *Trichophyton rubrum*. *Phytomedicine*, (19): 48–55.

80. Khlifi, D., Sghaier, R., Amouri, S., Laouini, D., Hamdi, M., and Bouajila, J. (2013). Composition and antioxidant, anticancer and antiinflammatory activities of *Artemisia herba alba*, *Ruta chalpensis* L. and *Peganum harmala* L. *Food Chem. Toxicol.*, 55: 202-208.

81. Kholkhal, F., Lazouni, H.A., Bendahou, M., Boublenza, I., Chabane, S.D., and Chaouch, T. (2013). Étude phytochimique et évaluation de l'activité anti-oxydante de *Thymus ciliatus* ssp. *coloratus*. *Afrique Science*, 09 (1): 151–158.

82. Kocić-Tamackov, S.D. and Dimić, G.R. (2013). Antifugal activity of essential oils in the control of foodborne fungi growth and mycotoxine biosynthesis in food. *In* A. Méndez-Vilas (Eds). Microbial pathogens and strategies for combating them: science, technology and education, p. 838-849.

83. Kontogianni, V. G., Tomic, G., Nikolic, I., Nerantzaki, A. A., Sayyad, N., Grujicic, S. S., Stojanovic, I., Gerothanassis, I. P., Tzakos, A. G. (2013). Phytochemical profile of *Rosmarinus officinalis* and *Salvia officinalis* extracts and correlation to their antioxidant and anti-proliferative activity. *Food Chem.*, 136: 120–129.

84. Krishnaiah, D., Sarbatly, R., Nithyanandam, R. (2011). A review of the antioxidant potential of medicinal plant species. *Food Bioprod. Process.*, 89: 217–233.

85. Kulisić, T., Krisko, A., Dragović-Uzelac, V., Milos, M., Pifat, G. (2007). The effects of essential oils and aqueous tea infusions of oregano (*Origanum vulgare* L. spp. *hirtum*), thyme (*Thymus vulgaris* L.) and wild thyme (*Thymus serpyllum* L.) on the copper-induced oxidation of human lowdensity lipoproteins. *Int. J. Food Sci. Nutr.,* 58(2): 87–93.

86. Lahlou, M. (2004). Essential oils and fragrance compounds: bioactivity and mechanisms of action. *Flavour Fragr. J.*, 19: 159–165.

87. Lambert, R.J.W., Skandamis, P.N., Coote, P.J. and Nychas, G. (2001). A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. *J. Appl. Microbiol.*, 91:453–462.

88. Lardry, J.-M. et Haberkorn, V. (2007). L'aromathérapie et les huiles essentielles. *Kinesither Rev.*, 61:14-17.

89. Le Houerou, H.N. (1977). Études bioclimatiques des steppes algériennes. *Bull Soc His Nat Afr Nord, Alger.* 68: 33-74.

90. Leslie, J. F., and Summerell, B. A. (2006). The Fusarium Laboratory Manual. 1st ed. 2006 Blackwell Publishing. 388p.

91. Lopez, A.G., Theumer, M.G., Zygadlo, J.A. and Rubinstein, H.R. (2004). Aromatic plants essential oils activity on Fusarium verticillioides Fumonisin B1 production in corn grain. *Mycopathologia*, (158): 343–349.

92. Maire, R. (1952-1987) : Flore de l'Afrique du Nord (Maroc, Algérie, Tunisie ; Tripolitaine, Cyrénaïque et Sahara, 16 vol. Paris : éditions Le Chevalier.

93. Manganyi, M.C., Regnier, T. and Olivier, E.I. (2015). Antimicrobial activities of selected essential oils against Fusarium oxysporum isolates and their biofilms. *S. Afr. J. Bot.*, 99: 115–121

94. Marandi, R.J., Hassani, A., Ghosta, Y., Abdollahi, A., Pirzad, A. and Sefidkon, F. (2011). Control of *Penicillium expansum* and *Botrytis cinerea* on pear with *Thymus kotschyanus*, *Ocimum basilicum* and *Rosmarinus officinalis* essential oils. *J. Med. Plant. Res.*, 5(4): 626-634.

95. Martínez, J.A. (2012). Natural Fungicides Obtained from Plants, Fungicides for Plant and Animal Diseases, Dr. Dharumadurai Dhanasekaran (Ed.), ISBN: 978-953-307-804-5, InTech.

96. Matkowski, A., Tasarz, P. and Szypuła, E. (2008). Antioxidant activity of herb extracts from five medicinal plants from *Lamiaceae*, subfamily *Lamioideae*. *J. Med. Plant. Res.*, 2: 321-330.

97. Mehdiou, R. et Kahouadji, A. (2007). Etude ethnobotanique auprès de la population riveraine de la forêt d'Amsittène: cas de la Commune d'Imi n'Tlit (Province d'Essaouira). Bulletin de l'Institut Scientifique, Rabat, section Sciences de la Vie, n°29 : 11-20.

98. Messiaen, C.M., Blancard, D., Rouxel, F. and Lafon, R. (1991). Les maladies des plantes maraîchères, 3 Ed. INRA, Paris, 1991. 555p.

99. Miladi, H., Ben Slama, R., Mili, D., Zouari, S., Bakhrouf, A., Ammar, E. (2013). Essential oil of *Thymus vulgaris* L. and *Rosmarinus officinalis* L.: Gas chromatography-mass spectrometry analysis, cytotoxicity and antioxidant properties and antibacterial activities against foodborne pathogens. *Nat. Sci.*, 5: 729-739.

100. Mishra, J., Tewari, S., Singh, S., and Arora, N. K.(2015). Biopesticides: where we stand?, Ch. 2, ***In*:** N.K. Arora (Ed.), Plant microbes symbiosis: applied facets, DOI 10.1007/978-81-322-2068-8_2, Springer India 2015.

101. Moreira, M. R., Alvarez, M.V. and Ponce, A.G. (2016). Essential Oils, Ch. 7, ***In*:** M.W. Siddiqui *et al.* (Eds.), Postharvest management approaches for maintaining quality of fresh produce, DOI: 10.1007/978-3-319-23582-0_7. Springer International Publishing Switzerland 2016.

102. Moreno, S., Ojeda Sana, M.A., Gaya, M., Barni, M.V., O.A. Castro, and van Baren, C. (2012). Rosemary compounds as nutraceutical health products, Ch.9, ***In***: Food Additive, Prof. Yehia El Samragy (Ed.), ISBN: 978-953-51-0067-6, InTech, DOI: 10.5772/1521.

103. Moreno, S., Scheyer, T., Romano, C.S. and Vojnov, A.A. (2006). Antioxidant and antimicrobial activities of rosemary extracts linked to their polyphenol composition. *Free Radical Res.*, 40: 223-231.

104. Nanasombat, S. and Wimuttigosol, P. (2011) Antimicrobial and antioxidant activity of spice essential oils. *Food Sci. Biotechnol.*, 20 (1): 45-53.

105. Napoli, E.M., Curcuruto, G. and Ruberto, G. (2010). Screening of the essential oil composition of wild Sicilian rosemary. *Biochem. Syst. Ecol.*, 38: 659–670.

106. Nickavar, B. and Esbati, N. (2012). Evaluation of the antioxidant capacity and phenolic content of three *Thymus* Species. *J. Acupunct. Meridian. Stud.*, 5(3): 119-125.

107. Nickavar, B., Mojab, F., and Dolat-Abadi, R. (2005). Analysis of the essential oils of two *Thymus* species from Iran. *Food Chem.*, 90: 609–611.

108. Nieto, G., Huvaere, K. and Skibsted, L.H. (2011). Antioxidant activity of rosemary and thyme by-products and synergism with added antioxidant in a liposome system. *Eur. Food Res. Technol.*, 233:11–18.

109. Ojeda-Sana, A.M., Van Baren, C.M., Elechosa, A.M., Juárez, M.A. and Moreno, S. (2013). New insights into antibacterial and antioxidant activities of rosemary essential oils and their main components. *Food Control*, 31: 189-195.

110. Okoh, O.O., Sadimenko, A.P. and Afolayan, A.J. (2011). Antioxidant activities of *Rosmarinus officinalis* L. essential oil obtained by hydrodistillation and solvent free microwave extraction. *Afr. J. Biotechnol.*, 10: 4207-4211.

111. Ouibrahim, A., Tlili-Ait-kaki, Y., Bennadja, S., Amrouni, S., Djahoudi, A. G. and Djebar, M.R. (2013). Evaluation of antibacterial activity of *Laurus nobilis* L., *Rosmarinus officinalis* L. and *Ocimum basilicum* L. from Northeast of Algeria. *Afr. J. Microbiol. Res.*, 7(42): 4968-4973.

112. Ozenda, P. (1983) : Flore du Sahara septentrional. Ed CNRS, Paris, 486 p.

113. Palou, L., Smilanick, J.L. and Droby, S. (2008). Alternatives to conventional fungicides for the control of citrus postharvest green and blue moulds. *Stewart Postharvest Review*, 4(2): 1-16.

114. Passone, M.A. and Etcheverry, M. (2014). Antifungal impact of volatile fractions of Peumus boldus and Lippia turbinata on Aspergillus section Flavi and residual levels of these oils in irradiated peanut. *Int. J. Food Microbiol.*, (168–169): 17–23.

115. Passone, M.A., Girardi, N.S., Etcheverry, M. (2013). Antifungal and antiaflatoxigenic activity by vapor contact of three essential oils, and effects of environmental factors on their efficacy. *LWT-Food Sci. Technol.*, (53): 434–444.

116. Pérez, J. A. M. and Aguilar, T. A. F. (2013). Chemistry of natural antioxidants and studies performed with different plants collected in Mexico, oxidative stress and chronic degenerative diseases - A Role for antioxidants, Dr. Jose Antonio Morales-Gonzalez (Ed.), ISBN: 978-953-51-1123-8, InTech, DOI: 10.5772/52247.

117. Pfohl-Leszkowicz, A. (2009). Mycotoxines : facteur de risque de cancers. *J. Afr. Cancer*, 1:42-55.

118. Pinto, E., Pina-vaz, C., Salgueiro, L., Concalves, M.J., de Oliveira, C., Cavaleiro, C., Palmeira, A., Rodrigues, A.and de Oliveira, J.M. (2006) Antifungal activity of the essential oil of *Thymus pulegioides* on *Candida*, *Aspergillus* and dermatophyte species. *J. Med. Microbiol.*, 55:1367–1373.

119. Pitt, J.I. and Hocking, A.D. (2009). Fungi and Food Spoilage, 3rd Ed. Springer Dordrecht, Heidelberg, London, New York. 524p.

120. Prakash, B., Kedia, A., Mishra, P.K. and Dubey, N.K. (2015). Plant essential oils as food preservatives to control moulds, mycotoxin contamination and oxidative deterioration of agrifood commodities - Potentials and challenges. *Food Control*, 47: 381-391.

121. Prakash, B., Singh, P., Kedia, A. and Dubey, N.K. (2012). Assessment of some essential oils as food preservatives based on antifungal, antiaflatoxin, antioxidant activities and *in vivo* efficacy in food system. *Food Res. Int.*, 49: 201-208.

122. Prescott, M., Harley, J.P., Klein, D.A., Bacq-Calberg, C-M., Dusart, J. (2003). Microbiologie. Traduit par C-M. Bacq-Calberg, J. Dusart. 2 Ed. De Boeck Université. ISBN 2804142566, 9782804142568.1164 p.

123. Prieto, J.A., Patiño, O.J., Plazas, E.A., Pabón, L.C., Ávila, M.C., Guzmán, J.D., Delgado, W.A., and Cuca, L.E. (2013). Natural products from plants as potential source agents for controlling *Fusarium*, ***In***: Mizuho Nita (Ed.), Fungicides - Showcases of Integrated Plant Disease Management from Around the World. ISBN: 978-953-51-1130-6, InTech, DOI: 10.5772/52338.

124. Quezel, P. et Santa, S. (1963). Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales. Paris, Tome 2. Ed CNRS, Paris. 781-819 pp.

125. Rababah, T.M., Hettiarachchy, N.S. and Horax, R. (2004). Total phenolics and antioxidant activities of fenugreek, green tea, black tea, grape seed, ginger, rosemary, gotu kola, and ginkgo extracts, vitamin E, and *tert*-Butylhydroquinone. *J. Agric. Food Chem.*, 52 (16): 5183-5186.

126. Rasooli, I., Rezaei, M.B. and Allameh, A. (2006). Ultrastructural studies on antimicrobial efficacy of thyme essential oils on *Listeria monocytogenes*. *Int. J. Infect. Dis.,* 10: 236-241.

127. Reyes-Jurado, F., Franco-Vega, A., Ramirez-Corona, N., Palou, E. and Lo ´pez-Malo, A. (2015). Essential oils: Antimicrobial activities, extraction methods, and their modeling. *Food Eng. Rev.*, (7): 275–297.

128. Rokaya, M. B., Münzbergová, Z., and Timsinac, B. (2010). Ethnobotanical study of medicinal plants from the Humla district of western Nepal. *J. Ethnopharmacol.*, 130: 485–504.

129. Ruberto, G. and Baratta, M.T. (2000). Antioxidant activity of selected essential oil components in two lipid model systems. *Food Chem.*, 69: 167-174.

130. Ruiz-Navajas, Y., Viuda-Martos, M., Sendra, E., Perez-Alvarez, J.A., Fernández-López, J. (2013). *In vitro* antibacterial and antioxidant properties of chitosan edible films incorporated with *Thymus moroderi* or *Thymus piperella* essential oils. *Food Control,* 30: 386-392.

131. Runa, F., Park, M.S. and Pryor, B.M. (2009). *Ulocladium* systematics revisited: phylogeny and taxonomic status. *Mycol. Progress*, 8:35–47.

132. Saeed, N., Khan, M. R. and Shabbir, M. (2012). Antioxidant activity, total phenolic and total flavonoid contents of whole plant extracts *Torilis leptophylla* L. *BMC Complem. Altern. Med.,* (12): 221-232.

133. Şahin, F., Güllüce, M., Daferera, D., Sökmen, A., Sökmen, M., Polissiou, M., Agar, G.and Ozer, H. (2004). Biological activities of the essential oils and methanol extract of Origanum vulgare ssp. vulgare in the Eastern Anatolia region of Turkey. *Food Control*, (15): 549–557.

134. Samson, R.A. and Pitt, J.I. (1990). Modern Concepts in Penicillium and Aspergillus Classification. Samson, R.A. and Pitt, J.I. Ed. Springer Science +Business Media, LLC. ISBN 978-1-4899-3579-3 (eBook). 478p.

135. Sanchez-Gonzalez, L., Vargas, M., Gonzalez-Martinez, C., Chafer, M. and Chiralt, A. (2011). Use of essentail oils in bioactive edible coatings - a review. *Food Eng. Rev.*, 3: 1-16.

136. Santos, R.D., Shetty, K., Cecchini, A.L., Miglioranza. L.H.S. (2012). Phenolic compounds and total antioxidant activity determination in rosemary and oregano extracts and its use in cheese spread. *Semina: Ciências Agrárias*, 33(2): 655-666.

137. Sari, M., Hendel, N., Boudjelal, A., and Sarri, D. (2012). Inventory of medicinal plants used for traditional treatment of eczema in the region of Hodna (M'sila - Algeria). *G.J.R.M.I.*, 1(4): 97 – 100.

138. Scartezzini, P., Speroni, E. (2000). Review on some plants of Indian traditional medicine with antioxidant activity, Review. *J. Ethnopharmacol.*, 71: 23–43.

139. Shahsavari, N., Barzegar, M., Sahari, M.A. and Naghdibadi, H. (2008). Antioxidant Activity and Chemical Characterization of Essential Oil of Bunium persicum. *Plant Foods Hum. Nutr.*, 63:183–188.

140. Shukla, R., Singh, P., Prakash, B. and Dubey, N.K. (2012). Antifungal, aflatoxin inhibition and antioxidant activity of *Callistemon lanceolatus* (Sm.) Sweet essential oil and its major component 1,8-cineole against fungal isolates from chickpea seeds. *Food Control*, 25: 27-33.

141. Singh, R. P. and Anderson, B. A. (2004). The major types of food spoilage: an overview, Ch.1, In: R. Steele (Ed.), Understanding and measuring the shelf-life of food, Woodhead Publishing Limited and CRC Press LLC, 2004. 448 p.

142. Singh, T. and Singh, A.P. (2012). A review on natural products as wood protectant. *Wood Sci. Technol.*, 46: 851–870.

143. Soliman, K. M., and Badeaa, R. I. (2002). Effect of oil extracted from some medicinal plants on different mycotoxigenic fungi. *Food Chem. Toxicol.*, 40: 1669-1675.

144. Sourov, K., Mustahsan, B., Masud, R., Zannatul, N., Mahmodul, I., Hasanuzzaman, Md., Ramjan, A. and Rana, B. (2014). Phytochemical and *in vitro* biological investigations of methanolic extracts of *Enhydra fluctuans* Lour. *Asian Pac. J. Trop. Biomed.*, 4: 299-305.

145. Stankovic, M. S., Topuzovic, M., Solujic, S. and Mihailovic, V. (2010). Antioxidant activity and concentration of phenols and flavonoids in the whole plant and plant parts of *Teucrium chamaerdys* L. var. *glanduliferum Haussk. J. Med. Plant Res.*, 4(20): 2092-2098.

146. T.A.D - CONSULT– EURL. Territoire. Aménagement. Développement. (2008). Bureau d'Ingénierie et d'études Techniques. Etude relative à la caractérisation et à la délimitation des zones de montagne et des massifs montagneux « Massif du Hodna – Phase II ».

147. Tabassum, N. and Vidyasagar, G. M. (2013). Antifungal investigations on plant essential oils. A review. *Int. J. Pharm. Pharm .Sci.*, Vol 5, Suppl. 2: 19-28.

148. Taleb-Senouci, D., Ghomari, H., Krouf, D., Bouderbala, J., Prost, J., Lacaille-Dubois, M.A. and Bouchenaka, M. (2009). Antioxidant effect of *Ajuga iva* aqueous extract in streptozotocin-induced diabetic rats. *Phytomedicine*, 16 (6-7): 623-31.

149. Tampieri, M.P., Galuppi, R., Macchioni, F., Carelle, M.S., Falcioni, L., Cioni, P.L. and Morelli, I. (2005). The inhibition of Candida albicans by selected essential oils and their major components. *Mycopathologia*, (159): 339–345.

150. Tefiani, C., Riazi, A., Youcefi, F., Aazza, S., Gago, Faleiro, C., M.L., Pedro, L.G., Barroso, J.G., Figueiredo, A.C., Megías, C., Cortés-Giraldo, I., Vioque, J., and Miguel, M.G. (2015). *Ammoides pusilla* (Apiaceae) and *Thymus munbyanus* (Lamiaceae) from Algeria essential oils: Chemical composition, antimicrobial, antioxidant and antiproliferative activities. *J. Ess. Oil Res.*, 27 (2):131-139.

151. Tepe, B., Daferera, D., Sokmen, A., Sokmen, M., and Polissiou, M. (2005). Antimicrobial and antioxidant activities of the essential oil and various extracts of *Salvia tomentosa* Miller (Lamiaceae). *Food Chem.*, 90: 333-340.

152. Tohidpour, A., Sattari, M., Omidbaigi, R., Yadegar, A., Nazemi, J.(2010). Antibacterial effect of essential oils from two medicinal plants against Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Phytomedicine*, 17: 142–145.

153. Tullio, V., Nostro, A., Mandras, N., Dugo, P., Banche, G. and Cannatelli, M.A. (2007). Antifungal activity of essential oils against filamentous fungi determined by broth microdilution and vapour contact methods. *J. Appl. Microbiol.*, 102:1544-1550.

154. Wang, W., Wu, N., Zu, Y.G. and Fu, Y.J. (2008). Antioxidative activity of *Rosmarinus officinalis* L. essential oil compared to its main components. *Food Chem.*, 108: 1019-1022.

155. Wang, Y., Pei, Y.F., Zhang, K. and Zhang, X.G. (2009). Molecular and morphological description of a new species of *Ulocladium* from Southern China. *Mycol. Progress*, 8: 207–214.

156. Watanabe, T. (2002). Pictorial Atlas of Soil and Seed Fungi; Morphologies of Cultured Fungi and Key to Species. 2nd Ed. CRC Press. 486p.

157. Webster, J. and Weber, R. (2007). Introduction to Fungi. 3rd Ed. Cambridge. ISBN: 9780521014830.

158. Wojdyło, A., Oszmianskii, J. and Czemerys, R. (2007). Antioxidant activity and phenolic compounds in 32 selected herbs. *Food Chem.*, 105: 940-949.

159. Yesil-Celiktas, O., Girgin, G., Orhan, H., Wichers, H.J., Bedir, E.and Vardar-Sukan, F. (2007). Screening of free radical scavenging capacity and antioxidant activities of

Rosmarinus fficinalis extracts with focus on location and harvesting times. *Eur. Food Res. Technol.*, 224: 443-51.

160. Yigit, F., Ozcan, M. and Akgul, A. (2000). Inhibitory effect of some spice essential oils on *Penicillium digitatum* causing postharvest rot in citrus. *Grasas y Aceites*, 51(4): 237-240.

161. Zabka, M., Pavela, R. and Slezakova, L. (2009). Antifungal effect of *Pimenta dioica* essential oil against dangerous pathogenic and toxinogenic fungi. *Ind. Crop. Prod.*, 30: 250-253.

162. Zaouali, Y., Bouzaine, T. and Boussaid, M. (2010). Essential oils composition in two *Rosmarinus officinalis* L. varieties and incidence for antimicrobial and antioxidant activities. *Food Chem. Toxicol.*, 48: 3144-3152.

163. Zengin, G., Cakmak, Y.S., Guler, G.O., Aktumsek, A. (2010). *In vitro* antioxidant capacities and fatty acid compositions of three *Centaurea* species collected from Central Anatolia region of Turkey. *Food Chem. Toxicol.*, 48: 2638–2641.

164. Zerroug, M.M., Zouaghi, M., Boumerfeg, S., Baghiani, A., Nicklin, J. and Arrar, L. (2011). Antibacterial Activity of Extracts of *Ajuga Iva*, and *Teucrium Polium*. *Adv. Environ. Biol.*, 5(2): 491- 495.

165. Zouari, N., Fakhfakh, N., Zouari, S., Bougatef, A., Karray, A., Neffati, M. and Ayadi, M.A. (2011). Chemical composition, angiotensin I-converting enzyme inhibitory, antioxidant and antimicrobial activities of essential oil of Tunisian *Thymus algeriensis* Boiss. et Reut. (Lamiaceae). *Food Bioprod. Process.*, 89: 257-265.

ANNEXES

ANNEXE I

PROFILS CHROMATOGRAPHIQUES

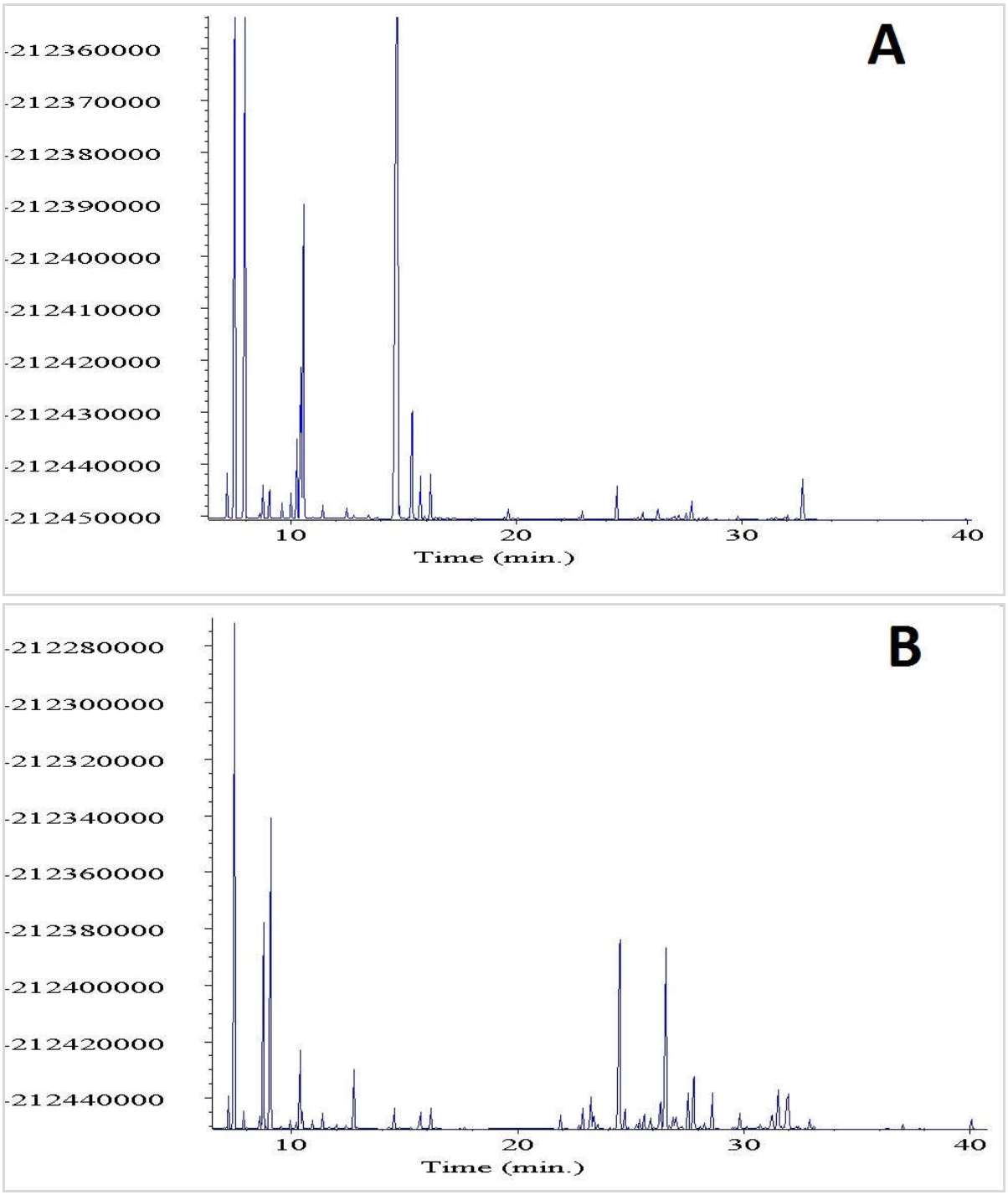
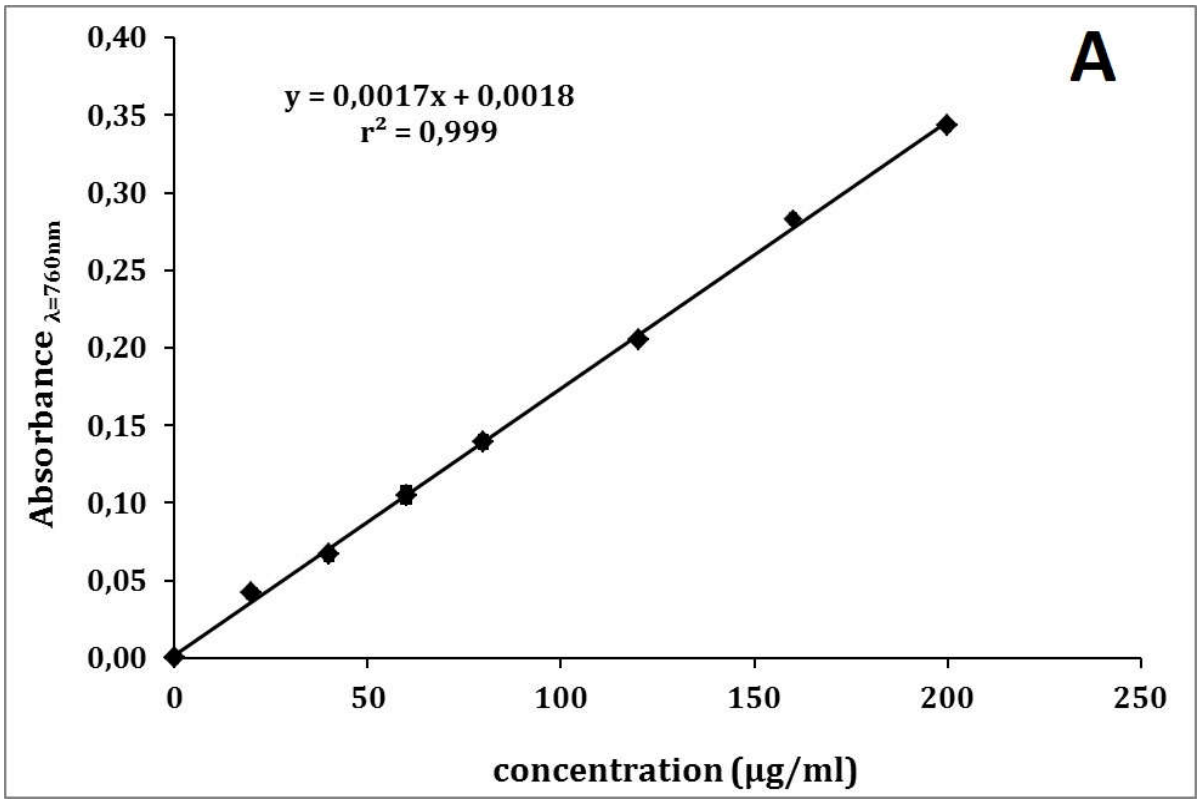


Figure 76. Profil chromatographique: L'HE de *R. officinalis* (**A**) et l'HE de *T. ciliatus* (**B**).

ANNEXE II

DROITES D'ETALONNAGE



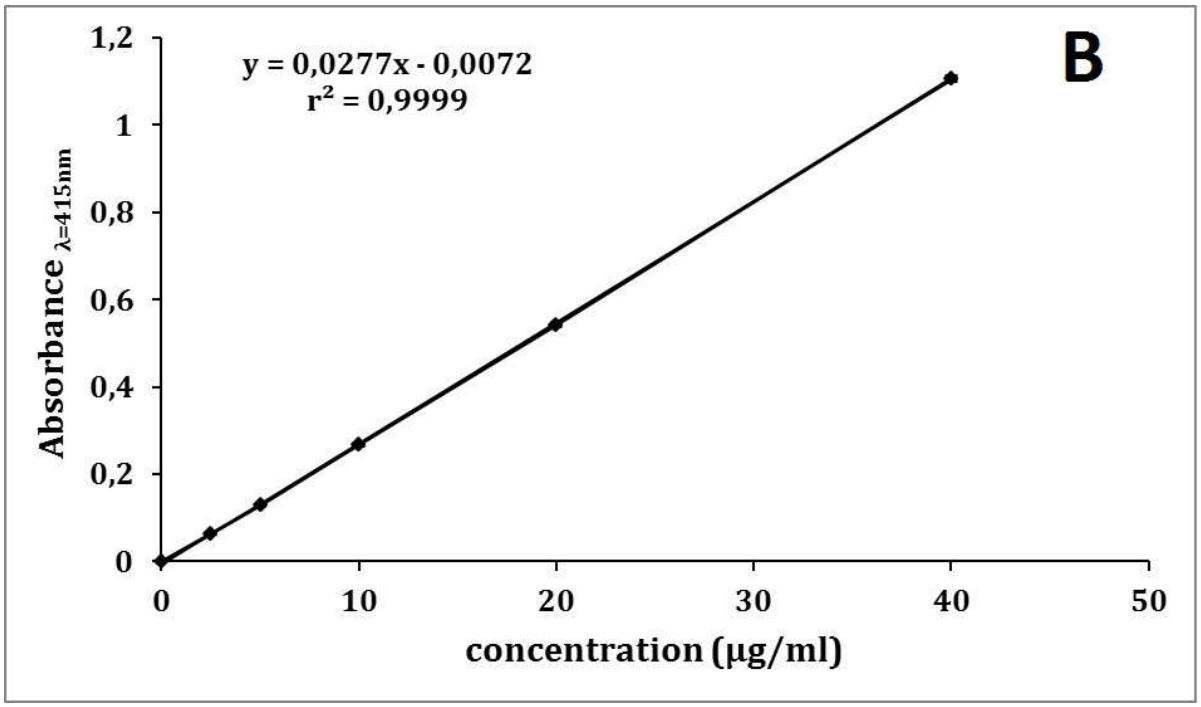


Figure 77. Droite d'étalonnage : acide gallique (**A**) et quercétine (**B**).

ANNEXE III

COURBES D'ACTIVITE ANTIOXYDANTE AU DPPH

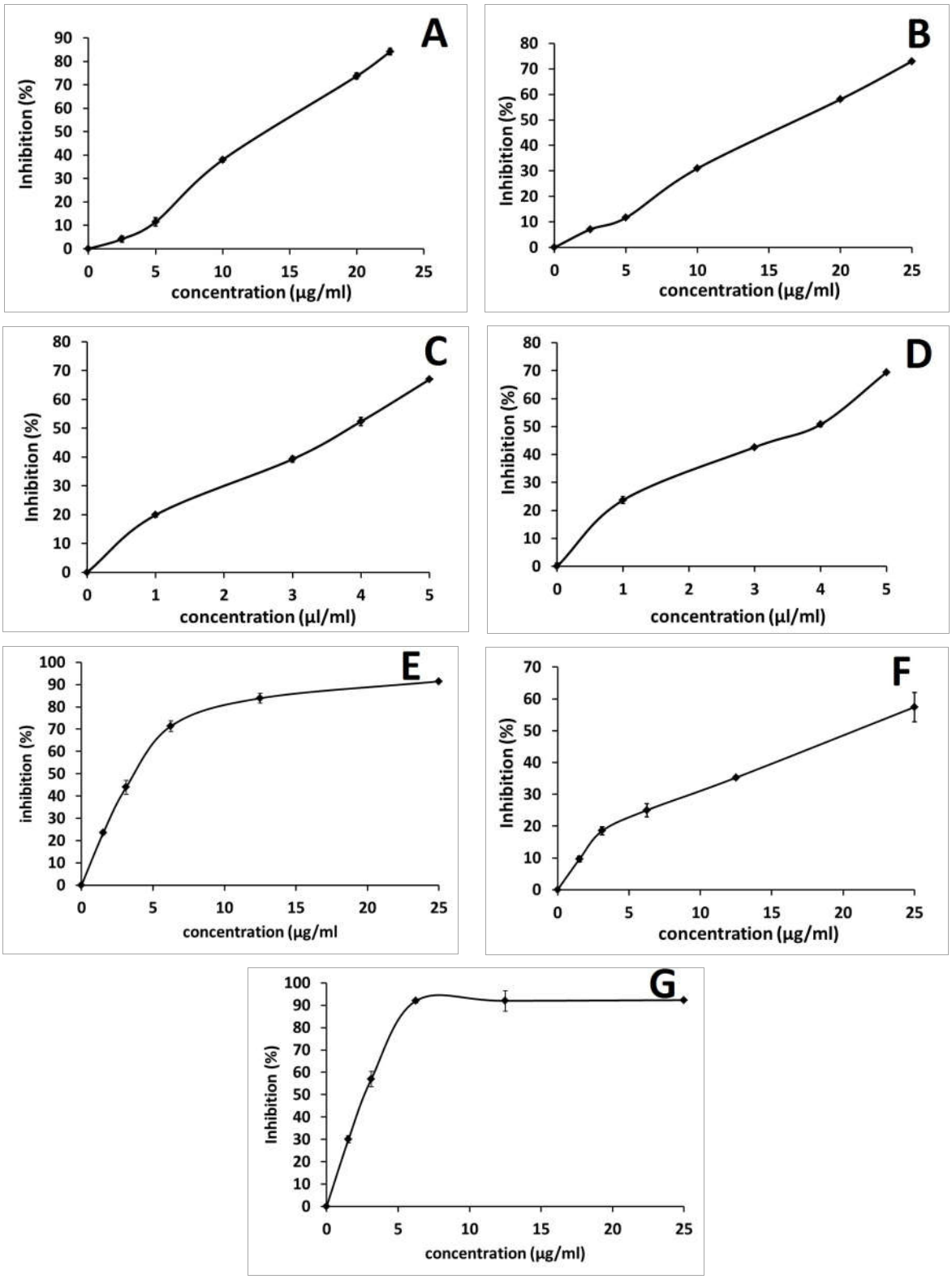


Figure 78. Inhibition du radical libre DPPH par : EM de *R. officinalis* (**A**), EM de *T. ciliatus* (**B**), HE de *R. officinalis* (**C**), HE de *T. ciliatus* (**D**), BHA (**E**), BHT (**F**) et AA (**G**).

ANNEXE IV

COURBES D'ACTIVITE ANTIOXYDANTE AU ß-CAROTENE

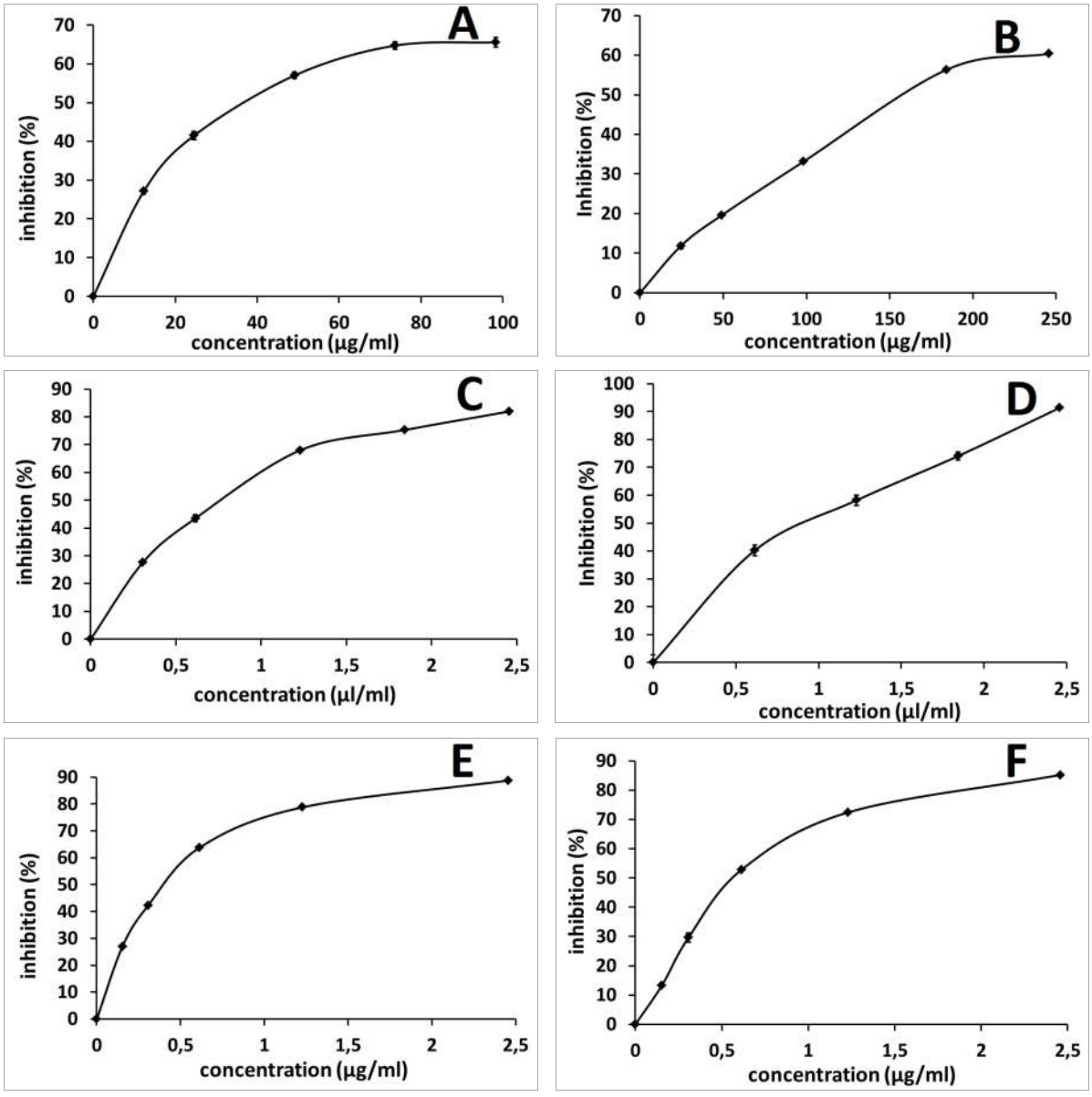


Figure 79. Inhibition du blanchiment du ß-carotène par : EM de *R. officinalis* (**A**), EM de *T. ciliatus* (**B**), HE de *R. officinalis* (**C**), HE de *T. ciliatus* (**D**), BHA (**E**) et BHT (**F**).

ANNEXE V

COURBES D'ACTIVITE ANTIOXYDANTE : POUVOIR REDUCTEUR

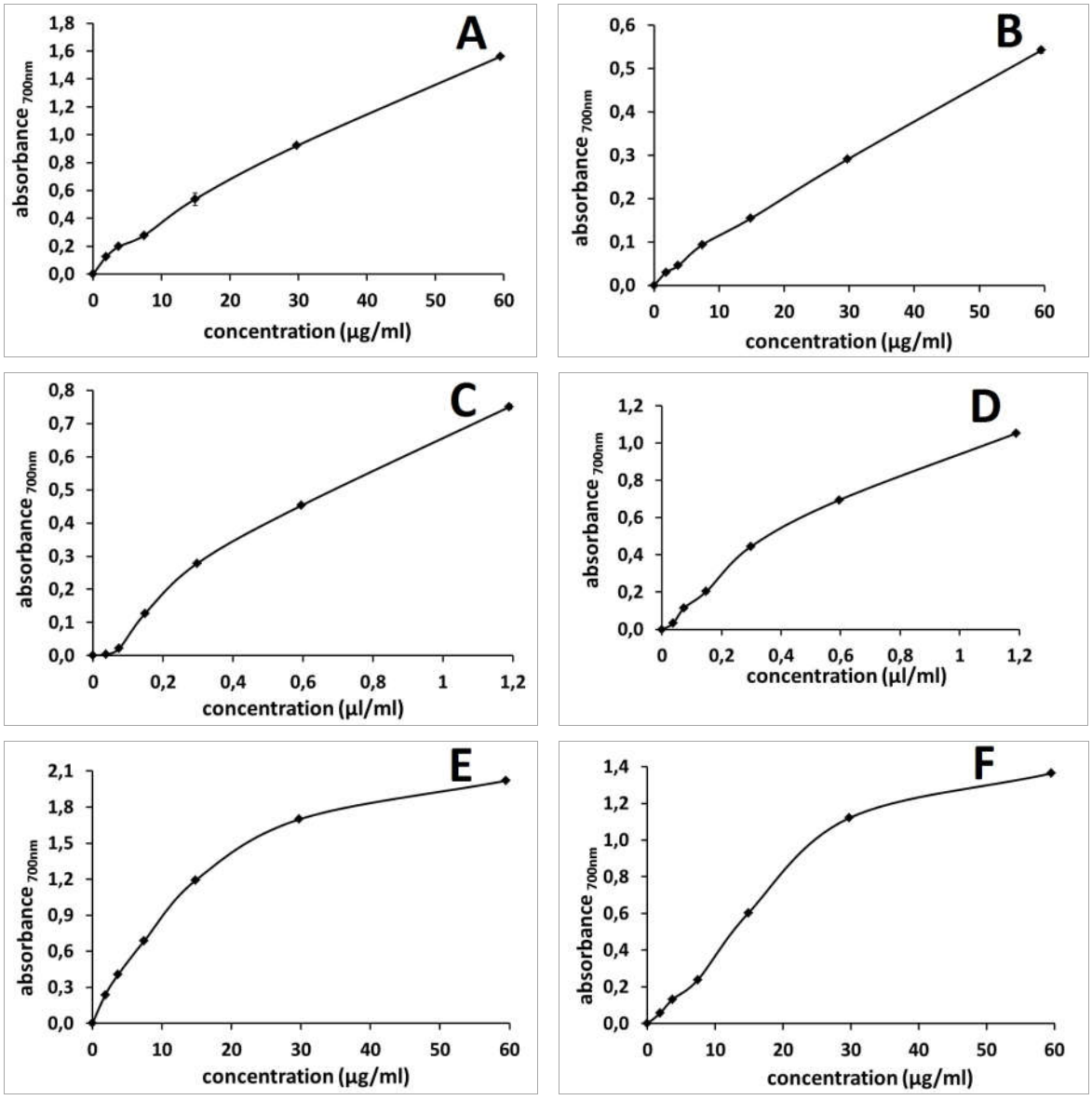


Figure 80. Pouvoir réducteur : EM de *R. officinalis* (**A**), EM de *T. ciliatus* (**B**), HE de *R. officinalis* (**C**), HE de *T. ciliatus* (**D**) et BHT (**E**), AA (**F**).

ANNEXE VI

MILIEUX DE CULTURE (composition)

Potato Dextrose Agar (PDA)

Pomme de Terre	250g
Glucose	20 g
Agar	15 g
Eau distillée	1 litre

Malt Extract Agar (MEA)

Extrait de malt, poudre	20 g
Peptone	1 g
Glucose	20 g
Agar	20 g
Eau distillée	1 litre

Czapek Yeast Extract Agar (CYA)

K_2HPO_4	1 g
Czapek concentré	10 g
Extrait de levure, poudre	5 g
Saccharose	30 g
Solution métaux traces	1ml
Agar	15 g
Eau distillée	1 litre

25% Glycerol Nitrate Agar (G25N)

K_2HPO_4	0.75 g
Czapek concentré	7.5 g
Extrait de levure	3.7 g
Glycérol	250 g
Agar	12 g
Eau distillée	750 ml

PUBLICATIONS

www.gjrmi.com GJRMI, Volume 1, Issue 8, August 2012, 315–322

Original Research Article

PLACE OF LABIATES IN FOLK MEDICINE OF THE AREA OF M'SILA (ALGERIA).

Noui HENDEL[1*], Larbi LAROUS [2], Madani SARI[3], Amel BOUDJELAL[4] and Djamel SARRI[5].

[1, 3, 4, 5] *Faculty of Sciences. Department of Nature and Life Sciences, University of M'sila. BP166, Rue Ichbilia. ALGERIA*
[2] *Faculty of Nature and Life Sciences. Department of Microbiology, University of FERHAT Abbas, 19000. Setif. ALGERIA*

**Corresponding Author E-mail: hendel_n@yahoo.fr*

Received: 12/06/2012; Revised: 15/07/2012; Accepted: 20/07/2012

ABSTRACT

The aim of this study was the inventory and the identification of labiates among the medicinal plants used in traditional medicine by the community of M'sila, North center-East of Algeria. Ethno-botanical data from local population were collected by direct interviews and a semi-structured questionnaire carried out by interviewees belonging to the population. Various data on informants were noted. From 82 plant species belonging to 33 families listed, Lamiaceae species represent 22% of the total plants listed and 48.6% of the frequency of use. Their botanical and vernacular names, medicinal part used and uses are given. Among diseases and ailments treated by labiates are stomach troubles and colic, diabetes, rheumatism, hypertension, eczema, anemia and cancer. Medicinal plants are frequently employed for treatment of ailments and illness in the community of M'sila in spite of the availability of the prescribed drugs. The documentation of this ethno-medicinal knowledge is important. The evaluation of the pharmacological activity for promising medicinal plants is suggested.

KEYWORDS: labiates, medicinal plants, Lamiaceae, ethno-botany, traditional medicine, Hodna, Algeria.

www.gjrmi.com GJRMI, Volume 1, Issue 8, August 2012, 315–322

INTRODUCTION

The World Health Organization (WHO) estimates that 80% of the populations living in rural areas in developing countries depend on traditional medicine for their health care needs. WHO defines traditional medicine as "the total combination of knowledge and practices, whether explicable or not, used in diagnosing, preventing or eliminating physical, mental or social diseases and which may rely exclusively on past experience and observation handed down from generation to generation, verbally or in writing" (WHO, AFR/RC50/9, 2000)

Algeria, concerning its geographical position, presents a broad range of climatic stages inducing a biodiversity with an avalanche of much of plants used like grass, natural food and for therapeutic aims. It is primarily due to its vast geography. The drug companies in this country, but also doctors and chemists seek to better knowing the inheritance of the spontaneous species used in traditional medicine. Their modes of use, their indications in various pathologies thus the active ingredients are studied since tens of years (Djebaili, 1984; Baba Aissa, 1991; 1999. Abdelguerfi, 2003).

For this reason, one of our priorities is to conserve diversity, including uses made of plants by local inhabitants.

MATERIALS AND METHODS

Study area

M'sila state, named capital of the HODNA (fig.1), occupies a privileged position in the central part of northern Algeria; between the Tell and the Sahara. Its climate is continental, semi-arid with an average temperature of 35°C in summer and of 07°C in winter and irregular rainfall of the order 100 to 300 mm/year. It covers an area of 18,718 km^2 situated at an altitude of 500 meters between 35° 42' 07" N 4° 32' 49"E . (Le Houerou, 1995; Moreau *et al*., 2005).

The area is characterized by an ecological diversity represented by two principal ecosystems: steppe and forest ecosystems. Of vocation primarily agro-pastoral, with an estimated population of 991846, the principal activity of the population of rural areas is breeding sheep and caprine. Agriculture areas account for 20% of the total area devoted mainly to cereals. Rustic arboriculture is marked by the predominance of the apricot followed by the olive tree (Feliachi *et al*., 2003; Behlouli *et al.*, 2008; T.A.D - CONSULT; 2008).

Traditional medicine is largely applied in this area and particularly to the south; Biomedical facilities and prescription medications are available in the towns of the state in addition to the herbalist shops, confirm its interest.

Data collection

To carry out this work, ethno-botanical information on the plants used by the population were obtained by visiting Traditional Medical Practitioners (TMP's), herb sellers and connoisseurs in selected localities. The use of semi-structured questionnaire and oral interviews were adopted to obtain the relevant ethno-botanical data. The questionnaires are divided into 03 sections: (1) was about botanical and vernacular names, plant parts used and medicinal uses. (2). concerns personal information on informer as age, sex educational level and duration of practice. Section (3) contains code or/and collected specimen. The questionnaires were administered by trained interviewees belonging to the population. In some cases, samples were bought in order to get the information.

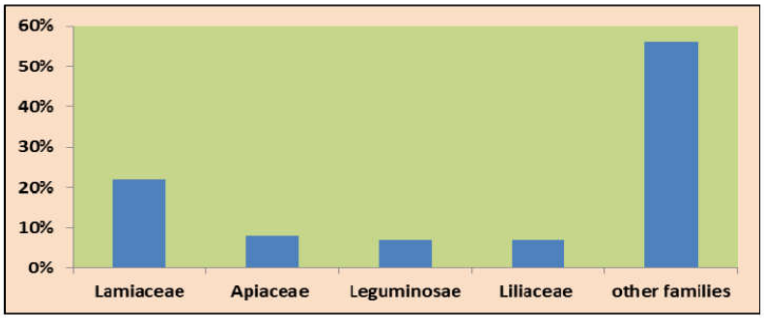
Dried plant samples collected were identified using flora of Quézel and Santa (1962–1963), Ozenda (1983) and Maire (1952–1987); verified, characterized and confirmed by professional botanists of the department. Voucher specimens were deposited in the Herbarium. In parallel, in order to know the herb diversity of the study zone and confirm availability of local plants used, field research was carried out with the aid of forest executives

www.gjrmi.com GJRMI, Volume 1, Issue 8, August 2012, 315–322

of the district. Plant samples were collected between March and June 2010 and 2011. Identity of collected plants and comparison with herb seller samples was carried out by botanists of the department.

Fig.1 A map of Algeria showing the location of M'sila in North center-East

Fig.2 Predominant plant families of trado-medicinal use in M'sila.



RESULTS AND DISCUSSION

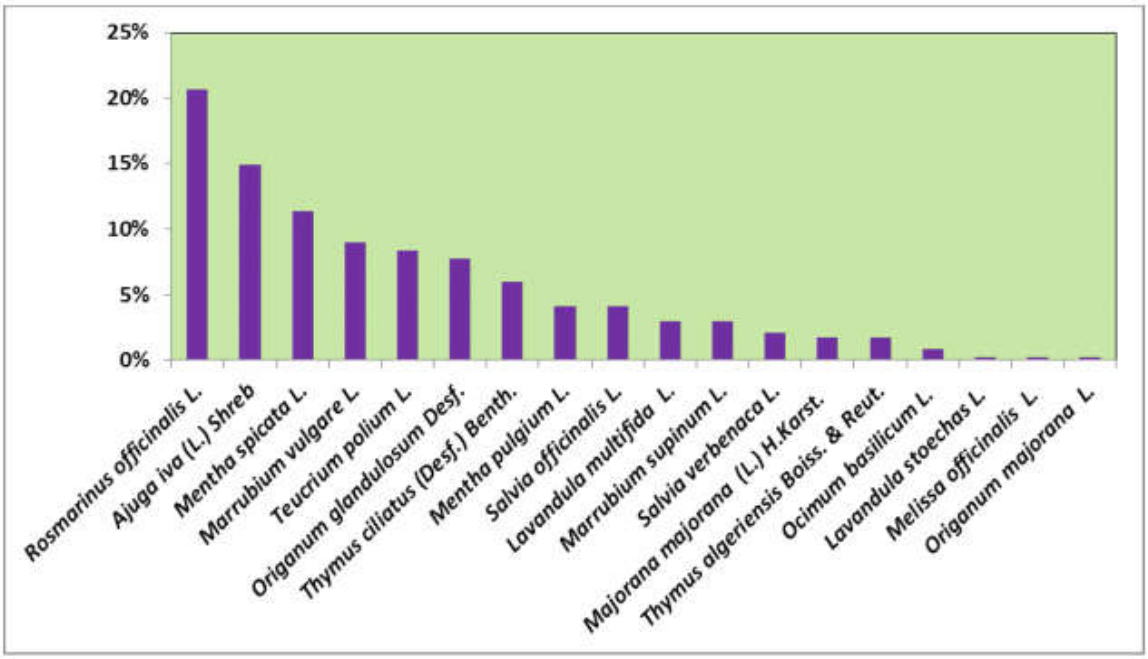
Personal information on informants

A number of 89 people were interviewed in this study: 18% of traditional medical practitioners (TMP's), 34% of herb sellers and 48% of connoisseurs. The age of 56% of them exceeds 30 years, 38% have no educational level and 70% were women. In this area, all inhabitants were concerned with traditional use of plants. However, women had more knowledge on the medicinal species when compared to men. These results indicate the widespread use of plants because of knowledge transmittance between generations and plant availability compared to prescribed medications expensive and non-available sometimes, particularly in rural agglomerations.

It was noted that a small number of people particularly some herb sellers refused to contribute for personal reasons or others related to their trade.

www.gjrmi.com GJRMI, Volume 1, Issue 8, August 2012, 315–322

Fig.3 labiates used in traditional medicine in M'sila



Medicinal plants

A total of eighty-two plant species and seventy-one genera distributed over thirty-three families with a total frequency 663 were listed. The dominant families were *Lamiaceae, Apiaceae, Leguminosae* and *Liliaceae. Lamiaceae* was the most dominant (fig 2).

Lamiaceae species represent 22% of the total plants listed and 48.6% of the frequency of use. People of the study area use frequently plants as remedies for treatment of widespread diseases and ailments; important number of herb sellers and clear frequentation of women to plant shops, availability of spontaneous or cultivated plants in rural areas will explain this situation. In addition high level contribution of women and educational level largely confirm the socioeconomic situation of the region. Table 1 summarizes the stated relationship between medicinal labiate plants and pathologies for which they are used. The major illnesses treated by the indigenous people include digestive disorders, bronchopulmonary problems, skin disease, diabetes, vascular system disorders, and other diverse diseases.

Predominance of 04 families as cited in Fig.2 particularly Lamiaceae (Fig.3) is probably due to the availability of these plants in the region.

These results indicate the importance of Lamiaceae family members and their broad use as source of traditional drugs. Some of them listed above are popular species around the world; species belonging to genera *Teucrium*, *Marrubium*, *Origanum*, *Rosmarinus*, *Mentha*, *Thymus*, *Ajuga, Salvia, Lavandula* are used in the treatment of common illnesses like digestive disorders, abscesses, gout, conjunctivitis, menstrual disorders, cholecystitis, hepatitis, inflammations, liver diseases and in stimulation of fat and cellulite decomposition (Ivancheva and Stantcheva, 2000; Rokaya *et al*., 2010; Stankovic *et al*., 2010). 20% of medicinal plants recorded to treat eczema in the study area are labiates (Sari *et al*., 2012). Some *Thymus* species are widely used in Algerian folk medicine for their antitussive, antiseptic, expectorant, anti-helmintic and antispasmodic properties (Hazzit *et al*., 2009).

www.gjrmi.com GJRMI, Volume 1, Issue 8, August 2012, 315–322

Tab. 1 Medicinal plants, plant parts used, preparation and medicinal uses by local people of M'sila, Algeria

Plant name (local name)	Part used	Preparation	Medicinal uses
***Ajuga iva* (L.) Shreb (Chendgoura)**	Whole plant	Infusion, Powder + honey	Stomachic; diabetes; hypertension; tonic; cephalic; diarrhea; fever.
***Lavandula multifida* L. (Khzama)**	Aerial parts, leaf	Infusion, Ocular drip, Cataplasm for head	Sedative; antispasmodic; cancer; astringent; stomachic.
***Lavandula stoechas* L. (Halhal)**	Aerial parts, leaf	Infusion, Decoction	Asthma, influenza, wounds,
***Majorana majorana* (L.) H.Karst. (Madqouch)**	Flowered tops, leaf	Infusion, Decoction	Regulation; sedative; cramp
***Marrubium vulgare* L. (Mariouet)**	Aerial parts, leaf	Cataplasm for the head	Diabetes; febrifuge; vermifuge; diarrhea.
***Marrubium supinum* L. (Mariouet)**	Aerial parts, leaf	Infusion , Ocular drips	Fever, otitis, slimming, hypertension, eczema
***Melissa officinalis* L. (Teronjene)**	Aerial parts	Infusion, Powders, Bath	Sedative; hypotension; rheumatism.
***Mentha spicata* L. (Naânaâ)**	Aerial parts	Infusion	Hypotension; sedative; disinfectant; astringent
***Mentha pulgium* L. (Fliou)**	Aerial parts	Infusion	Antispasmodic, hypotension, stomach pains and stomachic
***Ocimum basilicum* L. (Hbaq)**	Flower, leaf	Infusion	Tension; stomachic; sedative; aerophagia.
***Origanum glandulosum* Desf. (Zaâter)**	Leaf, flower, flowered tops, aerial parts, roots	Infusion, Powder + olive oil	Hypotension, antispasmodic; astringent.
***Origanum majorana* L. (Zaâter el moulk)**	Aerial parts	Evaporation of powder + olive oil	Tension; stomachic; sedative; respiratory tract
***Rosmarinus officinalis* L. (Klil)**	Aerial parts, leaf	Infusion, Compress	Pain abdominal; tonic; rheumatism; circular disorder.
***Salvia officinalis* L. (Miramia)**	Aerial parts, leaf	Infusion, Powder + honey, Powder	Diabetes; stomachic; stomach pain, choleraic
***Salvia verbenaca* L. (Khayata)**	Aerial parts, leaf	Infusion, Decoction	Aromatic, stomachic, tonic, vulnerary, disinfectant, antispasmodic, antisudoral, astringent (diarrhea), carminative,
***Teucrium polium* L. (Djaïda)**	Aerial parts, leaf	Infusion, Powder	Disinfectant; stomachic; hemorrhoids; weakens
***Thymus algeriensis* Boiss. & Reut. (Zâaitra)**	Aerial parts, leaf	Infusion, Decoction	Hypertension, carminative, diabetes, vermifuge, cholesterol, anginas, aromatic
***Thymus ciliatus* (Desf.) Benth.(Djertil)**	Aerial parts, leaf	Infusion, Decoction	Antibiotic vermifuge; carminative; tonic

www.gjrmi.com GJRMI, Volume 1, Issue 8, August 2012, 315–322

Laboratory studies report the anti-diabetic activity of aqueous extracts of some plants of the study area; oral administration of 200 and 300 mg/kg body weight of aqueous extract the *Marrubium vulgare* induced a significant antidiabetic effect and anti-hyperlipidemic effect. (Boudjelal *et al.*, 2012). The Antioxidant effect of *Ajuga iva* aqueous extract and other biological activities of some Algerian medicinal plants extracts have also been cited (Djeridane *et al.*, 2006; Taleb-Senouci *et al.*, 2009). Methanolic extracts of *Teucrium polium* and *Ajuga iva* present antibacterial activity against some pathogenic bacteria (Zerroug *et al.*, 2011).

CONCLUSION

Traditional medicine is usually exerted by people because the use of medicinal plants decreases the disadvantages of the chemical drugs.

This study was aimed at the Lamiaceae plants being used by the local people of M'sila. These plants are used routinely for treatment of gastrointestinal problems, hypertension and particularly for some diseases like diabetes, asthma and eczema on the other hand. The main plants are; *Rosmarinus officinalis* L., *Ajuga iva* L. Shreb, *Marrubium vulgare* L., *Mentha spicata* L., *Origanum glandulosum* Desf., *Thymus ciliatus* (Tourn.) L. and *Teucrium polium* L. The preservation of the traditional knowledge is an essential requirement for maintaining continuity and transmission of traditional medicine.

It should be noted that these results indicate that population of the area of M'sila uses medicinal plants for the treatment of current ailments and very important diseases. Labiates have a significant role and are applied as infusion of the aerial parts or as powder mixed with honey or olive oil. The indigenous population also uses folk-medicines derived from mineral and animal origin.

Many valuable drugs have found their way into the contemporary medicine as a result of studies on folk medicine remedies. The present study is also an eye opener for the Modern researchers to explore much more from the so called Medicinal plant world.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors are grateful to CNEPRU (Algeria) for financial support, to forest sector of Hammam Dalâa and all contributors to the completion of this work: interviewer's, herbalists and TMP's of the area.

REFERENCES

Abdelguerfi A. Summary report on «Biodiversity Important for Agriculture in Algeria » MATE-GEF/PNUD: Project ALG/97/G31. 2002/2003. "French version"

Baba Aissa F. (1991). Medicinal plants in Algeria. Identification, description of active ingredient properties and traditional use of common plants in Algeria. (Bouchène and Ad. Diwan) Algiers. 181 p. "French version"

Baba Aissa F. (1999). Encyclopedia of the useful plants. Flora of Algeria and Maghreb. vegetable substances of Africa, of East and Occident. EDAS. Algiers. 368 p. "French version"

Behlouli F., Tiaiba A. and Slamani A. (2008). Study of the various methods of apricot drying, outline on the traditional methods of drying in the area of Hodna, State of M'Sila. Review of Renewable energies .SMSTS'08 Algiers (2008) 61–66. "French version"

www.gjrmi.com GJRMI, Volume 1, Issue 8, August 2012, 315–322

Beloued A. (1998). Medicinal plants of Algeria. U.P.O. Algiers. 277p. "French version"

Boudjelal A., Henchiri Ch., Siracusa L., Sari M. and Ruberto G. (2012). Compositional analysis and in vivo anti-diabetic activity of wild Algerian Marrubium vulgare L. infusion. Fitoterapia 83 (2012) 286–292.

Djebaili S., 1984 - Algerian steppe. Phytosociology and ecology. U.P.O. Ed., Ben-Aknoun, Algiers, 177 p. "French version"

Djeridane A., Yous M., Nadjemi B., Boutassouna D., Stocker P., Vidal N. (2006). Antioxidant activity of some Algerian medicinal plants extracts containing phenolic compounds. Food Chemistry, 97:654–660.

Feliachi K. (2003). National Commission (AnGR). National report on the Animal Genetic resources in Algeria. 46p. "French version"

Hazzit M., Baaliouamer A, Veríssimo A.R., Faleiro M.L., Miguel M.G. (2009).Chemical composition and biological activities of Algerian Thymus oils. Food Chemistry, doi: 10.1016/j.food.chem. 2009.03.018.

Ivancheva S., Stantcheva B. (2000). Ethnobotanical inventory of medicinal plants in Bulgaria. Journal of Ethnopharmacology, 69:165–172.

Le Houerou HN. (1995): Bioclimatology and Biogeography of the arid steppes of the North of Africa. Biological diversity, sustainable development and desertisation. Mediterranean Options. Series. B; 10. "French version"

Maire R. (1952–1987): Flora of North Africa (Morocco, Algeria, Tunisia; Tripolitania, Cyrenaica and the Sahara, 16 vols. Paris: Le Chevalier Ed. "French version"

Moreau S., Benziene A.S., Boudjadja A., Gaouar A., Kaabeche M., Moali A. and Sellami, D. (2005) Plan of management of site of Mergueb. Wilaya of M'sila (Algeria). PROJECT DGF/GEF/PNUD-ALG/G35/2005. "French version"

Rokaya M. B., Münzbergová Z., and Timsinac B. (2010). Ethnobotanical study of medicinal plants from the Humla district of western Nepal. Journal of Ethnopharmacology 130: 485–504.

Sari M., Hendel N., Boudjelal A., and Sarri D.(2012). Inventory of medicinal plants used for traditional treatment of eczema in the region of Hodna (M'sila - Algeria). Global J. Res. Med. Plants & Indigen. Med., 1(4): 97–100.

Stankovic M. S., Topuzovic M., Solujic S. and Mihailovic V. (2010). Antioxidant activity and concentration of phenols and flavonoids in the whole plant and plant parts of *Teucrium chamaerdys* L. var. *glanduliferum Haussk. J. Med. Plant. Res.*, 4(20): 2092–2098.

T.A.D - CONSULT– EURL. Territory. Arrangement. Development. (2008). Office of Engineering and technical studies. Relative study with the characterization and the delimitation of mountainous areas and mountainous solid masses "Massif of the Hodna - Stage II" "French version"

Taleb-Senouci D., Ghomari H., Krouf D., Bouderbala J., Prost J., Lacaille-Dubois M.A., Bouchenaka M. (2009). Antioxidant effect of *Ajuga iva* aqueous extract in streptozotocin-induced diabetic rats. Phytomedicine, doi:10.1016/j.phymed.2008.12.004D.

WHO (World Health Organization). Regional Committee for Africa.

www.gjrmi.com GJRMI, Volume 1, Issue 8, August 2012, 315–322

AFR/RC50/9. 2000. Promoting the role of traditional medicine in health systems: a strategy for the African region. Ouagadougou, Burkina Faso. 28 August-2 September 2000.

Zerroug M.M., Zouaghi M., Boumerfeg S., Baghiani A., Nicklin J. and Arrar L. (2011). Antibacterial Activity of Extracts of *Ajuga Iva*, and *Teucrium Polium*. Advances in Environmental Biology, 5(2): 491–495.

Source of Support: Nil Conflict of Interest: None Declared

International Food Research Journal 23(4): 1725-1732 (2016)
Journal homepage: http://www.ifrj.upm.edu.my

Antioxidant activity of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) and its *in vitro* inhibitory effect on *Penicillium digitatum*

[1,2*]Hendel, N., [2]Larous, L. and [1]Belbey, L.

[1]*University Mohamed Boudiaf of M'sila, Faculty of Sciences, Department of Microbiology and Biochemistry, M'sila 28000, Algeria*
[2]*University Ferhat Abbas, Faculty of Nature and Life Sciences, Department of Microbiology, Setif 19000, Algeria*

Article history

Received: 18 December 2014
Received in revised form: 28 November 2015
Accepted: 4 December 2015

Keywords

Rosmarinus officinalis
Essential oil
Antioxidant activity
Antifungal activity
Penicilium digitatum

Abstract

The objective of this study was to evaluate rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) growing wild in Hammam Dalâa (Algeria) for total phenolic content, free radical scavenging activity (FRSA) and test the effect of its extracts on the growth of the green mold of citrus, *Penicillium digitatum*, under *in vitro* conditions. The results obtained using the Folin-Ciocalteu method showed a high content of the extract in polyphenols reaching 129 mg gallic acid equivalents/g and relatively low content of flavonoids (38mg of quercetin equivalents/g dry extract). In the DPPH assay the methanol extract exhibited a FRSA close to those of the synthetic antioxidants, tested as positive controls, and higher compared to that of the EO. The *in vitro* antifungal assay by means of different methods showed a clear inhibitory effect of the rosemary essential oil and methanol extract on *P. digitatum*. The inhibitory effect registered at the 6th day of incubation at 25°C was between 5 to 79% when the essential oil was applied as fumigant at concentrations ranging from 10 to 50 µl, and was between 13 and 50% when applied by contact bioassay at levels from 1000 to 3500 µl/l. Spore germination was strongly affected by the oil applied by disk diffusion method. The methanol extract exhibited inhibition exceeding 50% of the fungus mycelial growth but at relatively high concentration 0.8g/l. These results support the studies on rosemary as a promising source of preservatives.

© All Rights Reserved

Introduction

Citrus is an important fruit crop grown commercially in more than 135 countries in different agro-climatic conditions and its postharvest diseases result in serious economic damage (Naqvi, 2004). Injuries on citrus fruit caused during harvest, handling, transport, storage and marketing, provide entries to wound pathogens, including *Penicillium digitatum* Sacc. and *P. italicum* Wehmer, causal agents of green and blue mould, respectively (Zamani *et al.*,2009).

Citrus fruits are among the major perennial crops in Algeria. They represent 27% of the total fruit production and occupy an area of 11% compared to other fruit crops. Seventy nine percent of production is destined for fresh consumption, processing is around 8.000 t/year. The citrus processing industry concerns concentrates, natural juices and jams (Kerboua, 2002; Ghezli and Aouane, 2002; Biche, 2012). Disease losses caused by fungal wound pathogens in Algerian citrus fruits are not well documented.

P. digitatum grows on the surface of postharvested citrus fruits producing characteristic powdery olive-colored conidia and is commonly known as green mold. This pathogen is of main concern as it is responsible for 90% of citrus losses due to diseases occurring during the storage period, and it causes serious damages in commerce (Ariza *et al.*, 2002). P. digitatum repeated cycles of infection and sporulation commonly occur in packed fruits. It can also cause an allergic response due to the enormous numbers of dry air-borne spores it produces (Mekbib *et al.*, 2011).

In spite of fungicide use and the increased implementation of new alternative strategies, green mold in citrus continue to represent a major problem for stored fruits worldwide (Buron-Moles *et al.*, 2012). Moreover, and due to the development of resistance to fungicides (Viñas *et al.*, 1993), as well as concerns about the environment and public health, the use of synthetic fungicides is becoming increasingly restricted (Palou *et al.*, 2001).

Due to the demands of the consumer market for food without the presence of pesticide residues, there is a growing interest in the development of safer, effective alternative compounds to control postharvest fungal diseases (Mekbib *et al.*, 2011). The exploitation of natural products, such as essential oils and plant extracts, to control decay

*Corresponding author.
Email: *hendel_n@yahoo.fr*
Tel: +213 0773027687; Fax: +213 35555351

and prolong storage life of perishables has received more and more attention (Tripathi and Dubey, 2004) and recently gained a great popularity and scientific interest (Nuzhat and Vidyasagar, 2013).

Some aromatic plants with known antiseptic and antimicrobial properties and mainly used as spices in food preparations, have been studied for use in the control of moulds (Centeno *et al*., 2010). *Rosmarinus officinalis* is one of the oldest known medicinal plants in Algeria; it has several uses of which as antispasmodic and as a flavor and fragrance ingredient in food (Boutekedjiret *et al*., 1998; 2003; Djeddi *et al*., 2007, Hendel *et al*., 2012)

The aim of our work was to evaluate rosemary methanol extract (ME) and essential oil (EO) for total phenolics and antioxidant activity, and to investigate their effect on *P. digitatum* isolated from oranges commercialized in local food markets.

Materials and Methods

Plant material

The plant material used for this work is Rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) growing wild in the region of Hammam-Dalâa (M'sila). Collected during the month of March 2014, fresh material (aerial parts: leaves and flowers) was dried under shade at room temperature and leaves and flowers were removed then stored in clean paper bags until use.

Essential oil extraction

The prepared air-dried plant material of rosemary was powdered and 100 g were submitted to hydrodistillation for 3 h with 1000ml distilled water using a Clevenger-type apparatus. The extracted oil was collected and dried over anhydrous sodium sulfate, then stored in sealed glass vials in a refrigerator at 4˚C until use. The yield based on dry weight of the sample was calculated.

Preparation of the methanol extract

The procedure was done as described by Erkan *et al.* (2008) with some modification. Thirty grams of the powdered plant material were subjected to Soxhlet extraction using 300 ml of methanol as solvent at 40°C for 8 hours. Methanol containing the extract was then filtered through Whatman paper. The methanol extract was concentrated under reduced pressure on a rotary evaporator. Extract was kept in dark at 4˚C until use. The procedure was repeated three times.

Determination of the total phenolic content

The content of total polyphenols was quantified in the methanol extract by the Folin-Ciocalteu spectrophotometric method using gallic acid as standard according to the procedure described by Wong *et al.* (2006) with slight modifications. Briefly, 100 µl of the extract was mixed with 2.5ml of Folin–Ciocalteu reagent (10x dilutions). After 5min reaction, 2.5 ml of Na_2CO_3 solution (7.5% w/v) was added and allowed to stand for 2 h. The absorbance was measured at 765 nm in a spectrophotometer. The concentration of total phenolic compounds was expressed as mg gallic acid equivalents (GAE) per g dry extract by using an equation obtained from standard gallic acid graph.

Determination of the total flavonoid content

The flavonoids content in the extract was estimated spectrophotometrically according to Khlifi *et al*. (2013). Briefly, a diluted solution (4 ml) of the extract was mixed with an equal volume of aluminium trichloride ($AlCl_3$) in methanol (2%). The absorbance was read at 415 nm after 15 min against a blank sample consisting of a methanol (4 ml) and extract (4 ml) without $AlCl_3$. Quercetin was used as reference compound to produce the standard curve, and results were expressed as mg of quercetin equivalents (QE) per g of dry mass.

DPPH assay

The DPPH assay was carried out as described elsewhere (Tepe *et al*., 2004; Hatipoglu *et al.*, 2013). Fifty microliters of various concentrations of the extract or the essential oil were added to 5ml of a 0.004% (w/v) methanol solution of DPPH. After a 30min incubation period at room temperature the absorbance was read against a blank at 517 nm. The inhibitions of DPPH radical in percent (I%) were calculated as follows:

$$I\% = (A_{blank} - A_{sample} / A_{blank}) \times 100$$

where A_{blank} is the absorbance value of the control reaction (containing all reagents except the test compound) and A_{sample} is the absorbance value of the extract or the essential oil. Extract concentration providing 50% inhibition (IC_{50}) was calculated from the graph plotted inhibition percentage against extract or oil concentration. Tests were carried out in triplicate and Butylated HydroxyAnisole (BHA), butylated hydroxytoluene (BHT) and ascorbic acid (AA) were used as positive control.

Fungal strain used in in vitro *antifungal assay*

P. digitatum strain used in this study was isolated from decayed oranges. The identification of the

fungus was performed according to the macro and micro-morphological characteristics described by Pitt and Hocking (2009). The fungal strain was maintained on Potato Dextrose Agar (PDA) plates and slants at 5°C, with periodic transfers through orange fruit to maintain its aggressiveness.

Preparation of the conidial suspension

Conidial suspension was prepared as described by Nguefack *et al.* (2009): conidia were harvested from 10-day-old culture by pouring a sterile 0.01% aqueous solution of Tween 80 onto the culture plates and scraping the plate surface with a sterile bent glass rod to facilitate the release of conidia. Using a Heamocytometer, the number of conidia in the suspension was adjusted to approximately 10^6 conidia ml^{-1}.

Effect of rosemary on the growth of the fungus

The effect of rosemary, essential oil and extract, on the fungus was conducted using different methods.

Contact bioassay

The experiments were conducted according to the method of Marandi *et al.* (2011). PDA medium was autoclaved and cooled in a water bath to approximately 45°C. The tested oil was aseptically added at different concentrations: 1000, 1500, 2000, 2500, 3000, and 3500 µl/l to the molten PDA containing Tween 80 (0.5% v/v). The resulting media were immediately dispensed (15 ml) into sterilized Petri plates (9 cm) then inoculated at the center with 6mm plugs from the fungal 7-days-old cultures. In the control, water was used instead of the essential oil. Inoculated Petri plates were incubated at 25°C in darkness and observations were recorded daily up to the 6th day. Three replicates were used per treatment. Experiments were performed twice. Mycelial growth inhibition (MGI %) was calculated by the followed formula:

$$MGI\ (\%) = ((dc\text{-}dt)/dc) \times 100$$

where *dc* and *dt* represent mycelial growth diameter in control and treatment Petri plates, respectively.

Fumigation bioassay

The Fumigation bioassay was carried out as described elsewhere (Neri *et al*., 2006; Feng *et al*., 2011). A mycelial disc (6 mm diameter) was taken from the periphery of an actively growing agar culture (7-days-old) and placed at the center of a 90 mm Petri dish containing 15 ml of PDA. Different concentrations volumes (10, 15, 20, 30, 40, and 50 µl/plate) of the essential oil were added on sterilized filter paper disc (9 mm diameter) placed on the cover inside the dish kept in an inverted position. Three replicates were used per treatment. Experiments were performed twice. The dishes were quickly sealed with parafilm and incubated at 25°C. Control treatments consisted of Petri dishes inoculated with the fungus but treated with distilled water instead of the essential oil. The fungi growth recorded daily up to the 6th day. Growth inhibition was calculated as the percentage of the inhibition of radial growth relative to the control.

Disc-diffusion assay

Aliquots (100 µl) of the fungal spore suspension (10^6 spore ml^{-1}) were spread on PDA medium. The paper discs (6 mm diameter) individually impregnated with 15, 20 and 25 µl of essential oil were placed on the inoculated agar. Inoculated plates were kept in the refrigerator (4°C) for 2 h and then incubated at 25°C for 72 h. Distilled water was used as negative control. Antimicrobial activity was evaluated by measuring the zone of inhibition against the test organism. The effect was calculated as a mean of triplicate tests. Each assay in this experiment was repeated twice (Tepe *et al*., 2005; Gulluce *et al*., 2007; Zaouali *et al*., 2010; Hosni *et al*., 2013).

Agar-well diffusion method

The methanol extract was screened for its antifungal activity using the well-plate diffusion method (Talibi *et al*., 2012). Wells (6-mm-diameter) were made at three locations per Petri plate containing 20 ml of PDA. The wells are then filled with 10 and 20 µl of solvent extract at concentration of 0.8 g ml^{-1}. Control plates consisted of wells filled with the solvent Dimethyl Sulfoxide (DMSO). A mycelial disc (6mm diameter) was taken from the periphery of an actively growing agar culture (7-days-old) and placed at the center of the dish containing the extract. Inoculated Petri plates were incubated at 25°C in darkness and observations were recorded daily up to the 5th day. Experiment was performed twice. Mycelial growth inhibition (MGI %) was calculated by the above formula.

Statistical analysis

All experiments were conducted in triplicate and data expressed as mean ± SD. The analysis of variance (ANOVA) and Tukey's multiple comparison were considered significant at $p<0.05$. The results obtained in the well-plate diffusion method were statistically analyzed by means of Student t-test (All the statistical analyses were accomplished using the computer software GraphPad prism 6.05 for

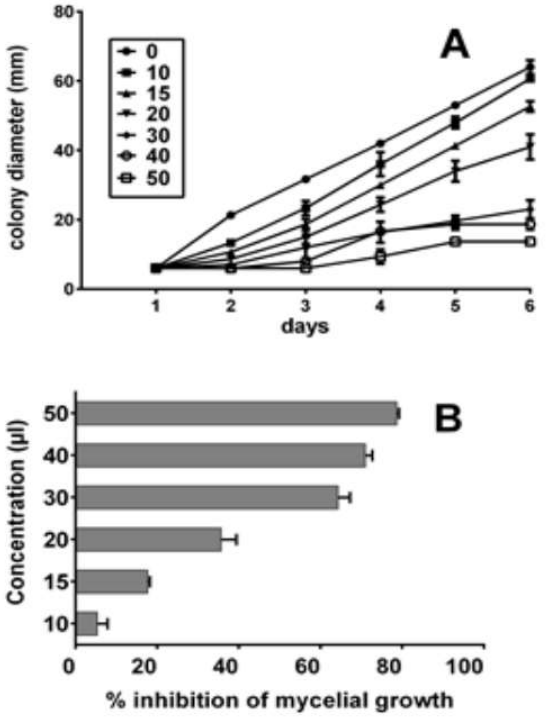


Figure 1. The growth of *P. digitatum* on PDA under vapored rosemary essential oil (µl) (A), and the inhibitory effect of the oil on mycelial growth at the 6th day (B). Data are averages ± SD and differences among means are statistically significant (P<0.05) according to Tukey's multiple comparisons test

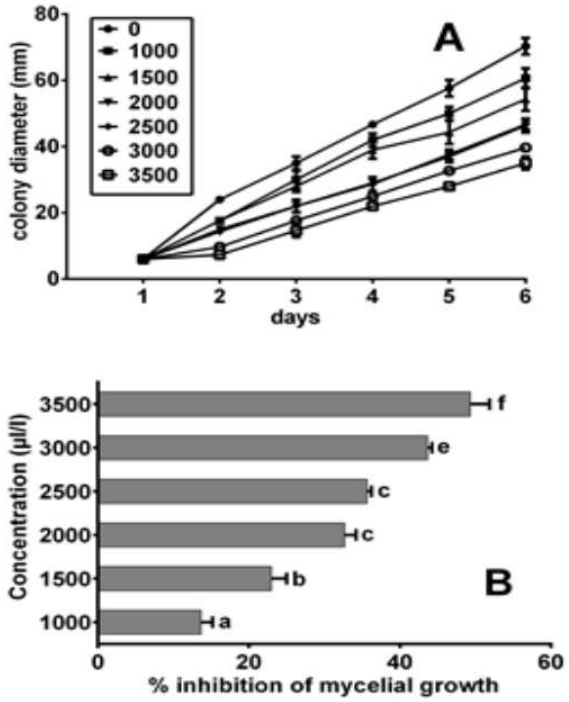


Figure 2. The growth of *P. digitatum* on PDA with incorporated rosemary essential oil (µl/l) (A), and the inhibitory effect of the oil on mycelial growth at the 6th day (B). Data are averages ± SD and different letters indicate significant differences (P<0.05) according to Tukey's multiple comparisons test

Microsoft Windows).

Results and Discussion

Yields of the plant extracts

The plant EO yield was 1.15 ± 0.102% (v/w). Studies have shown variations in yields of rosemary essential oil depending on the plant variety and the ecological characteristics of the collection area (Jamshidi *et al*., 2009; Zaouali *et al*., 2010; Ojeda-Sana *et al*., 2013). Yield will vary if the plant is cultivated or spontaneous (Atik Bekkara *et al*., 2007), and according to the method of extraction (Bousbia *et al.*, 2009). Fresh and dry aerial parts harvested in March and April in an Algerian subhumid zones; Algiers and El Kala, gave yields of 0.82% and 0.36% respectively (Djeddi *et al*., 2007; Ouibrahim *et al*., 2013). Rosemary EO yields of neighboring regions of our collection site (Bibans in the region of Bordj Bou Arreridj) vary between 0.44 and 1.5% (v/w) (Boutekedjiret *et al*.,1998; 2003). At an Algerian western area (Tlemcen) the yield is around 1.2% (Haddouchi *et al.*, 2009). According to the applied procedure, methanolic extraction yielded in 31.867 ± 3.395g.

Determination of the total phenolic and flavonoid content

The total phenolic content of the plant methanol extract, determined by the Folin-Ciocalteu method, was found to be 128.976 ± 9.257mg of GAE per g dry extract. Flavonoids were lower and were estimated to be 38.018 ± 0.884mg of QE per g dry extract. These results indicate the richness of the tested plant in polyphenols. This is clear when compared to studies using Folin-Ciocalteu method on Turkish rosemary reporting levels varying from 147.3 to 34.1mg GAE per g extract, regardless of collection time (Yesil-Celiktas *et al*., 2007b), and the cultivated plant in Argentina (Moreno *et al.*, 2006). Others have shown lower phenolic contents of the rosemary extract (Moreno *et al*., 2006; Wojdyło *et al.*, 2007; Santos *et al*., 2012).

DPPH assay

The hydrogen atom or electron donation ability of the EO or MeOH extract was measured from the bleaching of purple-coloured methanol solution of DPPH. This stable free radical is widely used to test the ability of compounds to act as free radical scavengers or hydrogen donors, and to evaluate antioxidant activity of foods (Esmaeili and Sonboli, 2010). The DPPH FRSA depends on the ability

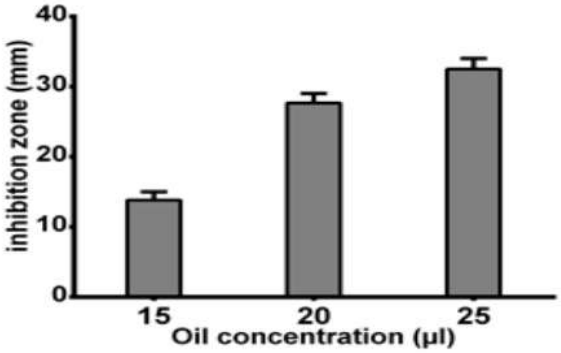


Figure 3. Mean diameter (mm) of inhibition zones of *P. digitatum* growing on PDA medium containing impregnated paper discs of rosemary oil. Data are averages ± SD and differences among means are statistically significant (P<0.05)

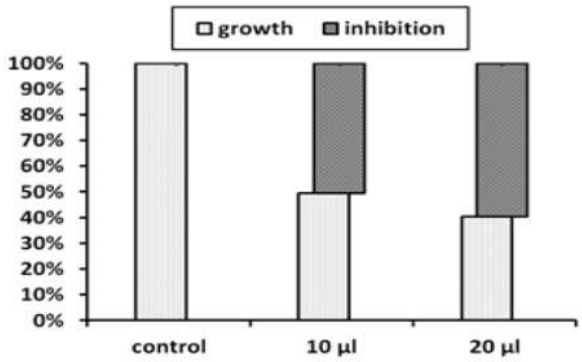


Figure 4. The growth of *P. digitatum* on PDA plate under methanol extract effect using the well-plate diffusion method. Data are averages ± SD and differences among means are statistically significant (P<0.05)

of DPPH to be decolorized in the presence of antioxidants (Sourov *et al*., 2014). The IC_{50} values (the concentration with scavenging activity of 50%) showed that the tested rosemary ME exhibited a high radical scavenging activity (11.741± 0.004µg/ml) close to those of the tested synthetic antioxidants AA (3.036± 0.217µg/ml), BHA (7.492±0.057µg/ml) and BHT (21.211± 2.593µg/ml), but higher compared to that of the EO (3.53±0.038µl/ml). Compared to other studies (Okoh *et al.*, 2011; Miladi *et al.*, 2013), our tested rosemary exhibited a high FRSA. Ojeda-Sana *et al*. (2013) reported a high scavenging capacity related to a chemotype of rosemary essential oil rich in myrcene, but Wang *et al.* (2008) and Hussain *et al.* (2013) mentioned a greater activity of *R. officinalis* essential oil better than its main components, namely, 1,8-cineol, camphor, a-pinene; the major compounds and also minor compounds may make a significant contribution to the oil's activity. From the chemical point of view about plant essential oils, monoterpene hydrocarbons and oxygenated monoterpenes have the main role in the protective action followed by sesquiterpene hydrocarbons (Ruberto and Baratta, 2000). Yesil-Celiktas *et al.* (2007) pointed out that the composition of the rosemary extract change according to the type of the sample, the location and time of harvest thereby various extracts from different geographical locations and from different time-points also varied significantly. The antioxidant activities in rosemary extracts could be due to carnosol, carnosic acid, rosmarinic acid, rosmanol, and rosemaridiphenol phenolic compounds (Rababah *et al*., 2004). The physicochemical nature of the individual phenolics in the extracts may be more important in contributing to the antioxidant activity than the total phenolic content (Santos *et al*., 2012).

In vitro *antifungal assay*

Generally all concentrations applied by the different methods, reduced the growth of the tested fungus. Some significantly reduced or completely inhibited the growth. No sporulation was observed. For fumigation bioassay, concentrations 30, 40 and 50µl inhibited growth with a rate higher than 50% throughout the incubation period with complete growth inhibition at the 5th day for 40 and 50µl (Figure 1A). Low abundance of growing mycelium and no sporulation was observed. On the 6th day inhibition was estimated at 5 to 79% (Figure 1B).

Compared to the fumigation bioassay, concentrations tested by contact bioassay method showed less activity (Figure 2A); the fungus kept the same rate of growth with all tested concentrations and inhibition at the 6th day was estimated to be between 13 and 50% depending on the tested oil concentration (Figure 2B). In the disk diffusion assay, the effect was very strong on spore germination and the diameter of the inhibition zone was estimated 14, 20 and 32.5mm at the concentrations 15, 20 and 25µl respectively, with lack of sporulation and sparse mycelium compared to the control (Figure 3). The well-plate diffusion method concerned only the methanol extract at concentration 0.8g/ml. This relatively high concentration exhibited inhibition higher than 50% compared to the control test (Figure 4).

Many plants, particularly those belonging to the Lamiaceae family are known for their antimicrobial activities and especially their EOs. The different methods used allowed us to know that rosemary has significant antifungal activity and especially its EO. This presented a significant inhibitory effect compared to the extract. These findings are in agreement with Yigit *et al*. (2000) who reported that vapor effect of rosemary oil prevented mycelial colour and inhibited growth as 71.4% and reduced decay by 12.5% on the

treated orange fruits with 900 ppm. Some previous research on rosemary cited the antifungal activity of its EO evaluated as average against *P. digitatum* and other fungal species, compared with that of thyme EO estimated very active (Benjilali *et al*., 1986). Nevertheless, Marandi *et al*. (2011) showed that the rosemary EO showed an inhibition percentage greater than *Thymus kotschyanus* and *Ocimum basilicum* when tested on *P. digitatum*. Other studies reported the high sensitivity of *P. digitatum* to the plant EOs and extracts according to the type of solvent (Ameziane *et al.,* 2007). Yesil-Celiktas *et al.* (2007a) reported the effectiveness of rosemary EO as methanol extract against *Candida albicans*. These antimicrobial activities are due to the chemical composition of the EOs and leaves which contain important compounds namely α-pinene, bornyl acetate, camphor, 1,8cineol and rosmarinic acid (Kocie-Tanackov and Dimie, 2013).

Plants extracts and EOs have proven their *in vitro* effective action on a large variety of fungi (Apisariyakul *et al*., 1995; Zabka *et al*., 2009; Prakash *et al.*, 2012; Askarne *et al*., 2013). The mode of action of essential oils on *P. digitatum* and other fungi has not been determined and it has been shown that their antimicrobial activity is dependent on their hydrophobicity and partition in microbial membranes. In general antimicrobial essential oils cause structural and functional damages of microbes by disrupting of membrane permeability and osmotic balance of the cell. Phenolic compounds play the primary role (Palou *et al*., 2008; Prakash *et al.*, 2015).

Conclusion

In recent years, the need to develop plant based food preservatives as alternative to synthetic chemicals to control qualitative and quantitative losses of food item by moulds, mycotoxin contamination has become a priority of scientists worldwide (Prakash *et al.*, 2015). In this context our results revealed a part of the high potential of plant extracts to control fungal diseases in foods. Therefore this will constitute a bio-alternative to the use of chemical pesticides or preservatives as they are natural biodegradable recommended free radical scavengers. Additional studies are required to elucidate plant *in vivo* effects and setting foundations for the public use.

References

Ameziane, N., Boubaker, H., Boudyach, H., Msanda, F., Jilal, A. and Ait Benaoumar, A. 2007. Antifungal activity of Moroccan plants against citrus fruit pathogens. Agronomy for Sustainable Development 27: 273-277.

Aplsarlyakul, A., Vanittanakom, N. and Buddhasukh, D. 1995. Antifungal activity of turmeric oil extracted from *Curcuma longa* (Zingiberaceae). Journal of Ethnopharmacology 49: 163-169.

Ariza, M.R., Larsen, T.O., Petersen, B.O., Duus, J.O. and Barrero, A.F. 2002. P*enicillium digitatum* metabolites on synthetic media and citrus fruits. Journal of Agricultural and Food Chemistry 50: 6361-6365.

Askarne, L., Talibi, I., Boubaker, H., Boudyach, E.H., Msanda, F., Saadi, B. and Ait Ben Aoumar, A. 2013. Use of Moroccan medicinal plant extracts as botanical fungicide against citrus blue mould. Letters in Applied Microbiology 56(1): 37-43.

Atik Bekkara, F., Bousmaha, L., Taleb Bendiab, S.A., Boti, J.B. and Casanova, J. 2007. Composition chimique de l'huile essentielle de *Rosmarinus officinalis* L poussant à l'état spontané et cultivé de la région de Tlemcen. Biologie and Santé 7(1): 6-11.

Benjilali, B., Tantaoui-Elaraki, A., Ismaïli-Alaou, M. and Avadi, A. 1986. Méthode d'étude des propriétés antiseptiques des huiles essentielles par contact direct en milieu gélosé. Plantes médicinales et phytothérapie 20(2) :155-167.

Biche, M. 2012. Les principaux insectes ravageurs des agrumes en Algérie et leurs ennemis naturels. GTFS/ REM/070/ITA.

Bousbia, N., Abert, M., Ferhat, M., Petitcolas, E., Meklati, B. and Chemat, F. 2009. Comparison of two isolation methods for essential oil from rosemary leaves: Hydrodistillation and microwave hydrodiffusion and gravity. Food Chemistry 114: 355-362.

Boutekedjiret, C., Bentahar, F., Belabbes, R. and Bessiere, J.M. 1998. The essential oil from *Rosmarinus officinalis* L. in Algeria. Journal of Essential Oil Research 10(6): 680-682.

Boutekedjiret, C., Bentahar, F., Belabbes, R. and Bessiere, J.M. 2003. Extraction of rosemary essential oil by steam distillation and hydrodistillation. Flavour and Fragrance Journal 18: 481-484.

Buron-Moles, G., López-Pérez, M., González-Candelas, L., Viñas, I., Teixidó, N., Usall, J. and Torres, R. 2012. Use of GFP-tagged strains of *Penicillium digitatum* and Penicillium expansum to study host-pathogen interactions in oranges and apples. International Journal of Food Microbiology 160: 162-170.

Centeno, S., Calvo, M.A., Adelantado, C. and Figueroa, S. 2010. Antifungal activity of extracts of *Rosmarinus officinalis* and *Thymus vulgaris* against *Aspergillus flavus* and *A. ochraceus*. Pakistan Journal of Biological Sciences 13(9): 452-455.

Djeddi, S., Bouchenah, N., Settar, I. and Skaltsa, H.D. 2007. Composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Rosmarinus officinalis* from Algeria. Chemistry of Natural Compounds 43(4): 487-490.

Erkan, N., Ayranci, G. and Ayranci, E. 2008. Antioxidant activities of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) extract, blackseed (*Nigella sativa* L.) essential oil, carnosic acid, rosmarinic acid and sesamol. Food Chemistry 110: 76-82.

Esmaeili, M.A. and Sonboli, A. 2010. Antioxidant, free radical scavenging activities of *Salvia brachyantha* and its protective effect against oxidative cardiac cell injury. Food and Chemical Toxicology 48: 846-853.

Feng, W., Chen, J., Zheng, X. and Liu, Q. 2011. Thyme oil to control Alternaria alternata *in vitro* and *in vivo* as fumigant and contact treatments. Food Control 22: 78-81.

Ghezli, C. and Aouane, B. 2002. Evaluation des maladies des agrumes transmissibles par greffage sur le matériel végétal de multiplication de l'ITAF. In D'Onghia, A.M., Djelouah, K., Roistacher, C.N. (Eds). Proceedings of the Mediterranean research network on certification of citrus (MNCC): 1998-2001. Bari : CIHEAM p. 101-104 (Options Méditerranéennes: Série B. Etudes et Recherches; n. 43).

Gulluce, M., Sahin, F., Sokmen, M., Ozer, H., Daferera, D., Sokmen, A., Polissiou, M., Adiguzel, A. and Ozkan, H. 2007. Antimicrobial and antioxidant properties of the essential oils and methanol extract from *Mentha longifolia* L. ssp. Longifolia. Food Chemistry 103: 1449-1456.

Haddouchi, F., Lazouni, H.A., Meziane, A. and Benmansour, A. 2009. Etude physicochimique et microbiologique de l'huile essentielle de Thymus fontanesii Boiss & Reut. Afrique science 05(2): 246-259.

Hatipoglu, G., Sökmen, M., Bektas, E., Daferera, D., Sökmen, A., Demir, E. and Sahin, H. 2013. Automated and standard extraction of antioxidant phenolic compounds of *Hyssopus officinalis* L. ssp. Angustifolius. Industrial Crops and Products 43: 427-433.

Hendel, N., Larous, L., Sari, M., Boudjelal, A. and Sarri, Dj. 2012. Place of Labiates in folk medicine of the area of M'sila (Algeria). Global Journal of Research on Medicinal Plants and Indigenous Medicine 1(8): 315-322.

Hosni, K., Hassen, I., Chaâbane, H., Jemli, M., Dallali, S., Sebei, H. and Casabianca, H. 2013. Enzyme-assisted extraction of essential oils from thyme (*Thymus capitatus* L.) and rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.): Impact on yield, chemical composition and antimicrobial activity. Industrial Crops and Products 47: 291-299.

Hussain, A.I., Anwar, F., Chatha, S.A.S., Jabbar, A., Mahboob, S. and Nigam, P.S. 2010. Rosmarinus officinalis essential oil: antiproliferative, antioxidant and antibacterial activities. Brazilian Journal of Microbiology 41: 1070-1078.

Jamshidi, R., Afzali, Z. and Afzali, D. 2009. Chemical composition of hydrodistillation essential oil of rosemary in different origins in Iran and comparison with other countries. American-Eurasian Journal of Agricultural and Environmental Sciences 5(1): 78-81.

Kerboua, M. 2002. L'agrumiculture en Algérie. In D'Onghia, A.M., Djelouah, K., Roistacher, C.N. (Eds). Proceedings of the Mediterranean research network on certification of citrus (MNCC): 1998-2001. Bari: CIHEAM p. 21-26 (Options Méditerranéennes: Série B. Etudes et Recherches; n. 43).

Khlifi, D., Sghaier, R., Amouri, S., Laouini, D., Hamdi, M. and Bouajila, J. 2013. Composition and antioxidant, anticancer and antiinflammatory activities of *Artemisia herba* alba, *Ruta chalpensis* L. and *Peganum harmala* L. Food and Chemical Toxicology 55: 202-208.

Kocić-Tamackov, S.D. and Dimić, G.R. 2013. Antifugal activity of essential oils in the control of foodborne fungi growth and mycotoxine biosynthesis in food. In A. Méndez-Vilas (Eds). Microbial pathogens and strategies for combating them: science, technology and education, p. 838-849.

Marandi, R.J., Hassani, A., Ghosta, Y., Abdollahi, A., Pirzad, A. and Sefidkon, F. 2011. Control of *Penicillium expansum* and *Botrytis cinerea* on pear with *Thymus kotschyanus, Ocimum basilicum* and *Rosmarinus officinalis* essential oils. Journal of Medicinal Plants Research 5(4): 626-634.

Mekbib, S.B., Regnier, T.J.C. and Korsten, L. 2011. Efficacy and mode of action of yeast antagonists for control of *Penicillium digitatumin* oranges. Tropical Plant Pathology 36(4): 233-240.

Miladi, H., Ben Slama, R., Mili, D., Zouari, S., Bakhrouf, A. and Ammar, E. 2013. Essential oil of Thymus vulgaris L. and Rosmarinus officinalis L.: Gas chromatography-mass spectrometry analysis, cytotoxicity and antioxidant properties and antibacterial activities against foodborne pathogens. Natural Science 5: 729-739.

Moreno, S., Scheyer, T., Romano, C.S. and Vojnov, A.A. 2006. Antioxidant and antimicrobial activities of rosemary extracts linked to their polyphenol composition. Free Radical Research 40: 223-231.

Naqvi, S.A.M.H. 2004. Diseases of fruits and vegetables, Volume I. S.A.M.H. Naqvi (Ed.). Kluwer Academic Publishers.

Neri, F., Mari, M. and Brigati, S. 2006. Control of Penicillium expansum by plant volatile compounds. Plant Pathology 55: 100-105.

Nguefack, J., Lekagne Dongmo, J.B., Dakole, C.D., Leth, V., Vismer, H.F., Torp, J., Guemdjom, E.F.N., Mbeffo, M., Tamgue, O., Fotio, D., Amvam Zollo, P.H. and Nkengfack, A.E. 2009. Food preservative potential of essential oils and fractions from *Cymbopogon citratus, Ocimum gratissimum* and *Thymus vulgaris* against mycotoxigenic fungi. International Journal of Food Microbiology 131: 151-156.

Nuzhat, T. and Vidyasagar, G.M. 2013. Antifungal investigations on plant essential oils. A review. International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences 5(2): 19-28.

Ojeda-Sana, A.M., Van Baren, C.M., Elechosa, A.M., Juárez, M.A. and Moreno, S. 2013. New insights into antibacterial and antioxidant activities of rosemary essential oils and their main components. Food Control 31: 189-195.

Okoh, O.O., Sadimenko, A.P. and Afolayan, A.J. 2011. Antioxidant activities of *Rosmarinus officinalis* L. essential oil obtained by hydrodistillation and solvent free microwave extraction. African Journal of

Biotechnology 10: 4207-4211.

Ouibrahim, A., Tlili-Ait-kaki, Y., Bennadja, S., Amrouni, S., Djahoudi, A. G. and Djebar, M.R. 2013. Evaluation of antibacterial activity of *Laurus nobilis* L., *Rosmarinus officinalis* L. and *Ocimum basilicum* L. from Northeast of Algeria. African journal of microbiology research 7(42): 4968-4973.

Palou, L., Smilanick, J.L. and Droby, S. 2008. Alternatives to conventional fungicides for the control of citrus postharvest green and blue moulds. Stewart Postharvest Review 4(2): 1-16.

Palou, L., Smilanick, J.L., Usall, J. and Viñas, I. 2001. Control of postharvest blue and green molds of oranges by hot water, sodium carbonate, and sodium bicarbonate. Plant Disease 85: 371-376.

Pitt, J.I. and Honking, A.D. 2009. Fungi and Food Spoilage. 3rd edn. Springer Science and Business Media.

Platania, C., Restuccia, C., Muccilli, S. and Cirvilleri, G. 2012. Efficacy of killer yeasts in the biological control of *Penicillium digitatum* on Tarocco orange fruits *(Citrus sinensis)*. Food Microbiology 30: 219-225.

Prakash, B., Kedia, A., Mishra, P.K. and Dubey, N.K. 2015. Plant essential oils as food preservatives to control moulds, mycotoxin contamination and oxidative deterioration of agrifood commodities - Potentials and challenges. Food Control 47: 381-391.

Prakash, B., Singh, P., Kedia, A. and Dubey, N.K. 2012. Assessment of some essential oils as food preservatives based on antifungal, antiaflatoxin, antioxidant activities and *in vivo* efficacy in food system. Food Research International 49: 201-208.

Rababah, T.M., Hettiarachchy, N.S. and Horax, R. 2004. Total phenolics and antioxidant activities of fenugreek, green tea, black tea, grape seed, ginger, rosemary, gotu kola, and ginkgo extracts, vitamin E, and tert-Butylhydroquinone. Journal of Agricultural and Food Chemistry 52(16): 5183-5186.

Ruberto, G. and Baratta, M.T. 2000. Antioxidant activity of selected essential oil components in two lipid model systems. Food Chemistry 69: 167-174.

Santos, R.D., Shetty, K., Cecchini, A.L. and Miglioranza. L.H.S. 2012. Phenolic compounds and total antioxidant activity determination in rosemary and oregano extracts and its use in cheese spread. Semina: Ciências Agrárias 33(2): 655-666.

Sourov, K., Mustahsan, B., Masud, R., Zannatul, N., Mahmodul, I., Hasanuzzaman, Md., Ramjan, A. and Rana, B. 2014. Phytochemical and *in vitro* biological investigations of methanolic extracts of Enhydra fluctuans Lour. Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine 4: 299-305.

Suhaj, M. 2006. Spice antioxidants isolation and their antiradical activity: a review. Journal of Food Composition and Analysis 19: 531-537.

Talibi, I., Askarne, L., Boubaker, H., Boudyach, E.H., Msanda, F., Saadi, B. and Ait Ben Aoumar, A. 2012. Antifungal activity of Moroccan medicinal plants against citrus sour rot agent Geotrichum candidum. Letters in Applied Microbiology 55(2):155-161.

Tepe, B., Donmez, E., Unlu, M., Candan, F., Daferera, D., Vardar-Unlu, G., Polissiou, M. and Sokmen, A. 2004. Antimicrobial and antioxidative activities of the essential oils and methanol extracts of *Salvia cryptantha* (Montbret et Aucher ex Benth.) and *Salvia multicaulis* (Vahl). Food Chemistry 84: 519-525.

Tripathi, P. and Dubey, N.K. 2004. Exploitation of natural products as an alternative strategy to control postharvest fungal rotting of fruit and vegetables, a review. Postharvest Biology and Technology 32: 235-245.

Viñas, I., Vallverdú, N., Monllaó, S., Usall, J., Sanchis, V. 1993. Imazalil resistant *Penicillium* isolates from Spanish apple packinghouses. Mycopathologia 123: 27-33.

Wang, W., Wu, N., Zu, Y.G. and Fu, Y.J. 2008. Antioxidative activity of *Rosmarinus officinalis* L. essential oil compared to its main components. Food Chemistry 108: 1019-1022.

Wojdyło, A., Oszmianskii, J. and Czemerys, R. 2007. Antioxidant activity and phenolic compounds in 32 selected herbs. Food Chemistry 105: 940-949.

Wong, S.P., Leong, L.P. and Koh, J.H.W. 2006. Antioxidant activities of aqueous extracts of selected plants. Food Chemistry 99: 775-83.

Yesil-Celiktas, O., Bedir, E. and Vardar Sukan, F. 2007. *In vitro* antioxidant activities of *Rosmarinus officinalis* extracts treated with supercritical carbon dioxide. Food Chemistry 101: 1457-1464.

Yesil-Celiktas,O., Hames Kocabas, E.E., Bedir, E., Verdar Sukan, F., Ozek,T. and Baser, K.H.C. 2007a. Antimicrobial activities of methanol extract and essential oils of *Rosmarinus officinalis*, depending on location and seasonal variations. Food Chemistry 100: 553-559.

Yesil-Celiktas, O., Girgin, G., Orhan, H., Wichers, H.J., Bedir, E.and Vardar-Sukan, F. 2007b. Screening of free radical scavenging capacity and antioxidant activities of *Rosmarinus fficinalis* extracts with focus on location and harvesting times. European Food Research and Technology 224: 443-51.

Yigit, F., Ozcan, M. and Akgul, A. 2000. Inhibitory effect of some spice essential oils on *Penicillium digitatum* causing postharvest rot in citrus. Grasas y Aceites 51(4): 237-240.

Zabka, M., Pavela, R. and Slezakova, L. 2009. Antifungal effect of *Pimenta dioica* essential oil against dangerous pathogenic and toxinogenic fungi. Industrial Crops and Products 30: 250-253.

Zamani, M., Sharifi Tehrani, A., Ahmadzadeh, M., Hosseininaveh, V. and Mostofy, Y. 2009. Control of *Penicillium digitatum* on orange fruit combining Pantoea agglomerans with hot sodium bicarbonate dipping. Journal of Plant Pathology 91(2): 437-442.

Zaouali, Y., Bouzaine, T. and Boussaid, M. 2010. Essential oils composition in two *Rosmarinus officinalis* L. varieties and incidence for antimicrobial and antioxidant activities. Food and Chemical Toxicology 48: 3144-3152.

ملخص

تهدف هذه الدراسة إلى حصر النباتات الطبية التابعة لعائلة الشفويات و المستخدمة من قبل سكان منطقة المسيلة، وتقييم النشاط المضاد للأكسدة و النشاط المضاد للفطريات في المختبر للزيوت الأساسية و المستخلصات الميثانولية لاثنتين من هذه النباتات. أجري استقصاء إثنونباتي في منطقة الدراسة وحُددت قائمة النباتات الشفوية المستعملة. اختيرت اثنتان من النباتات الشفوية الشائعة لغرض الدراسة و هما *Rosmarinus officinalis* L. (إكليل الجبل) و *Thymus ciliatus* (Desf.) Benth. (الزعتر). حُدّد التركيب الكيميائي للزيت الأساسي لكل منهما باستعمال الكرماتوغرافيا GC-MS. يتكون زيت *R. officinalis* من 31 عنصرا منها أساسا camphre (41.2٪) ، camphène (18.1٪) و α-pinène(17.4٪) ؛ و يتكون زيت *T. ciliatus* من 58 عنصرا منها أساسا، بالنسبة المئوية، α-pinène (22.18)، myrcène (13.13)، β-pinène (7.69)، β-caryophyllene (10.23) و germacrene D (9.86). قُدّر النشاط المضاد للأكسدة باستخدام ثلاث طرق: كان المستخلص الميثانولي لإكليل الجبل الأكثر فعالية والأقرب إلى المواد الاصطناعية المضادة للأكسدة BHA، BHT وحمض الأسكوربيك؛ DPPH (IC_{50}= 13.33 ±0.13µg/ml) ، β-carotène/acide linoléique (IC_{50} = 38.11 ± 2.26 µg/ml)، والقدرة الإرجاعية pouvoir réducteur (EC_{50} = 14.03 ± 1.35 µg/ml). طُبّق النشاط المضاد للفطريات على 32 فطر ممرض للنباتات و مسبب لتلوث الأغذية و ذلك باستعمال أربع طرق في الوسط الزراعي الصلب. كان المستخلص الميثانولي (0.7 g/ml)، المطبق بطريقة الآبار، الأقل فعالية. أدى تطبيق مسحوق النبتة بطريقة المزج بالوسط الزراعي (بنسبة 10٪) إلى تخفيض نمو 21.88٪ و 6.25٪ من جميع الفطريات، إلى أكثر من 50٪، لكل من *R. officinalis* و *T. ciliatus* على التوالي. أما الزيت الأساسي فطُبّق بتراكيز مختلفة. أدى التطبيق بطريقة المزج بالوسط الزراعي (1500µl/l) إلى تثبيط نمو 50٪ من مجموع الفطريات، بمقدار 50 و 75٪ ، لكل من *R. officinalis* و *T. ciliatus* على التوالي، مع تثبيط تام لأربعة فطريات .كما أدى تطبيقه بطريقة التبخير (15µl) إلى تثبيط 65٪ من مجموع الفطريات بمقدار 65 و 81.25٪ لكل من *R. officinalis* و *T. ciliatus* على التوالي، مع تثبيط تام لخمسة فطريات. و رافق التثبيط تأثير واضح على إنتاج الأبواغ حيث كانت درجة التبوغ من ضعيفة الى منعدمة. بينت هذه النتائج جزءا هاما من إمكانات النبتتين المدروستين في مكافحة الأمراض و التلوثات الفطرية في المواد الغذائية وقدمت الصفة التي تجعل منها مصدرا بديلا للمبيدات الكيميائية والمواد الحافظة التركيبية، و يبقى مجال الدراسات مفتوحا لإيجاد تقنيات التطبيق الملائمة في مجال السلامة الغذائية.

كلمات مفتاحية : الإثنونباتية، العائلة الشفوية، الزيوت الأساسية، GC-MS، النشاط المضاد للأكسدة، النشاط المضاد للفطريات، *R.officinalis*، *T. ciliatus*.

Abstract

The aim of this study is to inventory the common medicinal plants of the Labiatae family used by the population of the M'sila region, and to evaluate the *in vitro* antioxidant and antifungal activities of the essential oils (EO) and methanol extracts (ME) from two labiates. An ethnobotanical survey was conducted at the study area and used labiates were listed. Two very common labiates were chosen for this study: *Rosmarinus officinalis* L. (rosemary) and *Thymus ciliatus* (Desf) Benth. (thyme). The chemical composition of EOs was determined by GC-MS. *R. officinalis* EO is composed of 31 components of which mainly camphor (41.2%), camphene (18.1%) and α-pinene (17.4%); *T. ciliatus* EO is composed of 58 items components of which mainly, in percentage, α-pinene (22.18), myrcene (13.13), β-pinene (7.69), β-caryophyllene (10.23) and germacrene D (9.86). The antioxidant activity was assessed using three methods: rosemary ME was the most potent and the closest to synthetic antioxidants BHA, BHT and ascorbic acid; DPPH (IC_{50} = 13.33 ± 0.13 µg/ml), β-carotene/linoleic acid (IC_{50} = 38.11 ± 2.26 µg/ml) and reducing power (EC_{50} = 14.03 ± 1.35µg/ml). The antifungal activity was applied to 32 plant pathogenic and foodborne fungi. Four methods were applied to solid medium: the ME, applied by well diffusion method (0.7g/ml), was less effective. The incorporation of the powdered plant into the culture medium (at 10%) reduced the growth of 21.88% and 6.25% of all fungi, to greater than 50%, for *R. officinalis* and *T. ciliatus* respectively. Different concentrations of EO were tested. Applied EO by incorporation into the culture medium (1500µl/l) inhibited 50% of the molds to the levels 50 and 75% for *R. officinalis* and *T. ciliatus* respectively, with complete inhibition of 4 fungi. Fumigated EO (15µl) inhibited 65% of the molds to the levels 65 and 81.25% for *R. officinalis* and *T. ciliatus* respectively, with complete inhibition of 5 fungi. The inhibition was accompanied by low or absent sporulation. Our results revealed some of the potential of studied plants to fight against fungal diseases in foods and presented their promising character of being an alternative source of chemical pesticides and synthetic preservatives. Further studies are needed to find adequate application techniques in the food safety area.

Keywords: ethnobotany, lamiaceae, essential oils, GC-MS, antioxidant activity, antifungal activity, *R. officinalis*, *T. ciliatus*.

Résumé

Le but de cette étude est d'inventorier les plantes médicinales de la famille des labiées courantes et utilisées par la population de la région de M'sila, et d'évaluer *in vitro* les activités antioxydante et antifongique des huiles essentielles (HE) et des extraits méthanoliques (EM) issues de deux labiées. Une enquête ethnobotanique a été menée au niveau de la région d'étude et une liste des labiées utilisées a été dressée. Deux labiées très fréquentes ont été choisies pour notre étude: *Rosmarinus officinalis* L. (romarin) et *Thymus ciliatus* (Desf) Benth. (thym). La composition chimique des HEs a été déterminée par GC-MS. L'HE de *R. officinalis* est composée de 31 éléments dont principalement le camphre (41.2%), camphène (18.1%) et α-pinène (17.4%) ; celle de *T. ciliatus* est composée de 58 éléments dont principalement en pourcentage α-pinène (22.18), myrcène (13.13), β-pinène (7.69), β-caryophyllène (10.23) et germacrène D (9.86). L'activité antioxydante a été évaluée selon trois méthodes : l'EM du romarin était le plus puissant, et le plus proche aux antioxydants synthétiques BHA, BHT et acide ascorbique; DPPH (IC_{50}= 13.33 ± 0.13 µg/ml), β-carotène/acide linoléique (IC_{50}= 38.11 ± 2.26µg/ml) et pouvoir réducteur (EC_{50}= 14.03 ± 1.35µg/ml). L'activité antifongique s'est appliquée sur 32 champignons phytopathogènes et de contamination alimentaire. Quatre méthodes ont été appliquées sur milieu solide: l'EM, appliqué par méthode des puits de diffusion (0.7g/ml), était le moins efficace. L'incorporation de la plante en poudre au milieu de culture (à 10%) a réduit la croissance de 21.88% et 6.25% de l'ensemble des champignons, à plus de 50%, pour *R. officinalis* et *T. ciliatus* respectivement. Différentes concentrations d'HE ont été testées. L'HE appliquée par incorporation au milieu de culture (1500µl/l) a inhibé 50% des champignons aux niveaux 50 et 75% pour *R. officinalis* et *T. ciliatus* respectivement, avec une inhibition totale de 4 champignons. La fumigation d'HE (15µl) a inhibé 65% des champignons aux niveaux 65 et 81.25% pour *R. officinalis* et *T. ciliatus* respectivement, avec une inhibition totale de 5 champignons. L'inhibition a été accompagnée d'une sporulation faible voire absente. Nos résultats ont révélé une partie du fort potentiel des plantes étudiées pour lutter contre les maladies fongiques dans les aliments et ont présenté leur caractère prometteur d'être une source alternative aux pesticides chimiques et conservateurs synthétiques. D'autres études sont nécessaires pour trouver des techniques d'application adéquates dans le domaine de sécurité alimentaire.

Mots clés: ethnobotanique, lamiaceae, huiles essentielles, GC-MS, activité antioxydante, activité antifongique, *R. officinalis*, *T. ciliatus*.