

Université MUSTAPHA Stambouli

Mascara



جامعة مصطفى أسطمبولي

معسكر

Faculté des Sciences de la Nature et de la vie

Département de Biologie

Laboratoire de Bioconversion, Génie Microbiologique et Sécurité Sanitaire,

Université de Mascara

Laboratoire de Valorisation des Ressources Végétales et Sécurité Alimentaire

dans les Zones Semi Arides du Sud-Ouest Algérien

THESE de DOCTORAT en SCIENCES

Spécialité Sciences de la Nature et de la vie

Intitulée

Etude des effets antifongiques et antimycotoxiques des extraits des plantes médicinales de la région de Béchar.

Présentée par : Mr KHALDI Achraf

Le 11/10/2017

Devant le jury :

Présidente	TIR TOUIL Aicha	Professeur	Université de Mascara
Examineur	BELABID Lakhdar	Professeur	Université de Mascara
Examinatrice	DJAFRI Ayada	Professeur	Université d'Oran 1
Examineur	ABOUNI Bouziane	Professeur	Université de SBA
Encadreur	MEDDAH Boumediene	Professeur	Université de Mascara
Co-Encadreur	MOUSSAOUI Abdellah	Professeur	Université de Bechar

Année Universitaire : 2016-2017

PUBLICATIONS

LISTE DES PUBLICATIONS ET DES COMMUNICATIONS

Ce travail a fait l'objet publications et de participation à des séminaires internationaux et à des journées nationales.

PUBLICATIONS

Achraf Khaldi, Boumedién Meddah, Abdellah Moussaoui, Pascal Sonnet and Moulay M'hammed Akermly. Chemical composition and antifungal activity of essential oil of *Anethum graveolens* L. from South-western Algeria (Bechar). [Journal of Chemical and Pharmaceutical Research](#), 2015, 7(9):615-620.

Achraf Khaldi, Boumedién Meddah, Abdellah Moussaoui & Pascal Sonnet. Anti-mycotoxin Effect and Antifungal Properties of Essential Oil from *Ammodaucus leucotrichus* Coss. & Dur. on *Aspergillus flavus* and *Aspergillus ochraceus*. [Journal of Essential Oil Bearing Plants](#), Mars 2017, DOI: 10.1080/0972060X.2017.1282840.

POSTERS PRESENTATIONS

1. **Khaldi Achraf**, Meddah Boumedienne, Moussaoui Abdallah, Akermly Moulay M'hammed. Effet des essences végétales de deux plantes aromatiques du sud-ouest algérien sur la croissance fongique : *Saccocalyx satureioides* Coss. et Dur. et *Anvillea radiata* Coss Dur. [Journées Internationales de Biotechnologies](#). Sousse, Tunisie le 19 au 22 Décembre 2011.
2. **Khaldi Achraf**, Meddah Boumedienne, Moussaoui Abdallah, Akermly Moulay M'hammed, Slimani Alaa. Effet des essences végétales de deux plantes aromatiques du sud-ouest algérien sur l'action mycotoxique de certaines souches productrices des mycotoxines : *Saccocalyx satureioides* Coss. et Dur. et *Artemisia campestris* L. [Séminaire National sur les Plantes Spontanées du Sahara "Biodiversité Foristique, Un Patrimoine Méconnu"](#) (SNPS 2012) Ghardaia, Algérie le 12 au 13 Décembre 2012.
3. **Khaldi Achraf**, Meddah Boumedienne, Moussaoui Abdallah. Effet des essences végétales de deux plantes aromatiques du sud-ouest algérien sur le développement *in vitro* des moisissures. [8ème Symposium National de Chimie Organique Industrielle et Pharmaceutique \(SNCOIP-8\) Alger](#), Sidi-Fredj le 07 et 08 Novembre 2012.
4. **Khaldi Achraf**, Meddah Boumedienne, Moussaoui Abdallah, Akermly Moulay M'hammed. Étude de l'activité antifongique de l'huile essentielle de *Saccocalyx satureioides* Coss. et Dur. sur les différentes étapes du développement des moisissures. [Congrès International "Microbiol Biotechnology for Development" \(MICROBIOD 2\) Marrakesh](#), Maroc le 02 au 04 Octobre 2012.
5. **Khaldi Achraf**, Meddah Boumedienne, Moussaoui Abdallah. Antifungal Activity of the Essential Oil from *Ammodaucus Leucotrichus* Coss Dur on Fungal Species Development. [Fourth International Conference on Food Studies](#). Monash University Prato Centre, Prato, Italy le 20 au 21 Octobre 2014.

6. **Khalid Achraf**, Meddah Boumedienne, Moussaoui Abdallah. Antifungal activity of essential oil from *Ammodaucus leucotrichus* Coss. & Dur. growing wild in South West of Algeria on the fungic growth. [Pichia 2016 Conferences, April 3-6, 2016 / Antalya, Turkey.](#)



Dédicaces

*A L'aide De Dieu J'ai Pu Réaliser Ce Modeste Travail Que Je
Dédie :*

*A Allah le tout puissant et Miséricordieux et à son Prophète
Mohammed (que le salut et la paix de Dieu soient sur lui)*

*A La mémoire de mon très cher père, qui me fait l'exemple dans la vie,
que Dieu lui accorde son éternelle miséricorde et ma très chère mère pour tout
l'amour, sa tendresse et ses sages conseils qu'elle n'a pas cessé de me
donner, que Dieu me la garde.*

*A Ma Femme, qui a suivais mon travail de près avec patience et
respect, soucieuse des plus petits détails et qui m'a encouragée à me lancer
dans ce projet et qui a facilitée les week-ends de travail par son
encouragement interminable.*

*A Mes enfants Lamis Katr Ennada, Ritadj minnete arrahmane,
mohammed djihad, açil amat allah et à la mémoire de ma petite aline.*

A mon frère Aboubakar Sedik et ses enfants.

A mes sœurs Amina, Asma.

*A Mohammed avec qui j'ai partagé mes rêves et mes plus beaux
souvenirs.*

A ma famille et tous mes proches.

A mes amis (es) et tous ceux qui me sont chers.

Pour ceux que j'aime

Achraf





REMERCIEMENTS

Avant tout, mes remerciements infinis sont adressés à « Dieu le Tout Puissant » de m'avoir donné le courage et la santé pour achever ce travail.

Je voudrais adresser mes sincères remerciements et ma gratitude la plus profonde à tous ceux qui ont aidé à l'accomplissement de ce travail. Parmi eux je remercie chaleureusement Professeur **MEDDAH. B**, mon directeur de thèse, Professeur à l'Université De Mascara, d'avoir accepté de diriger cette thèse et de m'avoir reçu au sein de son équipe, de la confiance qu'il m'a accordée, et de son soutien scientifique et moral tout au long du travail ; merci d'avoir cru en moi, et en mon travail.

Je tiens à dire un grand merci au Professeur **MOUSSAOUI. A**, mon co-directeur de thèse, Professeur à l'Université De Bechar, pour m'avoir d'une part accueilli dans son laboratoire de recherche -laboratoire de valorisation des ressources végétales et sécurité alimentaire dans les zones semi arides du sud-ouest Algérien sis à l'université de Bechar, pour son aide précieuse et sa collaboration dans la réalisation de ce travail, ces idées, ces conseils précieux, aussi également au Professeur **CHABANE SARI. D**, Professeur à l'Université De Tlemcen, de m'avoir aidé durant mon expérimentation.

J'adresse mes remerciements à tous les membres du jury d'avoir accepté de juger ce travail et d'en être rapporteurs et surtout pour l'intérêt qu'ils ont porté à mon travail. Je suis très heureux de bénéficier de vos recommandations et je tiens à vous exprimer ma sincère reconnaissance pour votre intérêt. J'espère vraiment être à la hauteur de vos espérances :

▣ *Mr* : **TIR TOUIL. A** Professeur à l'université de Mascara pour avoir fait l'honneur de présider ce jury de thèse.

▣ *Mr* : **BELABID. L** Professeur à l'université de Mascara pour avoir accepté de participer à cette commission d'examen.

▣ *Mr* : **DJAFRI. A** Professeur à l'université d'Oran 1 pour avoir accepté d'être rapporteur de ce travail.

▣ *Mr*: **ABOUNI. B** Professeur à l'université SBA pour avoir accepté de faire partie de mon jury de thèse.

J'exprime aussi ma gratitude au *Mr* **BENMEHDI. H** maitre de conférences à l'université de Bechar qui a sacrifié de leur temps pour répondre à mes questions nombreuses et me guider sur le plan scientifique et pour son aide précieuse au moment de l'élaboration de la publication.

Je remercie également *Mr* **Akermi. M.M**, maitre-assistant à l'université de Bechar, pour sa collaboration technique et scientifique et son aide d'avoir les échantillons.

Un merci spécial pour mes collègues et amis au laboratoire, qui ont contribué par leur soutien et amitié, chacun à sa façon, à la progression de mon travail. **Gouri, Mebarki, Felah, Amrouche, Makhloufi, Belarbi, Baloufa, Boussouar, Kadi, Maazouzi, Dris, Dalil, Nahal et slimani sans oublier mes étudiants de master et de PFE.** Merci d'être toujours disponibles et de m'avoir accompagné pendant toutes les étapes de ce travail avec toute l'attention et l'amitié.

Et à tous ceux qui ont, de près ou de loin, contribué à la réalisation de ce travail.

Veuillez accepter nos remerciements chaleureux.

ملخص

هذا البحث يدرس مكونات الزيوت العطرية الكيميائية وفعاليتها تأثيرها على النشاط المضاد للفطريات للنباتات *Ammodaucus* ، *Artemisia campestris* L. ، *Saccocalyx satureioides* Coss. et Dur. ، *Anethum graveolens* L. ، *leucotrichus* Coss. & Dur. التي تنمو في الجنوب الغربي الجزائري.

استخراج الزيوت العطرية تم عن طريق التقطير المائي ، التركيب الكيميائي للزيوت تم عن طريق التحاليل الكروماتوغرافية (CG et CG/SM) ، تحاليل اخرى فيزيوكيميائية قد تم تحديدها في هذه الدراسة. فعالية الزيوت العطرية على النشاط المضاد للفطريات تمت دراستها ضد سبع فطريات. الزيوت و الجزء الطيار منها تمت دراستها على التبوغ ، نمو الفطر ، التبرعم و افراز السموم الفطرية.

النباتات المراد اختبارها اعطت عائد جيد من الزيت العطري والذي يتراوح ما بين 2,10% الى 2,41% باستثناء نبتة *Artemisia campestris* L بعائد 0,37%.

تحاليل CG et CG/SM اظهرت ان زيت *Saccocalyx satureioides* Coss. et Dur. يتميز بتواجد *Artemisia campestris* (32,65%) *sterpinéol* (22,26%) كمكونات كيميائية اساسية، زيت *Ammodaucus* L. مكون اجمالا من *spathulenol* (27,81%) و *Z,E-farnesol* (19,08%) ، زيت *leucotrichus* Coss. & Dur. غني بوجود *perilla aldehyde* (81,62%) ، في حين ان زيت *Anethum graveolens* L. يتكون اساسا من *apiol* (32,78%) و *carvone* (31,04%) .

زيت *Ammodaucus leucotrichus* Coss. & Dur. اظهر فعالية كبيرة لتثبيط نمو الفطريات بحيث ان جميع الفطريات تم تثبيطها بتركيز مثبط منخفض (CMI) ابتداء من $1/3000$ v/v متبوع بزيت *Saccocalyx satureioides* Coss. et Dur. بتركيز $1/880$ v/v CMI وزيت *Anethum graveolens* L. بتركيز $1/500$ v/v CMI. في حين ان زيت *Artemisia campestris* L. يعتبر الاقل فعالية بتركيز $1/70$ v/v CMI.

في الواقع النتائج المتحصل عليها ابانت عن تثبيط مؤثر لزيوت العطرية حيث ان الجزء الطيار منها كان فعال على التبوغ اكثر منه على نمو الفطر و مع ذلك، تأثيرها على التبرعم كان ايضا فعال. ضف الى ذلك ان الزيوت العطرية اظهرت نشاط مضاد لإفراز السموم الفطرية جد هام تجاه السلالات الفطرية المنتجة للسموم ، باستثناء زيت *Artemisia campestris* L. الذي ظهر اقل فعالية.

الكلمات المفتاحية: زيت عطري، نبات. ، المكونات الكيميائية ، النشاط المضاد للفطريات.

ABSTRACT

This work studies the antifungal activity and chemical composition of the essential oils of South-western Algeria *Saccocalyx satureioides* Coss. et Dur., *Artemisia campestris* L., *Ammodaucus leucotrichus* Coss. & Dur. and *Anethum graveolens* L.

The essential oils were isolated by hydrodistillation, the chemical composition of the oils was determined by chromatographic and mass spectroscopy analysis (GC and GC-MS). Other physicochemical parameters are also measured in this study. The antifungal activity of the essential oils was studied with respect to seven fungi, oils and their volatile fractions were tested on germination, mycelial growth, sporulation and mycotoxicological fungal sensitivity.

Tested local plants provided the good yield in essential oil which ranges from 2,10% to 2,41% except that obtained from *Artemisia campestris* L. which is 0,37%.

The GC and GC/MS analysis showed that the major components of essential oil of *Saccocalyx satureioides* Coss. et Dur. were α -terpinéol (32.65%) and thymol (22.26%), essential oil of *Artemisia campestris* L. contains mainly spathulenol (27,81%) and Z,E-farnesol (19,08%), essential oil of *Ammodaucus leucotrichus* Coss. & Dur. was dominated by perilla aldehyde (81,62%), whereas essential oil of *Anethum graveolens* L. is dominated by apiol (32.78%) and carvone (31,04%) .

The essential oil of *Ammodaucus leucotrichus* Coss. & Dur. showed a stronger activity against mycelial growth, all strains were inhibited at minimum inhibitory concentration (MIC) as weak as 1/3000 v/v, followed by essential oil of *Saccocalyx satureioides* Coss. et Dur. with MIC as from 1/880 v/v and essential oil of *Anethum graveolens* L. with MIC as from 1/500 v/v. However, essential oil of *Artemisia campestris* L. showed less active with MIC as from 1/70 v/v.

Indeed, the results revealed that an important inhibitory activity of essential oils, whose their volatile fraction was active against sporulation the spores better than the mycelial growth of the moulds. However, their effect on the germination is also very favorable.

Similarly, the studied oils showed that an important anti-mycotoxin activity against toxigenic fungi produce mycotoxins. Except essential oil of *Artemisia campestris* L. which is moderately active.

Keywords: Essential oil, plant, chemical composition, antifungal activity.

RÉSUMÉ

Ce travail vise l'étude du pouvoir antifongique et la composition chimique des huiles essentielles de *Saccocalyx satureioides* Coss. et Dur., *Artemisia campestris* L., *Ammodaucus leucotrichus* Coss. & Dur. et *Anethum graveolens* L. de la région Sud-ouest de l'Algérie.

L'extraction des essences a été effectuée par hydrodistillation, la composition chimique des huiles a été déterminée par une analyse chromatographique en phase gazeuse (CG) et par couplage chromatographie en phase gazeuse-spectrométrie de masse (CG/SM). D'autres paramètres physicochimiques ont été déterminés dans cette étude. L'activité antifongique de ces essences a été étudiée vis-à-vis de sept champignons, les huiles et leurs fractions volatiles ont été testées sur la germination, la croissance mycélienne, la sporulation et sur la sensibilité fongique mycotoxique.

Les plantes locales testées ont fourni un bon rendement en huile essentielle qui s'échelonne entre 2,10% à 2,41% sauf, à celui obtenu à partir d'*Artemisia campestris* L. qui est 0,37%.

Les analyses (CG et CG/SM) ont montré que l'HE de *Saccocalyx satureioides* Coss. et Dur. est caractérisée par la présence de terpinéol (32,65%) et le thymol (22,26%) comme principaux constituants chimiques, l'HE d'*Artemisia campestris* L. est formée en majorité par le spathulenol (27,81%) et le Z,E-farnesol (19,08%), l'HE *Ammodaucus leucotrichus* Coss. & Dur. est très riche en perilla aldehyde (81,62%), alors que l'HE d'*Anethum graveolens* L. est dominée par le apiol (32,78%) et la carvone (31,04%).

L'HE d'*Ammodaucus leucotrichus* Coss. & Dur. a montré une forte activité antifongique sur la croissance mycélienne, toutes les souches fongiques ont été inhibées à une très faible concentration minimale inhibitrice (CMI) de l'ordre de 1/3000 v/v, suivie, par l'HE de *Saccocalyx satureioides* Coss. et Dur. avec une CMI de 1/880 v/v et l'HE d'*Anethum graveolens* L. avec une CMI de 1/500 v/v. Cependant, l'HE d'*Artemisia campestris* L. est avérée la moins active avec une CMI de 1/70 v/v.

En effet, les résultats obtenus révèlent une inhibition significative par les huiles essentielles ou leur fraction volatile tant sur la sporulation des spores que sur la croissance mycélienne des champignons. Néanmoins, leur action sur la germination est très favorable. De même, les essences faisant l'objet de cette étude ont montré une importante activité antimycotoxigène vis-à-vis les souches fongiques productrices des mycotoxines, à l'exception de l'HE d'*Artemisia campestris* L. qui est modérément active.

Mots clés : Huile essentielle, plante, composition chimique, activité antifongique.

LISTE DES ABREVIATIONS

ABTS	2, 2 azinobis-3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid.
AF	Aflatoxines
AFB1, B2, G1, G2, M1	Aflatoxine B1, B2, G1, G2, M1
CMI	Concentration minimale inhibitrice
CPG	Chromatographie en Phase Gazeuse
CPG/SM	Couplage de la chromatographie en phase gazeuse à la spectrométrie de masse
DAS	Diacétoxyscirpénol
DMSO	Diméthylsulfoxyde
DON	Désoxynivalénol
DPPH	2, 2- diphenyl-1- picrylhydrazyl.
FB1, FB2, FB3, FB4	Fumonisine B1, B2, B3, B4
HD	Hydro-distillation.
H.E	Huile essentielle
IRTF	Infra-Rouge par Transformée de Fourier
IUCN	International Union for Conservation of Nature and Natural Resources
MAE	Extraction assistée par micro-ondes.
MMP	Potentiel de la membrane mitochondriale
NIST	National Institute of Standards and Technology
NO	Oxyde nitrique
OTA, OTB, OTC	Ochratoxine A, B, C
PAM	Plantes aromatiques et médicinales
ROS	Espèces réactives de l'oxygène
SM-IE	Spectrométrie de masse en mode impact électronique
SPME	Solid Phase Micro-Extraction
ZEA	Zéaralénone

LISTE DES TABLEAUX

Pages

Tableau 1 : Différents types de molécules dans l'huile essentielle	15
Tableau 2 : Classification botanique de <i>Saccocalyx satureioides</i> Coss. et Dur. dans la systématique	22
Tableau 3 : Classification botanique d' <i>Artemisia campestris</i> L. dans la systématique	25
Tableau 4 : Classification botanique d' <i>Ammodaucus leucotrichus</i> Coss. & Dur. dans la systématique	29
Tableau 5 : Classification botanique d' <i>Anethum graveolens</i> L. dans la systématique	32
Tableau 6 : Mycotoxines et moisissures productrices associées	42
Tableau 7 : Points de fusion et données spectrales des aflatoxines	44
Tableau 8 : Toxicité de différentes mycotoxines	47
Tableau 9 : Origine, date des prélèvements et parties utilisées des plantes	50
Tableau 10 : Les souches fongiques utilisées dans l'étude	56
Tableau 11 : Caractéristiques physiques et chimiques des huiles essentielles fraîchement extraites	68
Tableau 12 : Composition chimique de l'essence <i>Saccocalyx satureioides</i> Coss. et Dur.	73
Tableau 13 : Composition chimique d'huile essentielle d' <i>Artemisia campestris</i> L.	74
Tableau 14 : Composition chimique d'huile essentielle d' <i>Ammodaucus leucotrichus</i> Coss. & Dur.	75
Tableau 15 : Composition chimique d'huile essentielle d' <i>Anethum graveolens</i> L.	76
Tableau 16 : Activité antifongique de l'huile essentielle de <i>Saccocalyx satureioides</i> Coss. et Dur. sur la croissance radiale, sporulation et germination exprimé en (%)	77
Tableau 17 : Activité antifongique de l'huile essentielle d' <i>Artemisia campestris</i> L. sur la croissance radiale, sporulation et germination exprimé en (%)	78
Tableau 18 : Activité antifongique de l'huile essentielle d' <i>Ammodaucus leucotrichus</i> Coss. & Dur. sur la croissance radiale, sporulation et germination exprimé en (%)	80
Tableau 19 : Activité antifongique de l'huile essentielle d' <i>Anethum graveolens</i> L. sur la croissance radiale, sporulation et germination exprimé en (%)	81
Tableau 20 : Activité antimycotoxinogène de différentes huiles essentielles exprimé en (%)	98

LISTE DES FIGURES

Pages

Figure 1 : Glandule sécrétrice sur la surface supérieure de la feuille d' <i>Origanum heracleoticum</i> , montrant l'espace subcuticulaire rempli d'huile essentielle	08
Figure 2 : Glandes sécrétrices	09
Figure 3 Système d'extraction des huiles essentielles par entraînement à la vapeur	11
Figure 4 : Système d'extraction des huiles essentielles par micro-ondes	13
Figure 5 : Schéma de fonctionnement d'un spectromètre de masse	20
Figure 6 : Les grands groupes des eumycètes	37
Figure 7 : Structures chimiques des différentes aflatoxines	43
Figure 8 : Structures chimiques de l'OTA	45
Figure 9 : Métabolisme de l'aflatoxine B1 dans le foie	48
Figure 10 : Métabolisme de l'OTA dans le foie	49
Figure 11 : Cartes géographiques des zones de prélèvement	51
Figure 12 : Type d'inoculation des différents isolats d' <i>Aspergillus et Penicillium</i>	58
Figure 13 : Souches cultivées par méthode « Single Spore » sur milieu PDA à 25°C/7 jours	58
Figure 14 : Méthode d'extraction d'aflatoxine et ochratoxines	64
Figure 15 : Rendement en huile essentielle extrait par hydro-distillation pour les quatres plantes testées	67
Figure 16 : Profil chromatographique de l'huile essentielle de <i>Saccocalyx satureioides</i> Coss. et Dur.	73
Figure 17 : Profil chromatographique de l'huile essentielle d' <i>Artemisia campestris</i> L.	74
Figure 18 : Profil chromatographique de l'huile essentielle d' <i>Ammodaucus leucotrichus</i> Coss. & Dur.	75
Figure 19 : Profil chromatographique de l'huile essentielle d' <i>Anethum graveolens</i> L.	76
Figure 20 : Comptage des spores dans la cellule de Malassez par microscope optique (x10) (x40)	93
Figure 21 : Observation microscopique (x40) des spores germées et non germées d' <i>Alternaria</i>	93
Figure 22 : Observation microscopique (x40) des spores germées et non germées d' <i>A. ochraceus</i>	93

LISTE DES PHOTOS

Pages

Photo 1 : <i>Saccocalyx satureioides</i> Coss. et Dur.	21
Photo 2 : <i>Artemisia Campestris</i> L.	24
Photo 3 : <i>Ammodaucus leucotrichus</i> Coss. & Dur.	28
Photo 4 : <i>Anethum graveolens</i> L.	32
Photo 5 : <i>Aspergillus flavus</i> par méthode « Single Spore » sur milieu PDA à 25°C	61
Photo 6 : <i>Aspergillus ochraceus</i> par méthode « Single Spore » sur milieu PDA à 25°C	61
Photo 7 : <i>Aspergillus flavus parasiticus</i> sur milieu AFAP à 25°C	61
Photo 8 : Face revers d' <i>Aspergillus flavus parasiticus</i> sur milieu AFAP à 25°C	61
Photo 9 : H.E de <i>Saccocalyx satureioides</i> Coss. et Dur.	65
Photo 10 : H.E d' <i>Artemisia campestris</i> L.	65
Photo 11 : H.E d' <i>Ammodaucus leucotrichus</i> Coss. & Dur.	65
Photo 12 : H.E d' <i>Anethum graveolens</i> L.	65
Photo 13 : Effet de l'huile essentielle de <i>Saccocalyx satureioides</i> Coss. et Dur. sur <i>A. flavus</i>	82
Photo 14 : Effet de l'huile essentielle de <i>Saccocalyx satureioides</i> Coss. et Dur. sur <i>A. niger</i>	82
Photo 15 : Effet de l'huile essentielle de <i>Saccocalyx satureioides</i> Coss. et Dur. sur <i>A. ochraceus</i>	82
Photo 16 : Effet de l'huile essentielle de <i>Saccocalyx satureioides</i> Coss. et Dur. sur <i>P. expansum</i>	83
Photo 17 : Effet de l'huile essentielle (v/v) de <i>Saccocalyx satureioides</i> Coss. et Dur. sur <i>Fusarium oxysporum f.sp. albedinis</i>	83
Photo 18 : Effet de l'huile essentielle (v/v) de <i>Saccocalyx satureioides</i> Coss. et Dur. sur <i>Alternaria</i>	83
Photo 19 : Effet de l'huile essentielle (v/v) de <i>Saccocalyx satureioides</i> Coss. et Dur. sur <i>Cladosporium</i>	84
Photo 20 : Effet de l'huile essentielle (v/v) d' <i>Artemisia campestris</i> L. sur <i>A. flavus</i>	84
Photo 21 : Effet de l'huile essentielle (v/v) d' <i>Artemisia campestris</i> L. sur <i>A. niger</i>	84
Photo 22 : Effet de l'huile essentielle (v/v) d' <i>Artemisia campestris</i> L. sur <i>Aspergillus ochraceus</i>	85
Photo 23 : Effet de l'He (v/v) d' <i>Artemisia campestris</i> L. sur <i>Penicillium expansum</i>	85
Photo 24 : Effet de l'huile essentielle (v/v) d' <i>Artemisia campestris</i> L. sur <i>Fusarium oxysporum f.sp. albedinis</i>	85
Photo 25 : Effet de l'huile essentielle (v/v) d' <i>Artemisia campestris</i> L. sur <i>Alternaria</i>	86
Photo 26 : Effet de l'huile essentielle (v/v) d' <i>Ammodaucus leucotrichus</i> Coss. & Dur. sur <i>A. flavus</i>	86
Photo 27 : Effet de l'huile essentielle (v/v) d' <i>Ammodaucus leucotrichus</i> Coss. & Dur. sur <i>A. niger</i>	86
Photo 28 : Effet de l'huile essentielle (v/v) d' <i>Ammodaucus leucotrichus</i> Coss. & Dur. sur <i>Aspergillus ochraceus</i>	87
Photo 29 : Effet de l'huile essentielle (v/v) d' <i>Ammodaucus leucotrichus</i> Coss. & Dur. sur <i>Penicillium expansum</i>	87
Photo 30 : Effet de l'huile essentielle (v/v) d' <i>Ammodaucus leucotrichus</i> Coss. & Dur. sur <i>Fusarium oxysporum f.sp. albedinis</i>	87
Photo 31 : Effet de l'huile essentielle (v/v) d' <i>Ammodaucus leucotrichus</i> Coss. & Dur. sur <i>Alternaria</i>	88
Photo 32 : Effet de l'huile essentielle (v/v) d' <i>Ammodaucus leucotrichus</i> Coss. & Dur. sur <i>Cladosporium</i>	88
Photo 33 : Effet de l'huile essentielle (v/v) d' <i>Anethum graveolens</i> L. sur <i>A. flavus</i>	88
Photo 34 : Effet de l'huile essentielle (v/v) d' <i>Anethum graveolens</i> L. sur <i>A. niger</i>	89
Photo 35 : Effet de l'huile essentielle (v/v) d' <i>Anethum graveolens</i> L. sur <i>Aspergillus ochraceus</i>	89
Photo 36 : Effet de l'huile essentielle (v/v) d' <i>Anethum graveolens</i> L. sur <i>Penicillium expansum</i>	89
Photo 37 : Effet de l'huile essentielle (v/v) d' <i>Anethum graveolens</i> L. sur <i>Fusarium oxysporum f.sp. albedinis</i>	90
Photo 38 : Effet de l'huile essentielle (v/v) d' <i>Anethum graveolens</i> L. sur <i>Alternaria</i>	90
Photo 39 : Effet de l'huile essentielle (v/v) d' <i>Anethum graveolens</i> L. sur <i>Cladosporium</i>	90

Photo 40 : <i>Aspergillus flavus</i> (S3) cultivée en milieu YES en présence des différentes concentrations (v/v) de l'HE de <i>Saccocalyx saturoioides</i> Coss. et Dur.	99
Photo 41 : <i>Aspergillus ochraceus</i> cultivée en milieu YES en présence des différentes concentrations (v/v) de l'HE de <i>Saccocalyx saturoioides</i> Coss. et Dur.	99
Photo 42 : <i>Aspergillus flavus</i> (S2) cultivée en milieu YES en présence des différentes concentrations (v/v) de l'HE d' <i>Artemisia campestris</i> L.	99
Photo 43 : <i>Aspergillus ochraceus</i> cultivée en milieu YES en présence des différentes concentrations (v/v) de l'HE d' <i>Artemisia campestris</i> L.	100
Photo 44 : <i>Aspergillus flavus</i> (S1) cultivée en milieu YES en présence des différentes concentrations (v/v) de l'HE d' <i>Ammodaucus leucotrichus</i> Coss. & Dur.	100
Photo 45 : <i>Aspergillus ochraceus</i> cultivée en milieu YES en présence des différentes concentrations (v/v) de l'HE d' <i>Ammodaucus leucotrichus</i> Coss. & Dur.	100
Photo 46 : <i>Aspergillus flavus</i> (S1) cultivée en milieu YES en présence des différentes concentrations (v/v) de l'HE d' <i>Anethum graveolens</i> L.	101
Photo 47 : <i>Aspergillus ochraceus</i> cultivée en milieu YES en présence des différentes concentrations (v/v) de l'HE d' <i>Anethum graveolens</i> L.	107
Photo 48 : CCM sous UV des isolats d' <i>Aspergillus flavus</i> (S1) cultivée en milieu YES en présence des différentes concentrations (v/v) de l'HE d' <i>Ammodaucus leucotrichus</i> Coss. & Dur.	103
Photo 49 : CCM sous UV des isolats d' <i>Aspergillus flavus</i> (S2) cultivée en milieu YES en présence des différentes concentrations (v/v) de l'HE d' <i>Anethum graveolens</i> L.	104
Photo 50 : CCM sous UV des isolats d' <i>Aspergillus flavus</i> (S3) cultivée en milieu YES en présence des différentes concentrations (v/v) de l'HE d' <i>Artemisia campestris</i> L.	104
Photo 51 : CCM sous UV des isolats d' <i>Aspergillus ochraceus</i> cultivée en milieu YES en présence des différentes concentrations (v/v) de l'HE d' <i>Artemisia campestris</i> L.	105
Photo 52 : CCM sous UV des isolats d' <i>A. ochraceus</i> cultivée en milieu YES en présence des différentes concentrations (v/v) de l'HE de <i>Saccocalyx saturoioides</i> Coss. et Dur.	105
Photo 53 : CCM sous UV des isolats d' <i>A. ochraceus</i> cultivée en milieu YES en présence des différentes concentrations (v/v) de l'HE d' <i>Anethum graveolens</i> L.	106
Photo 54 : CCM sous UV des isolats d' <i>A. ochraceus</i> cultivée en milieu YES en présence des différentes concentrations (v/v) de l'HE d' <i>Ammodaucus leucotrichus</i> Coss. & Dur.	106

SOMMAIRE

DEDICACES.....	IV
REMERCIEMENTS.....	V
ملخص.....	VII
ABSTRACT.....	VIII
RESUME.....	IX
Liste des abréviations.....	X
Liste des tableaux.....	XI
Liste des figures.....	XII
Liste des photos.....	XIII
SOMMAIRE.....	XV
INTRODUCTION GENERALE	
	01
PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE	
Chapitre I : Les Huiles Essentielles	
	04
I. Les Huiles Essentielles	04
I.1. L'Aromathérapie	04
I.2. Quelques dates importantes dans l'histoire de l'aromathérapie.....	04
I.3. Les huiles essentielles.....	07
I.3.1. Définition.....	07
I.3.2. Répartition.....	07
I.3.3. Origine dans les végétaux	08
II.3.3.1 Les systèmes sécréteurs.....	09
I.3.4. Les procédés d'extraction.....	10
I.3.4.1. La distillation.....	10
I.3.4.2. Expression à froid	11
I.3.4.3. Extractions par les solvants et par les graisses.....	12
I.3.4.4. Extraction par micro-ondes.....	12
I.3.4.5. Extraction au CO ₂ supercritique.....	13
I.3.5. Composition chimique.....	14
I.3.6. Les facteurs influençant la composition.....	15
I.3.7. Activités biologiques et pharmacologiques.....	17
I.3.7.1. Action anti-bactérienne.....	17
I.3.7.2. Action anti-fongique.....	18
I.3.8. Méthodes d'analyses de la composition chimique des huiles essentielles.....	18
I.3.8.1. Méthodes d'analyses physiques et chimiques.....	18
I.3.8.2. Identification des constituants d'une huile essentielle.....	19
Chapitre II : Généralités sur les plantes étudiées	
II. Généralités sur les plantes étudiées	21
II.1. <i>Saccocalyx satureioides</i> Coss. et Dur.	21
II.1.1. Description botanique	21
II.1.2. Systématique.....	22
II.1.3. Propriétés thérapeutiques.....	22
II.1.4. Composition chimique.....	23
II.2. <i>Artemisia campestris</i> L.....	23
II.2.1. Description botanique	24
II.2.2. Systématique	25
II.2.3. Propriétés thérapeutiques.....	25

II.2.4. Composition chimique.....	27
II.3. <i>Ammodaucus leucotrichus</i> Coss. & Dur.....	27
II.3.1. Description botanique	27
II.3.2. Systématique	29
II.3.3. Propriétés thérapeutiques.....	29
II.3.4. Composition chimique.....	30
II.4. <i>Anethum graveolens</i> L.....	31
II.4.1. Description botanique	31
II.4.2. Systématique	32
II.4.3. Propriétés thérapeutiques.....	32
II.4.4. Composition chimique	35

Chapitre III : Moisissures et mycotoxines

III. Moisissures et mycotoxines.....	37
III.1. Les moisissures.....	37
III.1.1. Caractères généraux et classification.....	37
III.1.2. Cycle de vie des moisissures	38
III.1.3. Identification des champignons	39
III.1.4. Habitat naturel des moisissures toxigènes	39
III.2. Les mycotoxines.....	40
III.2.1. Définition et caractéristiques des mycotoxines	40
III.2.2. Les différents types de mycotoxines.....	41
III.2.2.1. les mycotoxines ciblés dans cette étude.....	43
III.2.2.1.1. Les aflatoxines.....	43
III.2.2.1.1.1. Définition et structure chimique.....	43
III.2.2.1.1.2. Propriétés physico-chimiques des Aflatoxines.....	44
III.2.2.1.2. Les ochratoxines	45
III.2.2.1.2.1. Définition et structure chimique.....	45
III.2.2.1.2.2. Propriétés physico-chimiques.....	45
III.2.3. Conditions de mycotoxinogénèse	46
III.3. Effets des champignons et de leurs mycotoxines sur la santé humaine	47
III.3.1. Pouvoir cancérogène de l'aflatoxine B1.....	48
III.3.2. Métabolisation de l'ochratoxine A.....	49

MATERIELS ET METHODES

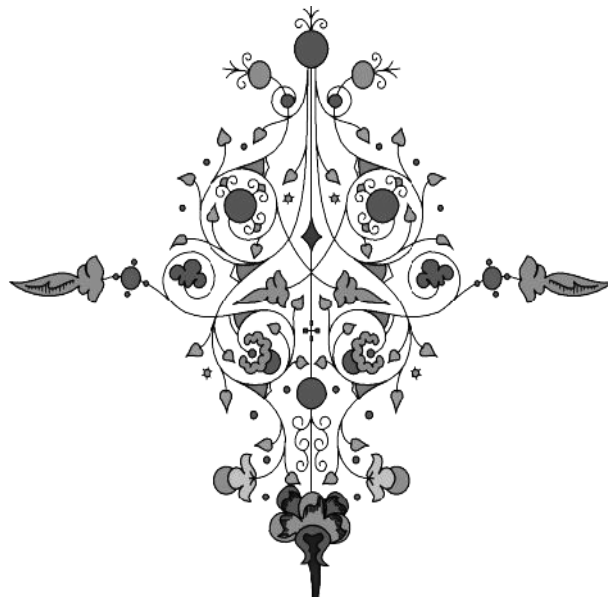
I. Choix du matériel végétal.....	50
II. Protocole expérimental	50
II.1. Récolte du matériel végétal et séchage	50
II.2. Extraction de l'huile essentielle	51
II.3. Analyses physicochimiques	52
II.3.1. Indices physiques	52
II.3.1.1. Point de congélation (NFT-75 102, 2000).....	52
II.3.1.2. La densité (NFT-75 111, 2000).....	52
II.3.1.3. Indice de réfraction (NFT-75 112, 2000).....	53
II.3.1.4. Pouvoir rotatoire (NFT-75 113, 2000)	53
II.3.1.5. Miscibilité a l'éthanol (NFT-75 101, 2000).....	54
II.3.2. Indices chimiques	54
II.3.2.1. Indice d'acide (NFT-75 103, 2000).....	54
II.3.2.2. Indice d'ester (NFT-75 104, 2000).....	54
II.4. Analyse chromatographique.....	55
II.5. Étude du pouvoir antifongique	56
II.5.1. Les souches fongiques testées.....	56
II.5.1.1. Identification et confirmation des souches fongiques.....	56

II.5.1.1.1. Identification des genres.....	57
II.5.1.1.2. Identification des espèces d' <i>Aspergillus</i> et <i>Penicillium</i>	57
II.5.2. Procédure microbiologique.....	59
II.5.2.1. Évaluation de la croissance radiale sur milieu solide.....	59
II.5.2.1.1. Préparation des suspensions sporales	59
II.5.2.1.2. Techniques d'activité antifongique des huiles essentielles.....	59
II.5.2.2. Évaluation de la sporulation.....	60
II.5.2.3. Évaluation de la germination.....	60
II.5.2.4. Activité antimycotoxinogène.....	61
II.5.2.4.1. Recherche des souches productrices d'aflatoxines et ochratoxines	61
II.5.2.4.2. Ensemencement sur milieu YES.....	62
II.5.2.4.3. Analyse chromatographique par CCM.....	62
II.5.2.4.3.1. Extraction des aflatoxines et ochratoxines.....	62
II.5.2.4.3.2. Séparation chromatographique.....	63
RÉSULTATS ET DISCUSSION	
I. Caractères organoleptiques	65
II. Rendement en huile essentielle.....	66
III. Résultats des analyses physicochimiques	67
III.1. Indices physicochimiques des huiles essentielles.....	67
III.2. Composition chimique des huiles essentielles.....	69
IV. Résultats d'Activité antifongique des huiles essentielles.....	76
IV.1. Croissance radiale sur milieu solide, Sporulation et germination.....	76
IV.2. Activité antimycotoxinogène.....	97
IV.2.1. Effet sur milieu YES.....	97
IV.2.2. Révélation des souches productrices de mycotoxines par CCM.....	101
CONCLUSION GENERALE	
	107
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	
	110
ANNEXES	
	131



Introduction

Générale



La plupart des denrées alimentaires, au cours de leurs préparations, mais surtout au cours de leurs entreposages, sont susceptibles d'être détériorées par des moisissures, les pertes qui leur incombent sont considérables (**Senhaji et al, 2006**). La contamination fongique d'un substrat ou d'un aliment provoque des modifications physiques et des modifications chimiques. Cette contamination des denrées alimentaires, destinées à l'homme ou à l'animal, est le principal dommage qui va entraîner de nombreux problèmes (**Tabuc, 2007**). Lorsque les conditions d'humidité et de température favorables sont réunies, ces moisissures peuvent produire des mycotoxines qui sont définies comme des substances d'origine fongique capables à faibles concentrations d'induire un effet toxique (**Reboux, 2006**).

En parallèle, ces dernières années on assiste à un regain d'intérêt élargi de plus en plus pour les plantes médicinales et aromatiques et pour leurs extraits, face à la méfiance accrue suscitée par l'usage des produits chimiques, aussi bien dans le domaine thérapeutique que dans le domaine alimentaire (**Senhaji et al, 2006**). En effet, plus de 50% des médicaments en usage clinique dans le monde sont à base de produits naturels ou de leurs dérivés (**Anne-Laure, 2002 ; Hamilton, 2003**).

Cette exploitation du potentiel chimique des ressources végétales passe par une première étape d'extraction des composés spécifique d'une espèce botanique sélectionnée. Ceux-ci, en générale, correspondent à des molécules à forte valeur ajoutée, mais présent en faible quantité. De nouveaux procédés d'extraction doivent donc être utilisés de façon à obtenir ces constituants dans une fraction de concentration maximale, et dans un état chimique le plus proche possible de leur structure native.

Parmi ces molécules, on rencontre des composés ayant une activité biologique, ainsi qu'une activité olfactive. Ces composés font partie d'un ensemble dénommé huile essentielle (**Hernandez ochoa, 2005**).

En effet, les plantes aromatiques et médicinales (PAM) constituent une richesse naturelle très importante dont la valorisation demande une parfaite connaissance des propriétés à mettre en valeur. Les propriétés médicales des plantes médicinales dépendent de la présence d'agents bioactifs variés et appartenant à différentes classes chimiques. Ces propriétés, dues souvent à la fraction d'huile essentielle contenue dans les plantes, qui contribue grandement à son activité biologique (organoleptique et pharmacologique) bien que les autres constituants (métabolites secondaires) peuvent aussi contribuer à cette action médicinale. L'utilisation des vertus antimicrobiennes des huiles essentielles ne date pas d'aujourd'hui et leur usage en médecine ne fut jamais abandonné malgré la découverte de processus de synthèse organique et la naissance de

l'industrie pharmaceutique. Elles sont considérées comme un véritable réservoir de molécules de base qui sont irremplaçables (**Beylier-Maurail, 1976 ; Pellecuer *et al*, 1976 ; Kurita *et al*, 1979 ; Benjlali *et al*, 1986 ; Hmamouchi *et al*, 1990 ; Lima *et al*, 1993 ; Bourrel *et al*, 1995 ; Ouraïni *et al*, 2003**).

Actuellement, l'utilisation des huiles essentielles s'effectue sur des bases scientifiques et rationnelles dans le but de mettre au point de nouveaux produits à divers usages médical, vétérinaire et cosmétique. Dans la littérature, plusieurs travaux de recherche ont prouvé les propriétés antimicrobiennes, antivirales et insecticides des composés terpénoïdes (**Carson et Riely, 1995 ; Tiziana Baratta, 1998**). Donc ces propriétés, peuvent être mises à profit pour traiter les infections fongiques, signalons que l'activité antifongique des huiles essentielles des plantes aromatiques a été confirmée par de nombreux auteurs.

Du point de vue floristique, le sud ouest algérien se caractérise par la prédominance d'espèces saharo-arabiques susceptibles d'avoir des propriétés thérapeutiques. Ces espèces sont à l'origine de produits à très forte valeur, ce qui fait de la région un remarquable laboratoire naturel.

Afin de contribuer à une meilleure valorisation de notre ressource végétale en l'occurrence *Saccocalyx satureioides* Coss. et Dur., *Ammodaucus leucotrichus* Coss. & Dur., *Artemisia campestris* L et *Anethum graveolens* L. récoltées dans le Sud-ouest algérien, ce travail aborde la caractérisation de la composition chimique et l'efficacité antifongique de leurs huiles essentielles.

Notre travail sera donc initié par une recherche bibliographique ou nous apportons dans le premier chapitre l'aromothérapie et les huiles essentielles. Le deuxième chapitre élucide les plantes choisies pour cette étude. Dans le dernier chapitre nous avons évoquées les moisissures et les mycotoxines.

Dans la deuxième partie, nous avons envisagé la partie expérimentale ou nous présenterons les techniques utilisées dans ce travail et qui se focalise sur deux axes :

Dans le premier axe, nous avons effectué une analyse chimique dans les étapes sont les suivantes :

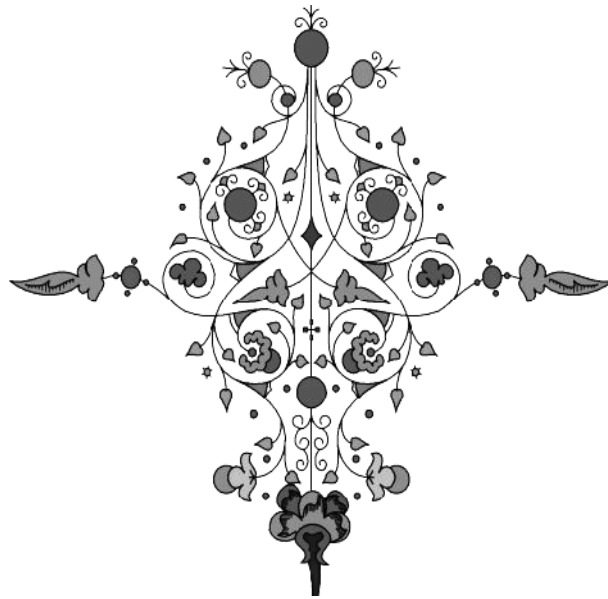
- Extraction des huiles essentielles par hydro-distillation des différentes espèces végétales.
- Détermination des indices physiques et chimiques des huiles essentielles.
- Détermination de la composition chimique des huiles essentielles, par des analyses chromatographiques (CG et CG/SM).

La plupart des études réalisées sur le pouvoir antifongique des huiles essentielles sont fondées sur l'effet sur la croissance, mais rares sont celles qui mettent l'accent sur toutes les étapes de développement des champignons. C'est pourquoi nous nous sommes attachés dans le deuxième axe à chercher de nouvelles activités des huiles essentielles de PAM. Dont, l'objectif est d'étudier l'effet de ces huiles essentielles et leurs fractions volatiles sur la germination, la croissance mycélienne et la sporulation, ainsi, la sensibilité fongique mycotoxicologique.

La troisième partie rapportera les différentes résultats obtenues et leurs discussions et enfin une conclusion générale qui résume l'ensemble de travail.



Partie Bibliographique



I. Les Huiles Essentielles

I.1. L'Aromathérapie

L'aromathérapie est une science naturelle fascinante et complexe dont l'origine remonte à des milliers d'années ; elle s'inspire en effet des traditions médicales populaires des Egyptiens, des Perses, des Chinois, des Hindous et des Grecs, où médecins et guérisseurs découvrirent que les huiles essentielles obtenues à partir de certaines plantes pressées ou distillées calmaient la douleur, décontractaient, favorisaient le sommeil et exaltaient la force vitale. On pensait ainsi que l'essence végétale contenait de façon concentrée le meilleur de la plante (**Fabrocini, 1999**).

L'odeur souvent agréable qui s'exhale de certains organes végétaux: feuilles, fleurs, écorces..., est contemporaine de matières actives tels que les phénols et les terpènes, qui sont de puissants antiseptiques, et bien d'autres substances volatiles odorantes, douées aussi, selon les cas, de propriétés: balsamique, antirhumatisme, circulatoire, tonique, antifongique...etc (**Baba-Aissa, 2000**).

Le terme Aromathérapie désigne, l'emploi thérapeutique exclusif des huiles essentielles en usage interne par absorption ou en usage externe. La naissance de l'aromathérapie moderne était en 1928 par René Maurice Gattefossé qui, en travaillant sur les parfums, et suite à un accident, redécouvrit les vertus de l'huile essentielle de Lavande. Plongeant par réflexe sa main brûlée, lors d'une explosion dans le premier liquide à proximité, il nota une guérison rapide et sans infection, c'était l'huile essentielle de Lavande, il étudia donc les propriétés de ces huiles de façon approfondie. En 1937 il publia son livre intitulé "Aromathérapie", cette appellation est conservée depuis pour désigner l'emploi médicinal des huiles essentielles. La publication de cet ouvrage a marqué le début d'un intérêt croissant de la médecine pour cette forme de thérapeutique, et cet intérêt s'est manifesté encore davantage depuis les années 1944 – 45. Il ne fait que s'amplifier, tant dans les applications déjà connues que dans la recherche de nouvelles possibilités (**Bernadet, 2000**).

I.2. Quelques dates importantes dans l'histoire de l'aromathérapie

- la plus ancienne description des effets antimicrobiens des épices a été faite par Antony van Leeuwenhoek le 9 Octobre 1676; il décrit la baisse du nombre et de l'activité des "*animalcules*" dans un échantillon d'eau de puits, suite à l'addition du poivre.

- 1881 Koch a travaillé sur l'action bactéricide de l'huile essentielle de térébenthine sur les spores de l'anthrax.
- 1887 Chamberland a étudié l'activité des essences de l'origan, la cannelle et le clou de girofle sur *Bacillus anthracis*.
- 1910 Martindale montre que l'huile essentielle de l'origan est l'agent antiseptique le plus puissant dérivé de plante, connu jusqu'à ce jour. L'origan est 25 à 76 fois plus actif que le phénol isolé, sur le colibacille. Il mit au point les coefficients phénol de plusieurs huiles essentielles.
- 1931 René Maurice Gattefossé, ingénieur chimiste passionné par les huiles essentielles, démontre de façon scientifique les relations entre les structures et les activités des composants aromatiques. Il codifie les huiles essentielles selon leurs propriétés: tonifiantes, antiseptiques, bactéricides, fongicides, stimulantes, calmantes...il crée la terminologie *Aromathérapie*, dans son livre qui porte le même titre.
- Vers 1949-1950 Schroeder et Messing, développent une technique qui devient plus tard *l'Aromatogramme*. Une méthode qui permet de tester et examiner l'efficacité des huiles essentielles dans le traitement; ils réalisent le premier aromatogramme.
- 1954-1956 Kellner et Kobert publient une étude sur l'action de 175 huiles essentielles contre 8 bactéries aérobies et champignons. Ils identifient un groupe particulier de 21 huiles, y compris l'origan d'Espagne.
- 1958 Jasper et Coll. démontrent l'action antifongique des huiles essentielles d'origan, de bouleau et de thym.
- 1960 Maruzzella montre les effets antibactériens et antifongiques d'une centaine de composés aromatiques.
- Entre 1960 et 1964 le Pr. Paolo Rovesti, Directeur de l'Instituto Derivati Vegatali à Milan, a été capable de montrer que la dépression et l'anxiété peuvent être guéries par l'inhalation des huiles de certaines plantes.
- 1964 le Dr. Jean Valnet publie: la pratique de l'aromathérapie. Il trouve qu'il est capable de guérir des patients ayant des troubles psychiatriques à long terme, par administration des huiles essentielles, avec presque des résultats immédiats.
- 1969 le Dr. Maurice Girault montre le pouvoir bactéricide de 8 huiles essentielles. Il utilise la technique de l'aromatogramme pour développer des traitements efficaces à huiles essentielles pour la flore spécifique de chaque patient.

- 1972 H. Audhoni, P. Belaiche, J. Bourgeon, P. Duraffourd, C. Duraffourd, M. Girault et J.P.Lapraz, utilisent la technique de l'aromatogramme pour développer des traitements pour plusieurs maladies infectieuses. Alors, 40 essences et une teinture ont été étudiées, et des aromatogrammes sont effectués sur des cas de pathologies infectieuses.
- 1973 Jacques Pellecier établit à nouveau l'action antibactérienne et antifongique des Labiées Méditerranéennes, romarin et thym, et l'efficacité phénoménale de la sarriette (*Satureja montana*).
Wagner et Sprinkmeyer montrent qu'un mélange d'huiles essentielles possède une activité plus étendue que les antibiotiques à large spectre.
- 1974 Deininger fournit des preuves cliniques, en double aveugle sur l'efficacité des huiles essentielles pour les déséquilibres du système nerveux autonome.
- 1977 Robert Tisserand publie le premier livre sur l'aromathérapie en anglais: *The Art of Aromatherapy*.
P. Belaiche crée *l'indice origan* qui classe les huiles essentielles en terme de pouvoir bactéricide.
- 1978 Paul Belaiche publie son étude en trois volumes, sur les usages cliniques de l'aromathérapie pour traiter un large rang de maladies infectieuses et dégénératives.
P. Belaiche, H. Audhoni, M. Girault et G. Sens Olive, définissent l'aromatogramme en phase liquide, ainsi que l'immunoaromatogramme.
- 1979 Kubeczka développe des guides "*instructions générales et conseils*" pour déterminer la qualité des huiles essentielles utilisées pour des intentions médicales.
- 1987 le Dr. Penoel et P. Franchomme, développent des recherches sur les chlamydioses et les infections catharrales mucopurulentes des voies respiratoires et génitales: l'aromathérapie à visée anti-infectieuse.
Deininger et Lembke prouvent l'activité antivirale des huiles essentielles et leurs composés isolés.
- 1990 Pierre Franchomme et Daniel Penoel publient leur livre sur l'aromathérapie médicale: *l'Aromathérapie Exactement*.
- 1995 R. Deininger, un chercheur dans le domaine des huiles essentielles, a écrit: "l'usage principal de l'action antimicrobienne des huiles essentielles, c'est les infections banales dans le contexte de l'automédication: infections du système

respiratoire (en combinaison avec l'action spasmolytique des huiles essentielles), infection de la peau (virus de l'herpès), maladies gastro-intestinales (avec l'action spasmolytique), infections des voies urinaires (avec l'action diurétique). Ses avantages: un large spectre d'activités incluses. Les effets secondaires ne surviennent pas si les produits sont utilisés correctement".

- 1999 Vet C Fabrocini publient leur livre : *Comment se soigner avec l'Aromathérapie et guérir* : agitation anxiété, allergie, asthme, déprime, insomnie, lombalgie, mal de dos, migraines, palpitations, etc.
- Jusqu'à ce jour, les chercheurs à travers le monde étudient encore l'activité antimicrobienne des huiles essentielles in vitro, mais peu de recherches in vivo.

I.3. Les huiles essentielles

I.3.1. Définition

La norme **AFNOR NF T-75-006** définit l'huile essentielle comme : « un produit obtenu à partir d'une matière première végétale, soit par entraînement à la vapeur d'eau, soit par hydrodistillation. L'huile essentielle est alors séparée de la phase aqueuse par des procédés physiques ». L'huile ainsi obtenue possède certaines caractéristiques physico-chimiques qu'il est possible de mesurer au laboratoire à l'aide de techniques simples ou d'appareillages plus complexes.

Les huiles essentielles doivent répondre à des critères physiques imposés par les normes. En effet, elles sont liquides à température ambiante, de consistance huileuse mais non grasse, leur densité est inférieure à celle de l'eau à l'exception de quelques cas (cannelle, sassafras et vétiver), volatiles, insolubles dans l'eau, rarement colorées, et solubles dans les huiles végétales, dans l'éther et dans l'alcool jusqu'à un certain pourcentage. Elles sont peu polaires, et il convient de les conserver à l'abri de l'air et de la lumière (**Farhat, 2010**).

I.3.2. Répartition

Les huiles essentielles sont presque exclusives de l'embranchement des spermaphytes, elles n'existent quasiment que chez les végétaux supérieurs. Les genres qui sont capables d'élaborer ces principes volatils sont répartis sur presque une soixantaine de familles (**Benyahia, 2006**). Parmi les familles végétales les plus productrices d'huiles essentielles, on distingue les Labiateae, les Asteraceae, les Myrtaceae, les Lauraceae et les Apiaceae.

Les huiles essentielles peuvent être localisées dans tous les organes végétaux : fleurs (*Ferulago angulata*), feuilles (*Torilis arvensis*) et bien que cela semble peu commun, dans : les racines (*Heracleum persicum*), les rhizomes (*Zingiber officinale*), le bois (*Santalum album*), les écorces (*Cinnamomum verum*), les fruits (*Daucus carota*) ou les graines (*Daucus carota*) (**Djarri, 2011**).

Si tous les organes d'une même espèce renferment une huile essentielle, la composition de cette dernière peut varier selon sa localisation (**Bruneton, 2009**).

Dans la plus part des cas, les huiles essentielles se forment dans le cytosol des cellules, où elles se rassemblent en gouttelettes comme la plupart des substances lipophiles ou bien elles s'accumulent dans les vacuoles des cellules épidermiques ou des cellules du mésophile de nombreux pétales. Selon les périodes, ces essences traversent la paroi cellulaire vers l'extérieur de la cuticule sous forme de vapeurs.

I.3.3. Origine dans les végétaux

Considérées comme des produits du métabolisme secondaire des plantes (**Hatanaka et al, 1987**), les huiles essentielles d'après **Svoboda (2000)** sont produites et stockées dans des structures cellulaires spécialisées, ces structures sont divisées en deux groupes :

- Celles qui produisent l'huile essentielle sur la surface de la plante et qui sécrètent habituellement des substances directement à l'extérieur de la plante (sécrétion exogène).
- Celles qui produisent les huiles essentielles dans le corps de la plante et sécrètent ces substances dans les espaces intercellulaires spécialisés (sécrétion endogène).

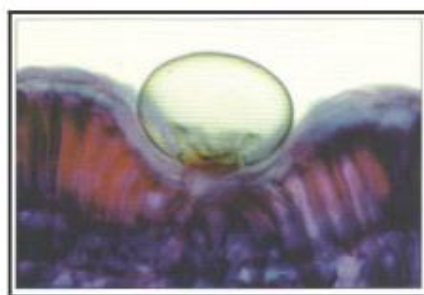


Fig. 01. Glandule sécrétrice sur la surface supérieure de la feuille d'*Origanum heracleoticum*, montrant l'espace subcuticulaire rempli d'huile essentielle (**Svoboda et al, 2003**).

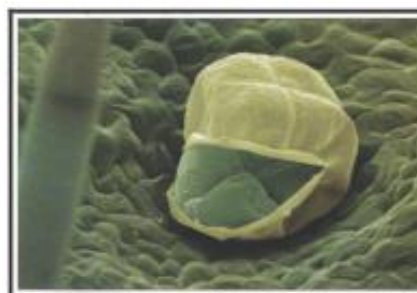
II.3.3.1 Les systèmes sécréteurs

Les examens réalisés à différents stades de croissance des plantes aromatiques par microscopie à balayage électronique ont permis, ces dernières années, une considérable avancée des connaissances concernant l'appareil sécréteur de ces dernières.

Les calices des fleurs présentent une succession régulière de côtes et de sillons abritant les structures productrices des essences (ou glandes sécrétrices). Ces glandes épidermiques, de forme sphérique, ont un diamètre inférieur au dixième du millimètre, leur activité se traduit par la synthèse de tous les constituants des huiles essentielles, puis, ultérieurement, par leur stockage durable.



Glande sécrétrice de l'épiderme d'une feuille avec cuticule intacte



Rupture de la cuticule montrant les cellules sécrétrices

Fig. 02. Glandes sécrétrices (Svoboda *et al*, 2003).

Les glandes sécrétrices sont réparties sur l'ensemble de la plante, rares sur les faces supérieures des feuilles et des tiges, elles sont un peu plus nombreuses sur le dessous des feuilles, mais elles abondent surtout sur le calice des fleurs.

La tête pluricellulaire de la glande sécrétrice est recouverte d'une peau appelée "cuticule". Au fur et à mesure que les cellules sécrétrices vont produire l'huile essentielle, celle-ci va être accumulée sous la cuticule qui se soulève petit à petit jusqu'à permettre un volume de stockage supérieur au double de celui des cellules sécrétrices elles-mêmes. Ces réservoirs de stockage représentent les glandes réceptrices, qui sont formées en général de 8 cellules, groupées pour former une "tête" portée par un large pied unicellulaire qui les fixe à l'épiderme du calice.

La formation des huiles essentielles dans les végétaux est le fait d'une multitude de réactions biochimiques dont certaines ne sont pas encore élucidées. Elles prennent naissance dans des appareils sécréteurs qui ont une forme variée. Il s'agit par exemple :

- Trichomes Glandulaires (Lamiaceae)

- Cavités sécrétrices (Myrtaceae et Rutaceae)
- Canaux sécréteurs (Apiaceae et Asteraceae)

I.3.4. Les procédés d'extraction

I.3.4.1. La distillation

Les huiles essentielles et les arômes extraits à partir des herbes aromatiques et d'épices sont le résultat d'un mélange complexe de substances volatiles. Ils sont généralement présents à de très faibles concentrations dans les plantes à parfum. Avant de pouvoir utiliser ou analyser de telles substances, il est nécessaire de les extraire de leur matrice (**Farhat, 2010**). La technique d'extraction des huiles essentielles utilisant l'entraînement des substances aromatiques grâce à la vapeur d'eau est de loin la plus utilisée à l'heure actuelle. La méthode est basée sur l'existence d'un azéotrope de température d'ébullition inférieure aux points d'ébullition des deux composés, l'huile essentielle et l'eau, pris séparément. Ainsi, les composés volatils et l'eau distillent simultanément à une température inférieure à 100 °C sous pression atmosphérique normale. En conséquence, les produits aromatiques sont entraînés par sa vapeur d'eau sans subir d'altérations majeures (**Franchomme et al, 1990**). Il existe précisément trois différents procédés utilisant ce principe: l'hydrodistillation, l'hydrodiffusion et l'entraînement à la vapeur d'eau. Beaucoup de confusions règnent autour de l'utilisation de ces trois termes. Quelques éclaircissements s'imposent donc.

Tout d'abord, l'hydrodistillation (water distillation). Il s'agit de la méthode la plus simple et de ce fait la plus anciennement utilisée. Le matériel végétal est immergé directement dans un alambic rempli d'eau placé sur une source de chaleur. Le tout est ensuite porté à l'ébullition. Les vapeurs hétérogènes sont condensées dans un réfrigérant et l'huile essentielle se sépare de l'hydrolat par simple différence de densité. L'huile essentielle étant plus légère que l'eau (sauf quelques rares exceptions), elle surnage au-dessus de l'hydrolat.

Ensuite, la distillation par entraînement à la vapeur d'eau (steam distillation). Dans ce type de distillation, le matériel végétal ne macère pas directement dans l'eau. Il est placé sur une grille perforée au travers de laquelle passe la vapeur d'eau (Figure 03).

La vapeur endommage la structure des cellules végétales et libère ainsi les molécules volatiles qui sont ensuite entraînées vers le réfrigérant. Cette méthode apporte une amélioration de la qualité de l'huile essentielle en minimisant les altérations

hydrolytiques: le matériel végétal ne baignant pas directement dans l'eau bouillante (Franchomme *et al*, 1990).

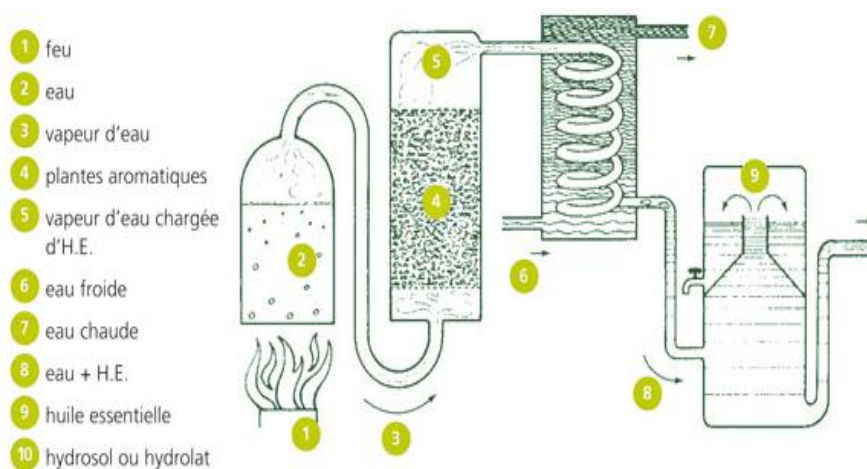


Fig. 03. Système d'extraction des huiles essentielles par entraînement à la vapeur

Enfin, la troisième technique est l'hydrodiffusion. Cette technique relativement récente est particulière. Elle consiste à faire passer, du haut vers le bas (per descendum) et à pression réduite, la vapeur d'eau au travers de la matrice végétale. L'avantage de cette méthode est d'être plus rapide donc moins dommageable pour les composés volatils. Cependant, l'huile essentielle obtenue avec ce procédé contient des composés non volatils ce qui lui vaut une appellation spéciale: « essence de percolation » (Franchomme *et al*, 1990 ; Richard, 1992).

I.3.4.2. Expression à froid

L'expression à froid est une extraction sans chauffage réservée aux agrumes. Le principe de ce procédé mécanique est fondé sur la rupture des péricarpes riches en huiles essentielles. L'huile essentielle ainsi libérée est entraînée par un courant d'eau. Une émulsion constituée d'eau et d'essence se forme. L'essence est alors isolée par décantation.

L'utilisation de grandes quantités d'eau dans cette technique peut altérer les qualités des huiles essentielles, par hydrolyse, par dissolution des composés oxygénés et par transport de micro-organismes. C'est pour cette raison que les constructeurs cherchent à s'affranchir de l'utilisation de l'eau lors d'une telle extraction. Ainsi, pour éviter ces altérations, de nouveaux procédés physiques usuels sont apparus. Ils sont basés sur l'ouverture des sacs oléifères par éclatement sous l'effet d'une dépression, ou l'utilisation du principe de l'abrasion de l'écorce fraîche (Farhat, 2010).

I.3.4.3. Extractions par les solvants et par les graisses

Il s'agit d'extraits de plantes obtenus au moyen de solvants non aqueux. Ces derniers peuvent être des solvants usuels utilisés en chimie organique (hexane, éther de pétrole) mais aussi des graisses, des huiles (absorption des composés volatils lipophiles par des corps gras) ou même encore des gaz. Ces solvants ont un pouvoir d'extraction plus élevé que l'eau si bien que les extraits ne contiennent pas uniquement des composés volatils mais également bon nombre de composés non volatils tels que des cires, des pigments, des acides gras et bien d'autres (**Richard, 1992 ; Robert, 2000**). Les plantes sont immergées totalement dans le solvant à froid sauf pour les grains et les racines où l'extraction est réalisée à chaud. Le temps de contact est environ 30 minutes, après quoi le solvant initial est soutiré et remplacé par une deuxième charge puis une troisième à leurs tours soutirées. La plus grande partie du solvant est évaporée et recyclée. On recueille une solution concentrée distillée sous vide. Il reste une pâte, liquide, à chaud appelée concrète (**Edwards, 2009**). L'extraction à l'aide de solvants organiques pose un problème de toxicité des solvants résiduels ce qui n'est pas négligeable lorsque l'extrait est destiné aux industries pharmaceutique et agro-alimentaire (**Bruneton, 2009**).

I.3.4.4. Extraction par micro-ondes

Au début des années 1990 est apparue une toute nouvelle technique appelée hydrodistillation par micro-ondes sous vide (Figure 04). Dans ce procédé, la matrice végétale est chauffée par micro-ondes dans une enceinte close dans laquelle la pression est réduite de manière séquentielle. Les composés volatils sont entraînés par la vapeur d'eau formée à partir de l'eau propre à la plante. Ils sont ensuite récupérés à l'aide des procédés classiques de condensation, refroidissement et décantation. Ce procédé permet un gain de temps (temps d'extraction divisé par 5 à 10) et d'énergie (température plus basse) considérable. En guise d'exemple, l'extraction par micro-ondes de deux kilos de *Mentha piperita* permet d'obtenir environ 1% d'huile essentielle en 15 minutes alors que deux heures d'hydrodistillation sont nécessaires pour obtenir un rendement similaire à partir de la même masse de plante (**Mengel et al, 1993**). La composition de l'huile essentielle obtenue par ce procédé est bien souvent semblable à celle obtenue avec un procédé d'entraînement à la vapeur traditionnel. Toutefois, une plus grande proportion de composés oxygénés est généralement observée dans les huiles essentielles extraites par micro-ondes. Ceci est dû à la faible quantité d'eau présente dans le système et à la rapidité du processus de chauffage. Ainsi, les dégradations thermiques et hydrolytiques des composés

oxygénés sont limitées (**Bendahou et al, 2008 ; Lucchesi et al, 2007**). Cette technique présente donc beaucoup d'avantages: technologie verte, économie d'énergie et de temps, investissement initial réduit et dégradations thermiques et hydrolytiques minimisées (**Mengel et al, 1993 ; Lucchesi et al, 2004**).

L'extraction par micro-ondes fait aujourd'hui l'objet de beaucoup d'études et ne cesse d'être améliorée (**Chemat et al, 2006 ; Flamini et al., 2007; Lucchesi et al, 2007**).

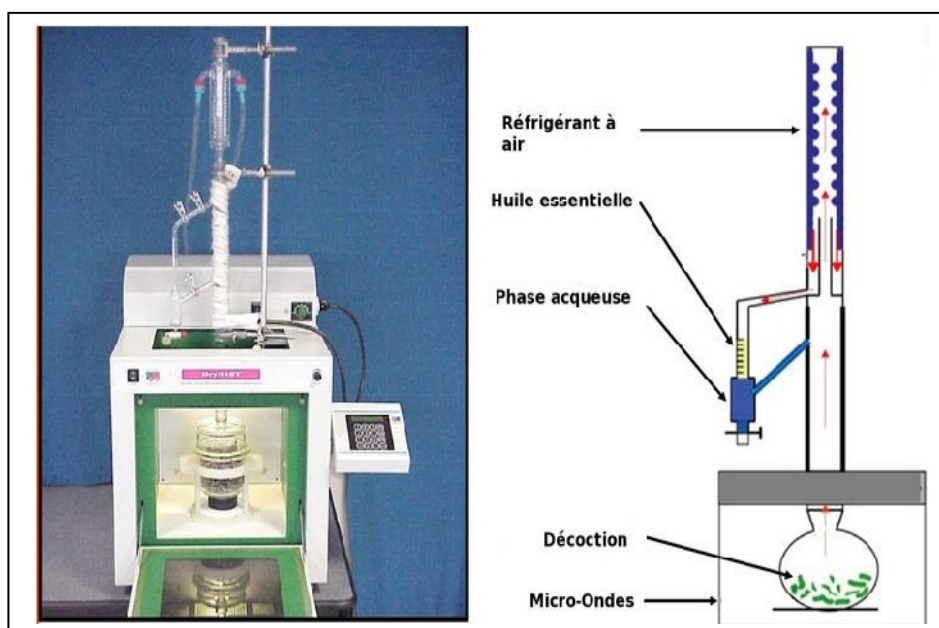


Fig. 04. Système d'extraction des huiles essentielles par micro-ondes (**Farhat, 2010**).

I.3.4.5. Extraction au CO₂ supercritique

L'originalité de cette technique d'extraction réside dans le type de solvant employé: le CO₂ supercritique. Au-delà du point critique ($P = 73,8$ bars et $T = 31,1$ °C), le CO₂ possède des propriétés intermédiaires entre celles des liquides et celles des gaz ce qui lui confère un bon pouvoir d'extraction, qui plus est, facilement modulable en jouant sur les conditions de température et de pression. Cette technique présente énormément d'avantages. Tout d'abord, le CO₂ supercritique est un solvant idéal puisqu'il est naturel, inerte chimiquement, ininflammable, non toxique, sélectif, aisément disponible et peu coûteux. De plus, il s'élimine facilement de l'extrait sans laisser de résidus. Outre ces avantages, le principal point fort est la qualité irréprochable de l'extrait puisqu'aucun réarrangement ne s'opère lors du processus. Son unique point faible est le coût très élevé de son installation (**Pellerin, 1991**). En jouant sur les conditions de température et de pression, il est possible de rendre l'extraction plus sélective aux composés odorants et ainsi

obtenir des extraits de composition tout à fait semblable aux huiles essentielles, non chargés en molécules non volatils. Ainsi, la température et la pression à ne pas dépasser pour extraire uniquement les principes volatils est 60 °C et 60 bars (**Richard, 1992**). Cette technique est aujourd'hui considérée comme la plus prometteuse car elle fournit des extraits volatils de très haute qualité et qui respecterait intégralement l'essence originelle de la plante (**Wenqiang et al, 2007**).

I.3.5. Composition chimique

Les huiles essentielles sont des mélanges complexes de constituants hétérogènes pouvant contenir plus de 300 composés différents (**Sell, 2006**). Ils appartiennent de façon exclusive à deux groupes caractérisés par des origines biogénétiques distinctes, le groupe des terpénoïdes d'une part et le groupe des aromatiques et des aliphatiques (alcane, alcène, alcénol, phénol etc...) de l'autre.

Dans chaque groupe de terpènes, un précurseur unique conduit aux différents constituants connus, par une succession de réactions classiques (**Kurt et Torrsell, 1998**). Les plus connus de ces produits sont les monoterpènes qui répondent à la formule brute $C_{10}H_{16}$, les sesquiterpènes ($C_{15}H_{24}$), les diterpènes ($C_{20}H_{32}$), les triterpènes (C_{30}) et les tétraterpènes (C_{40}).

Les terpènes le plus rencontrés dans les huiles essentielles sont les terpènes les plus volatils c'est à dire ceux dont la masse moléculaire n'est pas trop élevée telles que les mono et les sesquiterpènes, ils se retrouvent presque toujours dans les huiles essentielles sous forme acyclique, monocyclique ou bicyclique avec l'existence de nombreuses molécules fonctionnalisées (alcools, aldéhydes, cétones, esters, éthers, peroxydes) (**Kurt et Torrsell, 1998 ; Farhat, 2010**).

Les composés phénoliques dérivés du phénylpropane (C_6-C_3) sont beaucoup moins fréquents que les terpènes. Souvent, ils sont des allyl, des propénylphénols et parfois des aldéhydes.

Selon le mode d'extraction, les huiles essentielles peuvent renfermer d'autres composés chimiques, le plus souvent de faible masse moléculaire tel que : les carbures (linières et ramifiés, saturés ou non saturés), les acides (de C_3 à C_6), les alcools, les aldéhydes, les cétones, les esters acycliques, les lactones et les coumarines (**Farhat, 2010**).

Le tableau 01 présente les composés les plus communs que l'on trouve dans les huiles essentielles et qui sont classés selon leurs poids moléculaires, leurs températures d'ébullition et leurs solubilités dans l'eau (**Loupy, 2006**).

Tableau 01. Différents types de molécules dans l'huile essentielle (Loupy, 2006).

	Formule moléculaire	Température d'ébullition	Solubilité dans L'eau (g.L⁻¹)
<i>Monoterpènes</i>			
Limonène	C ₁₀ H ₁₆	175.4	< 10 ⁻³
Pinène	C ₁₀ H ₁₆	157.9	< 10 ⁻³
Sabinene	C ₁₀ H ₁₆	164	< 10 ⁻³
Myrcène	C ₁₀ H ₁₆	167	< 10 ⁻³
γ-Terpinène	C ₁₀ H ₁₆	183	< 10 ⁻³
para-Cymène	C ₁₀ H ₁₆	173.9	< 10 ⁻³
<i>Sesquiterpènes</i>			
β-Caryophyllene	C ₁₅ H ₂₄	268.4	< 10 ⁻³
α-Santalene	C ₁₅ H ₂₄	247.46	< 10 ⁻³
α-Zingiberene	C ₁₅ H ₂₄	270.7	< 10 ⁻³
β-Curcumene	C ₁₅ H ₂₄	266	< 10 ⁻³
<i>Diterpène</i>			
Phytol	C ₂₀ H ₄₀ O	335.5	< 10 ⁻³
<i>Alcools</i>			
Géraniol	C ₁₀ H ₁₇ OH	229.5	0.67
Linalool	C ₁₀ H ₁₇ OH	198.5	0.67
<i>Aldéhydes</i>			
Citral	C ₁₀ H ₁₆ O	210.9	2.61
Cuminic aldéhyde	C ₁₀ H ₁₂ O	254.6	0.26
<i>Ketones</i>			
Camphor	C ₁₀ H ₁₆ O	207.4	0.92
Carvone	C ₁₀ H ₁₄ O	230.5	1.60
<i>Phénols</i>			
Thymol	C ₁₀ H ₁₄ O	233	0.85
Eugénol	C ₁₀ H ₁₂ O ₂	255	2.52
<i>Acétates</i>			
Neryl acétate	C ₁₂ H ₂₀ O ₂	274.5	0.71
Linalyl acétate	C ₁₂ H ₂₀ O ₂	220	0.57
<i>Oxydes</i>			
1,8-Cineol	C ₁₀ H ₁₈ O	174.8	5.8 x 10 ⁻³
Linalool	C ₁₀ H ₁₈ O	198.5	0.67

I.3.6. Les facteurs influençant la composition

La composition chimique, la qualité et la quantité extraite d'une huile essentielle dépendent de plusieurs paramètres. Les principaux facteurs de variabilité de cette composition sont d'origine intrinsèque et extrinsèque : le génotype, l'environnement, l'origine

géographique, la période de récolte, la température et la durée de séchage ainsi que le mode d'extraction (**Oussala et al, 2006**).

Le premier paramètre influençant la composition chimique d'une plante est sa biosynthèse et donc son profil génétique. C'est la raison pour laquelle, une même espèce peut présenter plusieurs chémotypes de profils chimiques différents. Il existe de nombreux exemples d'un tel phénomène, notamment chez le thym, la sauge...etc (**Thompson et al, 2003 ; Fellah et al, 2006**).

Un chémotype est une race chimique. En fait, une même espèce végétale peut fournir des huiles essentielles de compositions chimiques différentes. Ces différences sont dues à la période de récolte des plantes, au mode d'extraction utilisé, aux facteurs environnementaux (altitude, ensoleillement, nature du sol,...etc).

Les conditions environnementales influencent aussi la composition. La température, le taux d'humidité, la durée d'ensoleillement, la pluviométrie et les conditions édaphiques (composition du sol) représentent autant de causes potentielles de variations de la composition chimique d'une plante aromatique donnée (**Sokmen et al, 2004 ; Lozeine et Venskutonis, 2005 ; Fellah et al, 2006**).

Pour la même espèce, le même génotype et le même stade de développement, les facteurs extrinsèques peuvent engendrer des modifications quantitatives et qualitatives importantes pour les huiles essentielles. Ceci a été confirmé par un certain nombre de travaux (**Dunford et Vazquez, 2005 ; Bakkali et al, 2008**). Ils ont remarqué que les facteurs extrinsèques les plus importants qui influencent la production des huiles essentielles sont le climat (température et lumière) et le sol (eau et fertilisants) (**Bruneton, 1999**).

Les études portant sur la variation de la composition chimique des huiles en fonction du cycle circadien et des saisons sont nombreuses (**Anton et Lobstein, 2005**). L'heure de la récolte du matériel végétal ainsi que le moment dans l'année sont en effet des facteurs importants (**Lahlou, 2004**). Selon **Naghdi et al. (2014)** la formation des principes actifs se fait spécialement pendant la période de pleine croissance et durant les temps de métabolismes intensifs comme les périodes de floraison et de fructification.

Outre la composition, ces facteurs peuvent également avoir un impact sur la teneur en huile essentielle. Les Citrus par exemple ont une teneur plus importante en huile essentielle lorsque la température est élevée (**Bruneton, 1999**).

I.3.7. Activités biologiques et pharmacologiques

Les huiles essentielles possèdent de nombreuses activités biologiques selon leurs constituants majoritaires. Beaucoup d'entre elles sont utilisées pour assaisonner et aromatiser les aliments (**Loza-Tavera, 1999**). Elles ont aussi une grande importance économique comme saveurs, parfums et solvants, il est fabriqué aussi des désodorisants, de l'encens et des produits pour le bain (**Bremness, 1998**). L'emploi des huiles essentielles est en particulier dans le domaine des antiseptiques externes, mais peuvent être destinées à l'aromatisation des médicaments administrés par voie orale. De même qu'elles sont utilisées dans l'industrie agro-alimentaire comme conservateurs, et dans l'industrie chimique (**Smith-Palmer et al, 1998 ; Bruneton, 1999**).

Cependant plusieurs activités sont attribuées aux huiles essentielles : cholérétique, cicatrisante, neurosédative, spasmolytique, digestive, stomachique, anti-inflammatoire (**Bruneton, 1999**), désinfectante du système respiratoire (**Inouye^a et al, 2001 ; Inouye^b et al, 2001**) antioxydante (**Dorman et al, 2000**), acidifiante, tonicardiaque, oxydante des déchets du métabolisme, fluidifiante du sang, antivenimeuse, antispasmodique, pour la conservation tissulaire (embaumement vivant), pouvoir de protéolyse rapide, sédation épidermique locale, revitalisation par oxygénation et défloculation du sang. Ce sont les terpènes, parmi les constituants chimiques, qui sont responsables de ces vertus et par conséquent, usages médicaux des plantes aromatiques et médicinales (**Dorman et al, 2000**). La propriété la plus importante des huiles essentielles est l'osmose facile au travers des tissus et leur élimination complète et rapide (**Bernadet, 2000**).

I.3.7.1. Action anti-bactérienne

C'est probablement la propriété la plus reconnue pour la plupart des huiles essentielles du point de vue thérapeutique. Observées et étudiées depuis plusieurs dizaines d'années, par de nombreux chercheurs, un grand nombre d'huiles essentielles ont déjà été testées sur un large éventail de bactéries différentes (Gram+ aussi bien que Gram- (**Inouye^a et al, 2001**).

Les mécanismes d'action antibactérienne des huiles essentielles sont relativement bien connus. Une des possibilités d'action est la génération de lésions irréversibles sur la membrane des cellules bactériennes qui induisent des pertes de matière (cytoplasmique), pertes de sel, perte de substrats énergétiques (glucose, ATP), amenant directement à la lyse de la bactérie (cytolyse) et donc à sa mort (**Mbata et Saikia ; 2005**).

Une autre possibilité d'action est l'inhibition de la production par les bactéries des toxines responsables du déclenchement des processus infectieux.

I.3.7.2. Action anti-fongique

Les huiles essentielles ont un grand pouvoir antifongique aérien et cutané. Les modes d'actions antifongiques sont assez semblables à ceux décrits pour les bactéries. Cependant, il faut y ajouter 2 phénomènes supplémentaires inhibant l'action des levures: l'établissement d'un gradient de pH et le blocage de la production d'énergie des levures ("phénomène de respiration") **Dongmo et al. ; 2002**).

La plupart des composés terpéniques sont de très bons agents antifongiques. Le thymol, le carvacrol, et l'eugénol sont ici les composés les plus actifs. Un grand nombre de composés volatils ont été testés contre une large gamme de champignons: *Candida* (*C. albicans*), *Aspergillus* (*A. niger*, *A. flavus*, *A. fumigatus*), *Penicillium chrysogenum* et bien d'autres **(Kalemba et Kunicka, 2003)**.

La mise en évidence de leurs activités biologiques a fait l'objet de nombreuses études **(Bakkali et al, 2008)**. **Pattnaik et al. (1997)** ont testés cinq constituants aromatiques des huiles essentielles (le cinéole, le citral, le géraniol, le linalol et le menthol) pour leur activité antimicrobienne sur dix-huit bactéries (y compris les cocci à Gram positif et les bacilles Gram négatif) et douze champignons (trois de type levure et neuf filamenteuses).

En termes d'activité antibactérienne le linalol a été le plus efficace et a réussi à inhiber dix-sept bactéries, suivie par le cinéole et le géraniol (avec seize bactéries chacun).

Le menthol et le citral ont inhibé quinze et quatorze bactéries, respectivement. Contre les champignons, le citral et le géraniol étaient les plus efficaces (inhibition de l'ensemble des douze champignons), suivie par le linalol (inhibition de dix champignons), le cinéole et le menthol arrivent en dernier avec l'inhibition de sept champignons chacun.

I.3.8. Méthodes d'analyses de la composition chimique des huiles essentielles

I.3.8.1. Méthodes d'analyses physiques et chimiques

Ces méthodes permettent d'obtenir les caractéristiques physiques et chimiques propres à chaque huile essentielle, et peuvent servir de critères de qualités entre producteurs et acheteurs. La densité, l'indice de réfraction, le pouvoir rotatoire, le point de congélation, les indices, d'ester et de carbonyle, la solubilité dans l'éthanol,.....etc., constituent un moyen de vérification et de contrôle de la qualité de l'huile essentielle. Ces essais sont déterminés selon

un protocole précis et obéissent à des normes édictées par l'Organisation de Normalisation (I.S.O) (Fellah *et al.*, 2006).

I.3.8.2. Identification des constituants d'une huile essentielle

L'analyse des huiles essentielles est une opération délicate qui nécessite la mise en œuvre de plusieurs techniques (Cavalli, 2002). La première approche, qui est la plus couramment employée, est l'utilisation du couplage d'une technique chromatographique, généralement la Chromatographie en Phase Gazeuse (CPG) permettant l'individualisation des constituants, avec une technique spectroscopique, la Spectrométrie de Masse (SM) ou plus rarement spectrométrie Infra-Rouge par Transformée de Fourier (IRTF), permettant l'identification des constituants par comparaison des données spectrales avec celles de produits de référence contenus dans des bibliothèque de spectres. Les données spectrales sont systématiquement associées à l'utilisation des indices de rétention, qui sont calculés à partir des temps de rétention d'une gamme étalon d'alcane. Pour faciliter l'identification des composés minoritaires les huiles essentielles peuvent être soumises à un fractionnement par chromatographie sur colonne ouverte (Lahlou, 2004 ; Lozeine et Venskutonis, 2005 ; Bouchra *et al.*, 2003 ; Rasooli et Abyanch, 2004). La combinaison de ces deux techniques complémentaires, est applicable à l'analyse d'un grand nombre de substances organiques, aussi bien gazeuses que liquides.

Ainsi le couplage CPG/SM en mode impact électronique (SM-IE) est la technique la plus utilisée dans le domaine des huiles essentielles. Il permet de connaître, dans la grande majorité des cas, la masse moléculaire d'un composé et d'obtenir des informations structurales relatives à une molécule à partir de sa fragmentation (Dimitrijevic *et al.*, 2007 ; Gachkar *et al.*, 2007). Dans la source d'ionisation les molécules sont bombardées à l'aide d'électrons, conduisant ainsi à la formation des ions en phase gazeuse. Les ions sont ensuite dirigés vers la partie analytique de l'appareil. Il existe plusieurs analyseurs de masse mais les plus utilisés pour l'analyse des huiles essentielles sont le « quadripôle » et le « piège à ion » ou « ion trap ».

Le quadripôle ainsi que l'« ion trap » utilise la stabilité des trajectoires pour séparer les ions selon le rapport masse sur charge (m/z) (Mclafferty et Turecek, 1993 ; DE Hoffmann *et al.*, 1999).

Le faisceau d'ions ayant traversé l'analyseur de masse, est ensuite détecté et transformé en un signal utilisable. Pour ce faire, il existe différents types de détecteurs capables de transformer un courant ionique faible en un signal mesurable. Toutefois,

les détecteurs les plus courants sont les multiplicateurs d'électrons ou de photons, permettant l'augmentation de l'intensité du signal détecté.

Finalement, l'ordinateur enregistre les données provenant du spectromètre de masse et les convertit en valeurs des masses et des intensités des pics et en courant ionique total. Il permet l'examen des données enregistrées et leur manipulation : spectres de masse, chromatogrammes reconstitués, soustraction d'un spectre par rapport à un autre, calcul d'une moyenne sur plusieurs spectres, etc.

Les spectres de masse ainsi obtenus sont ensuite comparés avec ceux des produits de référence contenus dans des bibliothèques informatisées (NIST, Mass Spectral Library, Wiley et Registry of Mass Spectral Data, contenant plusieurs milliers de spectres), ou non informatisées (Cavalli, 2002).

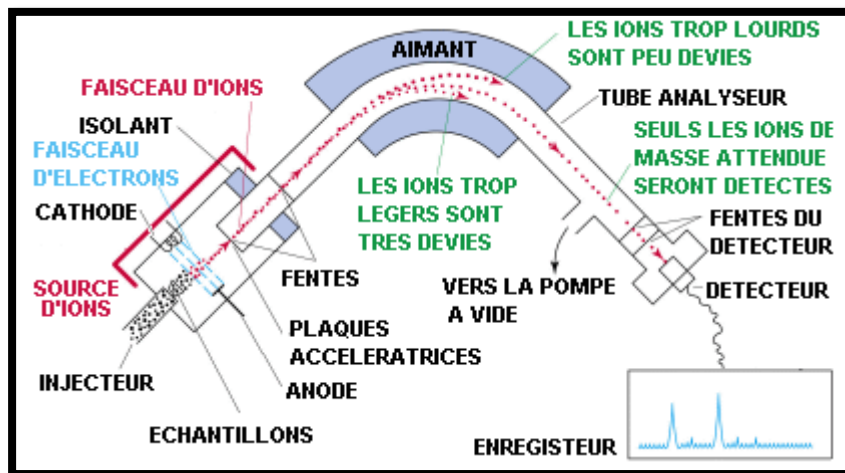


Fig. 05. Schéma de fonctionnement d'un spectromètre de masse.

II. Généralités sur les plantes étudiées

II.1. *Saccocalyx satureioides* Coss. et Dur.

II.1.1. Description botanique

Arbuste odorant à tiges robustes, rameuses, présent dans le Sahara septentrional, mesure de 2 à 12 dm ; feuilles petites, oblongues ou étroites, en petits fascicules et ciliées à la base; fleurs par quatre à six à l'aisselle des feuilles, à calice régulier et velu ; corolle blanche, rosée ou pourpre à quatre lobes, les supérieures bifides ; plante a odeur de thym. Il pousse naturellement période de mars dans les dunes de région présaharienne : dunes à Bou-Saada et Ain sefra dans la région de Naâma en Algérie. Il est endémique algérien (**Ozenda, 1991 ; Belmekki et Bendimerad, 2012**).

- **Nom français** : Sariette indigène.
- **Nom vernaculaire** : Azir el ébel, Zâatar Armel, Zâatar essahra.



Photo 01. *Saccocalyx satureioides* Coss. et Dur.

II.1.2. Systématique

Tableau 02. Classification botanique de *Saccocalyx satureioides* Coss. et Dur. dans la systématique (Ozenda, 2004 ; Spichiger *et al*, 2004 ; Botineau, 2010 ; Dupont et Guignard, 2012)

Classification	<i>Saccocalyx satureioides</i> Coss. et Dur.
Règne	Plantae
Sous-règne	Tracheobionta
Division	Magnoliophyta
Classe	Magnoliopsida
Sous-classe	Asteridae
Ordre	Lamiales
Famille	Lamiaceae
Genre	<i>Saccocalyx</i> Coss. et Dur.
Espèce	<i>Saccocalyx satureioides</i> Coss & Durand

II.1.3. Propriétés thérapeutiques

Il est utilisé comme condiment, il est également stomachique, digestif, antidiarhétiq ue et vermifuge (Fourment et Roques, 1941). Dans la région de Djelfa, par voie orale le décocté des jeunes rameaux est préconisé contre le rhume.

Belmekki et Bendimerad (2012) rapportent que, en médecine traditionnelle, cette plante est utilisée dans le soin du diabète et peut être exploitée dans plusieurs applications pharmaceutiques, car, elle représente une source des polyphénols, des flavonoïdes, ainsi l'extrait méthanolique de cette plante possède un bon effet antioxydant. De même, l'activité antioxydante d'huile essentielle de *Saccocalyx satureioides* Coss. et Dur. a été examinée par Gourine *et al.* (2012) et les résultats ont montré que cette essence possède une excellente activité antioxydante.

En outre, la qualité de l'essence de *Saccocalyx satureioides* Coss. et Dur. est son remarquable puissant pouvoir antimicrobien. Les études de Laouer *et al.* (2004) ; Bendahou *et al.* (2008) ont prouvé son activité bactéricide à l'encontre de nombreux germes pathogènes : *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Bacillus*

subtilis, *Listeria monocytogenes*, *Enterococcus faecalis*, *Proteus mirabilis* et *Salmonella typhimurium*. D'autres chercheurs avancent que cette huile essentielle possède une activité antifongique vis-à-vis *Ascochyta rabiei* et la production de solanapyrone A (Zerroug *et al.*, 2011) et contre *Candida albicans* (Bendahou *et al.*, 2008).

II.1.4. Composition chimique

L'analyse chimique de l'huile essentielle de *Saccocalyx satureioides* Coss. et Dur. a fait l'objet de quelques travaux. Le premier travail a été réalisé par Laouer *et al.* (2004) et qui ont rapporté que l'essence du nord-est algérien est caractérisée par sa richesse en borneol (56%), suivi du thymol (11.5%), α -terpineol (7.9%) et p-cymène (2.6%).

En effet l'huile essentielle du nord central de l'Algérie analysée par Biondi *et al.* (2006) indique que les monoterpènes oxygénés sont les principaux constituants : α -terpineol (32.7%), thymol (22.8%), borneol (11.6%) et carvacrol (6.9%). D'autres composés sont aussi identifiés à des teneurs moins importantes : p-cymène (5.0%), camphène (2.9%), γ -terpinène (2.8%), α -pinène (1.8%) et limonène (1.5%). Cette composition chimique est relativement analogue à celle d'El Masrane, région de Djelfa (Centre de l'Algérie), se constitue majoritairement par le α -terpineol (35.9%), thymol (15.6%) et borneol (12.4%), suivi du p-cymène (7.2%), camphène (4.3%) avec la présence de γ -terpinène (4.0%) (Zerroug *et al.*, 2011).

D'autre part, l'huile essentielle de sud-ouest de l'Algérie analysée par Bendimerad *et al.* (2009) est dominée par le borneol (24.7%), thymol (21%), α -terpineol (19.1%) et camphène (6.3%). La composition chimique de la même essence originaire du l'ouest de l'Algérie, analysée par Bendahou *et al.* (2008), extraite par hydro-distillation (HD) et extraction assistée par micro-ondes (MAE) est dominée par le borneol (28%), suivi du thymol (18%), α -terpineol (17%) et camphène (6% à 8%). Réciproquement, le thymol (25.0%) suivi par le borneol (21.6%), α -terpineol (11.7%) et ethyl o-méthylbenzoate (2.6%) étaient les principaux constituants des composés volatils extraits par hexane MAE.

Enfin, l'huile essentielle étudiée par Gourine *et al.* (2012) révèle comme principaux constituants : le carvacrol (51.82%), γ -terpinène (18.96%) et o-cymène (11.3%).

II.2. *Artemisia campestris* L.

Le genre *Artemisia* appartient à la famille des Astéracées: c'est l'un des genres le plus répandu et le plus étudié de cette famille; il contient un nombre variable d'espèces allant jusqu'à 400 espèces.

Il a été rapporté que le genre *Artemisia* est riche en métabolites secondaires tels que les flavonoïdes, les acides cafféoylquinic, les coumarines, les huiles essentielles, les stérols et les acétylènes (**Kundan et Anupam, 2010**).

Les espèces qui appartiennent au genre *Artemisia* possèdent des propriétés thérapeutiques, elles sont non seulement utilisées dans la médecine traditionnelle, mais aussi dans l'industrie alimentaire et pharmaceutique (**Mirjalili et al, 2007**).

II.2.1. Description botanique

Artemisia campestris L. est un arbuste aromatique à tiges robustes, d'une hauteur de 30 à 80 cm. Cette plante possède des capitules très petits, étroits (1 à 1,5 mm) ovoïdes ou coniques, à involucre scarieux, ne contient que 3 à 8 fleurs de couleur jaunâtre bordées de rouge, et à pédoncule muni de poils blanchâtres à brunâtre. Les feuilles d'*Artemisia campestris* L. sont glabres de couleur verte foncée, les inférieures dipinnatiséquées, les supérieures pinnatiséquées, les basales pétiolées et auriculées, les tiges sont ligneuses à la base striée (**David et Hervé, 1994 ; Ozenda, 1983**).

Plante des hauts-plateaux, d'origine méditerranéenne, plus rare dans la région présaharienne, manque au Sahara septentrional ; reparait dans les montagnes de Sahara central, en altitude (assez répandue au Hoggar, plus rare au Tefedest et au Tassili des Ajjer) (**Ozenda, 1991**).

- **Nom vernaculaire (Algérie) :** Dgouft, Alala.
- **Nom vernaculaire (Maroc, Tunisie) :** Tedjok.
- **Nom français :** Armoise Champêtre



Photo 02. *Artemisia Campestris* L.

II.2.2. Systématique

Tableau 03. Classification botanique d'*Artemisia campestris* L. dans la systématique (Caratini, 1971 ; Botineau, 2010 ; Dupont et Guignard, 2012)

Classification	<i>Artemisia Campestris</i> L.
Règne	Plantae
Sous-règne	Tracheobionta
Division	Magnoliophyta
Classe	Magnoliopsida
Sous- classe	Asteridae
Ordre	Asterales
Famille	Asteraceae
Genre	<i>Artemisia</i>
Espèce	<i>Artemisia campestris</i> L.

II.2.3. Propriétés thérapeutiques

Artemisia campestris L. est une plante utilisée depuis longtemps dans la médecine traditionnelle pour traiter plusieurs maladies: En usage local *Artemisia campestris* L. est utilisée pour traiter les troubles digestives, les ulcères et les douleurs menstruelles (Dob *et al*, 2005). Elle est également utilisée dans le traitement de diabète (Sefi *et al*, 2010).

La partie aérienne est utilisée dans le traitement de brûlures, diarrhée, les morsures de serpents, les piqûres de scorpions, l'eczéma, la gastroentérite, la dysenterie, le rhumatisme, elle est utilisée également pour traiter les infections urinaires, la fièvre et la toux (Ben Sassi *et al*, 2007).

Selon Saudi *et al.* (2010) la consommation journalière d'une décoction préparée à partir des tiges et feuilles d'*Artemisia campestris* L. permet de réduire les symptômes digestifs.

En plus de leurs utilisations traditionnelles, *Artemisia campestris* L. possède de nombreuses propriétés biologiques, parmi lesquelles on cite les plus importantes :

- La partie aérienne d'*Artemisia campestris* L. possède des activités antioxydantes significatives. En effet cette plante est riche en composés doués d'activité antioxydante tels que: les flavonoïdes, les polyphénols et les tanins, ces différents constituants exercent

ses actions antioxydantes en inhibant la production de l'anion superoxyde, l'hydroxyle, comme ils inhibent la peroxydation lipidique au niveau des microsomes (**Bruneton, 1999**).

Dans une étude faite par **Akrout et al. (2011)** ont étudié l'activité antioxydante de trois extraits de la partie aérienne d'*Artemisia campestris* L. (huile essentielle, extrait aqueux, extrait éthanolique 50%) en utilisant trois méthodes différentes: la méthode de DPPH, la technique de décoloration du β -carotène et la méthode d'ABTS (2,2 azinobis-3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid), ils ont trouvé que l'huile d'*Artemisia campestris* L. possède une faible activité antioxydante, alors que les extraits aqueux et organique montrent une activité antioxydante importante en comparaison à celle de l'huile essentielle.

- *Artemisia campestris* L. est une plante médicinale utilisée dans le traitement de nombreuses infections telles que les infections urinaire. **Naili et al. (2010)** ont testé l'activité antibactérienne de l'extrait méthanolique des feuilles d'*Artemisia campestris* L., ils ont trouvé que l'activité de cet extrait a été plus efficace contre les bactéries gram positif (*Staphylococcus aureus*) que bactéries gram négatif (*Escherichia coli*).

Ben Sassi et al. (2007) ont étudié l'activité antibactérienne de quatre extraits organiques (méthanol, acétate éthyle, acétone, chloroforme) de 23 plantes médicinales dont *Artemisia campestris* L. contre 14 bactéries gram positif et gram négatif. Les résultats ont montré que l'extrait acétonique est le seul qui montre une action inhibitrice contre trois types de bactéries: *S. epidermidis*, et *S. saprophiticus*, *S. aureus*.

- En outre *Artemisia campestris* L. possède des propriétés antifongiques, **Kyeong et ses collaborateurs (2007)** ont étudié l'effet antifongique de l'extrait aqueux des racines d'*Artemisia campestris* L. sur des champignons de mycorhize, les résultats obtenus montrent que l'extrait aqueux possède un potentiel antifongique.

- Une étude récente a été réalisée par **Pavela (2009)**, où l'extrait méthanolique de la partie aérienne d'*Artemisia campestris* L. a été testé pour son activité répulsive contre les femelles adultes d'une espèce de moustique *Culex quinquefasciatus*, cet extrait a montré un degré de répulsion très intéressant contre ces parasites vecteurs de plusieurs maladies comme la malaria.

- Les plantes du genre *Artemisia* possèdent des propriétés allélopathiques par inhibition de la croissance et la germination de certaines plantes de l'entourage, ces propriétés sont dues probablement à la présence d'acide phénolique, et d'autres composants polaires (**Kyeong et al, 2007**).

II.2.4. Composition chimique

De nombreuses études chimiques ont révélé que la partie aérienne d' *Artemisia campestris* L. est riche en métabolites secondaires tels que les polyphénols, les flavonoïdes, les tanins, les huiles essentielles (Joao *et al*, 1998 ; Juteau *et al*, 2002).

Quelques études (Akrouit *et al*, 2001 ; Juteau *et al*, 2002) ont rapporté la composition des huiles essentielles d' *Artemisia campestris* L., après une analyse par la chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CG-MS), Juteau *et al*. (2002) ont indiqué que les composés les plus abondants dans une espèce de Camargue (Marseille, France) sont : γ -terpinène, capillène, 1-phenyl-2,4-pentadiyne, spathulenol, méthyleugenol, p-cymène et β -pinène.

D'après Akrouit *et al*. (2001) les constituants les plus abondants d'une espèce de Tunisie sont : β -pinène (24,2 à 27,9%), p-cymène (17.4 à 22.3%) et α -pinène (4.1 à 11.0%), ces constituants représentent plus de 45 % de l'huile totale.

Djeridane *et al*. (2007) ont déterminés par des méthodes spectrophotométriques dans la partie aérienne d' *Artemisia campestris* la présence des composés phénoliques, les flavonoïdes et les dérivés hydroxycinnamiques.

Les flavonoïdes identifiés chez *Artemisia campestris* L. sont: flavone (apégénine), flavonol (kaempférol 7-méthyle), flavanone (naringénine), dihydroflavonols (taxifoline-7-méthyle) (Valant *et al*, 2003).

Les feuilles d' *Artemisia campestris* L. contiennent aussi des alcaloïdes et des saponines. (Naili *et al*, 2010).

II.3. *Ammodaucus leucotrichus* Coss. & Dur.

Apiaceae (Ombellifères) est une famille très homogène, d'environ de 300 genres et plus de 3000 espèces, cosmopolite, elle est présente dans plusieurs habitat, principalement dans les régions tempérées et les régions tropicales du monde. Cette famille est représentée en Algérie par 55 genres et 130 espèces (Abu Zarga *et al*, 2013).

II.3.1. Description botanique

Une petite plante annuelle, 10-12 cm. élevé, glabre, à tiges dressées, finement striées, rameuse. Les feuilles sont vertes très divisées en lanières fines, un peu charnues; ombelles à 2-4 rayons. Les fleurs sont de petite taille, avec 5 pétales libres, se transforme en un fruit très velus, oblong et comprimés de 8– 9 mm de long pour environ 4 de large. Les cotes latérales sont légèrement ailées, les bandelettes sont grossières. Ils sont surtout densément couverts de

longs poils soyeux, plante à très forte odeur d'anis. Environ; Il fleurit habituellement au début du printemps (Février à Avril) (Ozenda, 2004 ; IUCN, 2005).

Le cumin velu est une plante endémique de l'Afrique du Nord (principalement Sahara), y compris les îles Canaries. Sa présence est également mentionnée à Nigeria, la Mauritanie et dans la Haute Vallée du Nil. Il se développe particulièrement dans les régions désertiques, souvent au pied d'une colline ou d'une dune (IUCN, 2005 ; Seidemann, 2005).

- **Nom français** : Cumin velu, Cumin du Sahara.
- **Nom vernaculaire (Algérie)** : Kammûn es-sofi, El massoufa (Bechar), Oum draiga, Kamoune l'ibel.
- **Nom vernaculaire (Targui)** : Akâman.
- **Nom vernaculaire (Maroc)** : Kemmoun sofi, Kemmount bousofa.



Photo 03. *Ammodaucus leucotrichus* Coss. & Dur.

II.3.2. Systématique

Tableau 04. Classification botanique d'*Ammodaucus leucotrichus* Coss. & Dur. dans la systématique (Ozenda, 2004 ; Spichiger *et al*, 2004 ; Botineau, 2010 ; Dupont et Guignard, 2012)

Classification	<i>Ammodaucus leucotrichus</i> Coss. & Dur.
Règne	Plantae
Sous-règne	Angiosperms
Division	Eudicots
Classe	Asterids
Sous- classe	Asterales
Ordre	Apiales
Famille	Apiaceae
Genre	<i>Ammodaucus</i> Coss. & Dur.
Espèce	<i>Ammodaucus leucotrichus</i> Coss. & Dur.

II.3.3. Propriétés thérapeutiques

Au Maroc et en Algérie (en particulier dans le sud algérien : Bechar, Djanet, El Golea), les fruits et les graines, en décoction ou en poudre, sont utilisés dans le traitement de plusieurs maladies : indigestion, anorexie, allergies, les morsures de serpent, les piqûres de scorpion, infections des blessures, palpitation, refroidissements, troubles de la glande thyroïde, toux, diarrhée, fièvre, vomissement et comme condiment (Ould el hadj *et al*, 2003 ; IUCN, 2005 ; Seidemann, 2005 ; Volpato *et al*, 2012 ; Abu Zarga *et al*, 2013). Dans le Tassili, en particulier la région de Djanet, elles sont utilisées beaucoup plus sous forme de poudre pour traiter les mêmes symptômes mentionnés ci-dessus, aussi sont mélangées avec du lait ou de miel afin de récupérer l'appétit (IUCN, 2005). Lahsissene *et al*. (2009) ont rapporté que les fruits, en infusion, sont très employés dans diverses maladies infantiles de l'appareil digestif : nausées, dysenteries et vomissements.

Les feuilles sont également utilisées contre les infections des voies respiratoires, dans la région de Djanet, sont employées pour aromatiser le thé, en poudre, sont aussi utilisées comme condiment (IUCN, 2005). Au Maroc, les fleurs sont utilisées pour le traitement des maladies cardiaques (Abu Zarga *et al*, 2013).

Beghalia et al. (2009) ont testé l'effet de l'extrait aqueux d'*Ammodaucus leucotrichus* Coss. & Dur. sur la cristallisation de l'oxalate de calcium *in vitro*. Les résultats ont montré que l'extrait aqueux de cette plante peut être utilisé en complément pour prévenir la formation de calculs urinaires (lithiase urinaire ou calculs rénaux) et pour soigner cette affection.

L'activité antibactérienne de l'huile essentielle d'*Ammodaucus leucotrichus* Coss. & Dur. a été testée par **Abu Zarga et al. (2013)** contre huit bactéries, ils ont trouvé que l'huile pure était le plus actif contre *Micrococcus luteus*, tandis que modérément active contre *Klebsiella pneumoniae*, *Streptococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus* et *Bacillus subtilis*. En outre, elle était inactive contre *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Salmonella typhi*.

De même, l'activité anti tumoral de cette essence a été testée contre les lignées cellulaires de cancer MCF7 et T47D et les résultats n'ont montré aucune activité.

II.3.4. Composition chimique

L'étude phytochimique et la composition des huiles essentielles de l'espèce *Ammodaucus leucotrichus* Coss. & Dur. a fait l'objet de très peu de travaux.

Muckensturm et al. (1997) ont rapporté l'isolement et la caractérisation de l'ammolactone-A, une nouvelle lactone de guaianolide de l'extrait étheré des graines d'*Ammodaucus leucotrichus* Coss. & Dur. obtenues à partir des marchés locaux du Maroc. En plus de cette molécule, l'extrait se caractérise par la dominance de (+)-limonene et (+)-perillaldehyde, avec la présence d'un nouveau monoterpène ((+)-3-hydroxyperillaldehyde (4)), (-)-methyl-perillate, (+)-borneol angelate et (+)- γ -deca-lactone.

L'analyse par chromatographie en phase gazeuse (CPG) et par couplage chromatographie en phase gazeuse-spectrométrie de masse (CPG/SM) des huiles essentielles de deux espèces endémiques (*Ammodaucus leucotrichus* subsp. *Leucotrichus* et *Ammodaucus leucotrichus* subsp. *Nanocarpus*), la première du Nord Afrique et la deuxième des îles Canaries d'Espagne, a révélé que les constituants principaux de subsp. *Nanocarpus* : β pinene (33.6%), bornyl angelate (21.8%) et le camphor (11.7%), tandis que subsp. *leucotrichus*, est dominée par le perillaldehyde (63.6%) et limonene (26.8%) (**Velasco-Negueruela et al, 2006**).

Une récente étude réalisée par **Abu Zarga et al. (2013)**, montre que l'analyse chimique de l'huile essentielle hydro-distillée, d'*Ammodaucus leucotrichus* Coss. & Dur. récolté dans la région Guerrara (Ghardaia), a révélé que cette essence est formée en majorité par les monoterpènes oxygénés (87,32%) avec une prédominance de perilla aldehyde (84.43 %). Alors que l'huile obtenue par la méthode d'extraction SPME (Solid Phase Micro-Extraction)

est composée principalement de monoterpènes hydrocarbonés (87,40%) dont le terpinolène est le constituant principal de la fraction (69,21%).

II.4. *Anethum graveolens* L.

Le genre *Anethum* L. de la famille des Apiaceae (ou Ombellifères), sous-famille des Apioideae, tribu des Apieae ne compte qu'une seule espèce largement répandue dans le monde : l'aneth odorant (*Anethum graveolens* L).

Origine du nom : Aneth vient du grec « anêthon » (comme pour Anis), lui-même emprunté à l'égyptien ancien, et graveolens vient du latin « gravis » (lourd, fort) et « olens » (sentant), ce qui regroupé donne à odeur forte (**Lamendin, 2007**).

L'Aneth est connue depuis des milliers d'années, elle est cultivée principalement en Inde et Pakistan comme plante condimentaire pour ses feuilles et ses graines très aromatiques, tandis que les principaux producteurs de l'huile essentielle de l'aneth sont : Etats-Unis, Canada, la Hongrie et la Bulgarie (**Orhan et al, 2013**). Elle se rapproche du fenouil par son odeur et ses propriétés, d'où ses noms de fenouil bâtard ou faux anis. Le nectar de ses fleurs est très apprécié des abeilles (**Polese, 2006**).

II.4.1. Description botanique

C'est une plante annuelle à tiges dressées, striées, de 30-80 cm avec un étalement d'une trentaine de centimètres, rameuses dans le haut.

Les feuilles sont très divisées, fines, filiformes, à lanières étroites, ombelles à 12-30 rayons inégaux, sans involucre ni involucelle. La floraison produit des ombelles terminales à fleurs jaune verdâtre parfumées. Chaque fleur a 5 pétales jaunes et 5 étamines. Les graines sont petites (2,5 mm), ovales, aplaties à côtes proéminentes, de couleur brune, se scindent en deux au séchage, et sont matures en août-septembre. Plante glabre à odeur de fenouil, espèce méditerranéenne présente au Sahara septentrional, assez rare au Sahara central, originaire aussi du Moyen-Orient et d'Asie centrale, elle a été acclimatée dans le sud de l'Europe, mais on le trouve maintenant un peu partout. (**Ozenda, 2004 ; Polese, 2006, Attokaran, 2011**).

- **Nom français** : L'aneth, fenouil bâtard, faux anis, fenouil puant.
- **Nom vernaculaire (Algérie)** : El bessbesse béri



Photo 04. *Anethum graveolens* L.

II.4.2. Systématique

Tableau 05. Classification botanique d'*Anethum graveolens* L. dans la systématique (Ozenda, 2004 ; Spichiger *et al*, 2004 ; Botineau, 2010 ; Dupont et Guignard, 2012)

Classification	<i>Anethum graveolens</i> L.
Règne	Plantae
Sous-règne	Tracheobionta
Division	Magnoliophyta
Classe	Magnoliopsida
Ordre	Apiales
Famille	Apiaceae
Genre	<i>Anethum</i>
Espèce	<i>Anethum graveolens</i> L.

II.4.3. Propriétés thérapeutiques

On retrouve mention de l'aneth, en utilisation médicinale, dans un papyrus égyptien vieux de 3000 ans. Le médecin grec Discoride en faisait un tel usage que l'on surnommait l'aneth " la plante à Discoride ". Les Romains mâchaient les graines de l'aneth pour rafraîchir l'haleine et faciliter la digestion. Les médecins chinois l'utilisent depuis au moins 1000 ans pour les problèmes d'estomac. Même dans une traduction des passages et chapitres consacrés à l'odontostomatologie, de *la grande chirurgie*, ouvrage composé par Guy de Chauliac en 1363,

il est signalé l'emploi de l'aneth contre la douleur de dent (**Lamendin, 2007 ; Orhan et al, 2013**).

Elle a été largement utilisée en cuisine et pour préserver la fraîcheur des aliments. Les feuilles d'aneth fraîches ou séchées, sont employées pour aromatiser différentes préparations culinaires, elles donnent du « sel » aux salades, aux soupes ainsi qu'aux poissons et aux moutons. Les fleurs aromatisent les plats de concombres ou de carottes et décorent les veloutés. Les graines sont utilisées entières ou pilées pour épicer les poissons grillés ou fumés, les marinades, les grillades et les sauces (**Polese, 2006 ; Orhan et al, 2013**).

L'aneth est reconnu depuis très longtemps pour ses vertus digestives et carminatives (qui favorisent l'expulsion des gaz). Cette plante favorise la relaxation du muscle lisse du tube digestif et agit comme agent anti-moussant, en prévenant la formation de bulle de gaz intestinaux (**Polese, 2006 ; Mansouri et al, 2012**).

Sa concentration élevée en carvone et myristicine rend l'aneth efficace pour soulager les spasmes intestinaux et les coliques. Elle convient mieux aux enfants que l'anis ou le fenouil comme calmante et préparant au sommeil (**Polese, 2006 ; Mansouri et al, 2012 ; Orhan et al, 2013**).

Son huile essentielle s'oppose à la croissance de certains germes tels que les lactobacilles, le colibacille *Escherichia coli*. Elle peut donc prévenir certaines diarrhées infectieuses. Elle protégerait également d'infections des voies urinaires provoquées par *E.coli*.

On recommandait également l'aneth pour favoriser la montée de lait et la lactation (galactagogue), mais cette propriété n'a pas été clairement démontrée (**Monsefi et al, 2006 ; Mansouri et al, 2012**).

Ses propriétés sont aussi apéritive, diurétique, sédative, anti-inflammatoire, antihyperlipidémique (**Polese, 2006 ; Mansouri et al, 2012**), antidiabétique, antihypercholestérolémique (**Orhan et al, 2013**), contre la douleur de dent (**Lamendin, 2007**) et favorise la menstruation chez la femme (**Monsefi et al, 2006**).

- Utilisé en infusion, l'aneth constitue un stimulant du système digestif.
- Ses graines, en infusion, permettent d'arrêter le hoquet, toux des enfants.
- Autres indications : dyspepsie, vomissements d'origine nerveuse, flatulences, insuffisance hépatobiliaire, météorisme abdominal, borborygme (**Small, 2006 ; Mansouri et al, 2012**).

Dans une étude récente faite par **Orhan et al. (2013)** l'activité anti-enzymatique de certains extraits d'*Anethum graveolens* L. a été testée, les résultats obtenus ont montré que l'extrait hexanique et dichlorométhanique à 200µg/mL possèdent une activité inhibitrice

contre le butyrylcholinestérase de $(46.58 \pm 4.77\%)$ et $(47.92 \pm 5.52\%)$ respectivement, tandis que l'effet inhibiteur puissant de l'huile essentielle de cette plante contre l'acétylcholinestérase et butyrylcholinestérase avait déjà été prouvé par le même auteur (**Orhan et al, 2008**).

Isbilira et Sagiroglua (2011) ont étudié l'activité antioxydante de trois extraits (eau, éthanol, acétone) des feuilles de l'aneth par plusieurs méthodes, les résultats obtenus ont montré que l'extrait aqueux possède l'activité antioxydante la plus puissante : 79,66% (à 1 mg/ml) dans le DPPH, 63% (à 800 µg/ml) dans l'effet de chélation des métaux, 60% (à 400 µg/ml) dans la réduction de H₂O₂ et 0,61 d'absorbance (à 1 mg/ml) dans le pouvoir réducteur. Signalons à ce passage, **Orhan et al. (2013)** ont trouvé que l'extrait éthanolique à 2000 µg/ml possède l'activité de piégeage des radicaux contre l'oxyde nitrique (NO) la plus importante $(78.49 \pm 1.86\%)$.

D'une autre part, **Singh et al. (2006)** indique que l'extrait acétonique de l'aneth est équivalent à l'extrait aqueux dans ses propriétés antioxydantes, **Al-Ismail et Aburjai (2004)** rapportent que les extraits aqueux et méthanolique, *in vitro*, ont une efficacité équivalente à la peroxydation lipidique.

Monsefi et al. (2011) attestent que l'extrait éthanolique et aqueux des graines d'*Anethum graveolens* L. jusqu'aux doses tolérables les plus élevées (450mg/kg, 5g/kg) respectivement, ont montré des effets anti-fertilité chez les rats mâles.

L'activité antibactérienne et antifongique de l'aneth a été étudiée par certains travaux. **Singh et al. (2006)** attestent que l'extrait acétonique possède un effet très important contre *Staphylococcus aureus* et *Bacillus cereus* en comparaison avec un bactéricide commercial, alors que l'huile essentielle de cette plante peut être considérée comme une source antimicrobienne naturelle, car elle a montré une meilleure activité contre *Pseudomonas aeruginosa* et pour les champignons, est avérée très efficace contre le *Penicillium citrinum* et *Aspergillus niger*, elle a complètement inhibée la croissance de *Fusarium graminearum* à une dose de 6 µl.

Yili et al. (2009) indiquent que l'huile essentielle des graines d'aneth d'Ouzbékistan a inhibée la croissance de *Staphylococcus aureus* et *Candida albicans* avec une concentration minimale inhibitrice (CMI) de 0.273 et 0.00273 mg/ml respectivement.

Dans une étude récente faite par **Roomiani et al. (2013)**, l'activité antibactérienne de l'essence d'aneth a été testée contre *Streptococcus iniae* l'agent pathogène zoonotique de poisson d'élevage, les résultats ont montré une zone d'inhibition de 32 mm par la méthode de diffusion sur disque et une CMI de 7,8 µg/ml.

Gurinder et Arora (2009) ont testé l'activité antibactérienne de l'extrait aqueux et acétonique des graines d'*Anethum graveolens* L. Ils ont trouvé que les deux extraits possèdent une bonne activité contre toutes les bactéries (*Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhi*, *Salmonella typhimurium*, *Shigella flexneri*) sauf les *Klebsiella pneumoniae* et une souche de *Pseudomonas aeruginosa*. La CMI variait de 20 à 80 mg/ml pour l'extrait aqueux et de 5 à 15 mg/ml pour l'extrait acétonique.

L'activité antifongique d'huile essentielle des grains d'*Anethum graveolens* L. a été testée *in vitro* et *in vivo* par **Tian et al. (2011)**, les résultats ont montré que la CMI a été 2 µl/ml pour les quatre champignons testés (*Aspergillus flavus*, *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus niger* et *Alternaria alternata*), cette concentration représente également la dose qui inhibe la production de biomasse dans un milieu liquide de toute les souches fongique testées. L'observation microscopique d'*Aspergillus niger* avec microscope électronique à balayage après traitement par huile (1 µl/ml) a révélé des modifications dégénératives dans les têtes des conidies et la morphologie des hyphes, diminution dans les diamètres des hyphes, des agrégats hyphes échaudés et un gonflement de la paroi fongique. La plus efficace concentration pour réduire le taux de tomates cerises pourries contre tous les champignons a été de 120 µl/ml avec des pourcentages de réduction : 88,9%, 88,9%, 94,4% et 83,3% pour *A. flavus*, *A. oryzae*, *A. Niger* et *A. alternata* respectivement.

Pour bien élucider le mécanisme d'action anti-fongique de cette essence, l'effet sur la membrane plasmique et les mitochondries d'*Aspergillus flavus* a été étudiée. La lésion de la membrane plasmique est déterminée par la cytométrie en flux et vérifiée par l'inhibition de la synthèse de l'ergostérol. Les résultats ont montré que l'huile essentielle a provoqué : des changements morphologiques dans les cellules d'*A. flavus*, une diminution de la quantité d'ergostérol, une élévation dans le potentiel de la membrane mitochondriale (MMP), une diminution dans les activités d'ATPase et déshydrogénase mitochondriales et par conséquent une accumulation d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) (**Tian et al, 2012**).

II.4.4. Composition chimique

L'étude phytochimique de l'extrait méthanolique des fruits d'*Anethum graveolens* L. faite par **Ishikawa et al. (2002)** a pu isoler et caractériser 33 composés, y compris un nouveau monoterpénoïde, six nouveaux glycosides monoterpéniques, un nouveau composé aromatique glucosidique et un nouveau glucoside alkylique.

Cependant, le criblage phytochimique des graines d'*Anethum graveolens* L. réalisé par **Gurinder et Daljit (2009)** a montré la présence de 2,80% alcaloïdes, 11,05% flavonoïdes, 19,71 tanins et 0,55% saponines.

Selon **Small (2006)**, l'huile essentielle de l'aneth se compose au moins de 10 composés aromatiques différents, le carvone, limonene et α -phellandrene constituent approximativement 90% de tous les composés. La teneur en carvone des graines peut atteindre 60%, par contre une huile qui contient moins de 20% de carvone se ressemble à l'arôme vrai de l'herbe d'aneth.

De même, **Attokaran (2011)** indique que le constituant majoritaire de l'essence des graines d'aneth c'est le carvone avec un taux de 30 à 60%. Les autres principaux constituants sont α -phellandrene, 3,9-epoxy-*p*-menth-1-ene, myrcene, *p*-cymene et limonene.

En effet, l'analyse chimique de l'huile essentielle des graines d'*Anethum graveolens* L. a fait l'objet de nombreux travaux.

L'analyse chromatographique (CG-MS) de l'essence d'*Anethum graveolens* L. d'Ouzbékistan a permis d'identifier 22 composés dont, les principaux constituants sont le carvone (73.61%), limonene (14.69%), cis-dihydrocarvone (5.87%), diplaniol (2.16%) et 1,2-diethoxyethane (1.43%) totalisant environ 99.2% (**Yili et al, 2009**).

L'huile essentielle d'aneth de la Roumanie est sensiblement analogue à celle d'Ouzbékistan constituée majoritairement par le carvone (75.21%), suivi du limonene (21.56%) et le trans-dihydrocarvone (3.02%) (**Radulescu et al, 2010**).

L'huile essentielle d'*Anethum graveolens* L. de l'Iran est dominée par le D-carvone mais avec seulement (36.09%) suivi du limonene (19.89%), dill apiole (16.83%), E-dihydrocarvone (7.36%) et Z-dihydrocarvone (6.59%) (**Roomiani et al, 2013**).

Cependant, l'huile essentielle d'Islande est caractérisée par sa richesse en α -phellandrene (56.5%) suivi par dill ether (20.8%), limonene (10.9%) et *p*-cymene (3.8%) totalisant 92 % contre 36 composés, alors que celle de l'Inde est plus riche en limonene (42.67%), carvone (22.50%) et dillapiole (15.92%) contre 21 composés (**Attokaran, 2011**).

La composition chimique de l'huile essentielle des graines d'aneth de la chine est complètement différente, elle est composée principalement par le n-pentacosane (27.96%), dioctylester de 1,2-phenyldicarboxylic acid (25.10%), suivi du octacosane (13.81%), tricosane (9.14%) et n-nonacosane (6.85%) (**Yili et al, 2006**).

III. Moisissures et mycotoxines

III.1. Les moisissures

III.1.1. Caractères généraux et classification

Les champignons ou Fungi sont des organismes eucaryotes dépourvus de chlorophylle les qualifiant d'organismes hétérotrophes. Une source de carbone organique est donc nécessaire à leur développement. Dans l'arbre du vivant, ils constituent un groupe à part au sein des eucaryotes. Classiquement, les champignons étaient regroupés dans un règne distinct, celui des eumycètes (figure 06) ou cinquième règne (**Kendrick 2001**). Les classifications les plus récentes font apparaître les champignons dans le règne unique des eucaryotes et plus précisément dans le groupe des Opisthokonta (**Adl *et al*, 2005 ; Simpson et Roger 2002, 2004**). A l'instar des autres organismes vivants, les champignons sont subdivisés en classes, en ordres, en familles, puis en genres et espèces. Ces deux derniers termes étant utilisés pour les désigner. La classification des champignons est d'abord basée sur un mode de reproduction sexuée ou phase téléomorphe. Ce critère définit quatre des cinq groupes principaux : les chytridiomycètes, les zygomycètes, les basidiomycètes et les ascomycètes. Certaines moisissures sont le plus souvent ou exclusivement rencontrées à un stade de multiplication asexuée, dit anamorphe. Ces organismes sont alors classés d'après le mode de production des spores asexuées ou conidies. Ces espèces sont classées dans le cinquième ordre, les Deutéromycètes ou Fungi imperfecti. Dans le présent travail nous ne parlerons que des champignons filamenteux microscopiques.

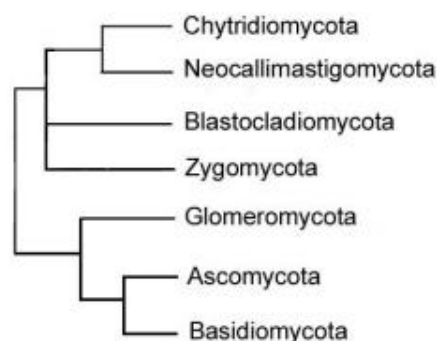


Fig 06. Les grands groupes des eumycètes (**Johnson *et al*, 2011**)

Les moisissures sont des organismes pluricellulaires dont l'appareil végétatif, le thalle, est formé de longs filaments ramifiés et souvent cloisonnés que l'on appelle des hyphes. Lorsque la croissance est suffisamment avancée, l'ensemble des hyphes

constitue un mycélium visible à l'œil nu qui se présente comme une sorte de feutrage à la surface colonisée (Nicklin *et al*, 2000). Elles ne peuvent se développer que sur des substrats organiques. La structure filamenteuse du thalle les rend particulièrement aptes à coloniser des substrats solides (Multon, 1982).

III.1.2. Cycle de vie des moisissures

Les moisissures se propagent sur différents substrats, par l'intermédiaire de spores qui sont des corpuscules de 2 à 250 μm de diamètre. Les spores sont disséminées principalement par l'air ambiant ou par le contact de l'homme ou les animaux. Lorsqu'elles se déposent sur un substrat organique, elles germent si les conditions d'humidité et de température y sont favorables (Chabasse *et al*, 1999). La spore germera alors et donnera naissance à un premier filament non différencié, appelé hyphe, qui s'allongera pour former un ensemble appelé mycélium. Cet ensemble de filaments, plus ou moins ramifiés, constitue le thalle des champignons. En présence de conditions favorables à la sporulation, le mycélium donnera naissance à des structures plus spécialisées, qui produiront des spores asexuées (conidies) ou, plus rarement, des spores sexuées (Kendrick, 1999).

Donc, le cycle de vie des champignons comprend deux types de reproduction :

- une reproduction asexuée, au cours de laquelle une spore ou un fragment de mycélium croît et se développe sur un substrat. Le mycélium émet des conidiophores à l'extrémité desquels des conidies sont émises puis disséminées. Chez les moisissures, plusieurs types de spores de reproduction végétative peuvent être produites : arthrospores (issues de la septation de la paroi cellulaire), sporangiospores (formées dans un sporange à l'extrémité d'une hyphe), conidiospores (produites à la périphérie des hyphes), blastospores (formées par un bourgeonnement de surface d'une cellule végétative) (Branger *et al*, 2007).
- la reproduction sexuée, implique la rencontre de deux mycéliums de signes sexuels opposés. Un mycélium à n chromosomes va rencontrer un autre mycélium à polarité complémentaire pour donner lieu à la fusion des cytoplasmes, ce qui engendre un nouveau mycélium à $2n$ chromosomes. Les cycles de vie diffèrent d'un champignon à un autre selon leur type de spores.

Les spores pénètrent dans par voie chimique (production d'enzymes, de toxines) ou par voie mécanique en exerçant une pression sur le substrat (Chabasse *et al*, 1999).

III.1.3. Identification des champignons

Cette identification a pendant longtemps été exclusivement basée sur l'observation des caractères culturels et morphologiques de l'espèce. Les progrès récents de la biologie moléculaire ont permis de proposer des outils d'aide à l'identification. Toutefois, la complexité du règne fongique fait, qu'à l'heure actuelle, ces outils ne peuvent pas encore remplacer complètement l'examen morphologique, qui reste la base de l'identification (Tabuc, 2007).

Les critères macroscopiques reposent sur l'observation des colonies et de leur couleur recto et verso, leur taille, leur relief, leur aspect (filamenteux, collant), leur transparence (opaque, translucide), l'allure des contours et la pigmentation. Les critères microscopiques sont fondés sur l'aspect morphologique des différentes structures des champignons : le type de thalle (septé ou non), la couleur des hyphes (foncées ou claires), la forme des spores, l'origine des spores (endogène ou exogène), la forme des têtes (en forme de pinceau, aspergillaire).

Outre des critères morphologiques, il existe maintenant des critères moléculaires qui permettent une identification précise des espèces. Les loci les plus souvent testés sont les ADN codant pour les différentes fractions des ARN ribosomiaux.

Les méthodes les plus intéressantes sont basées sur l'amplification par PCR (polymerase chain reaction). Cette méthode est aussi utilisée pour différencier et identifier les moisissures responsables de l'altération des aliments, principalement les espèces de *Penicillium* (Boysen *et al*, 2000 ; Hageskal *et al*, 2006).

III.1.4. Habitat naturel des moisissures toxigènes

Plus de 200 espèces constituent le genre *Aspergillus*. Particulièrement communes en région tropicale, certaines espèces sont cependant cosmopolites, très fréquentes dans le sol, sur débris organiques en décomposition, dans le compost, dans les entrepôts à grains, dans les épices... Les spores d'*Aspergillus* sont plus abondantes dans les espaces clos qu'à l'air libre. Elles sont souvent associées aux poussières émises lors des travaux de construction, excavation et rénovation de bâtiments. Ce sont des spores qui sédimentent rapidement, mais s'accumulent sur les surfaces et dans les poussières.

Moisissure cosmopolite, *Fusarium* s'isole du sol, de l'eau, de l'air et de nombreux végétaux qu'il parasite le plus souvent, entraînant des pertes sévères dans les cultures.

De tous les champignons, c'est probablement *Penicillium* le plus ubiquiste. En effet, il comporte plus de 200 espèces qui se rencontrent partout de l'équateur aux pôles : dans le sol, sur des débris organiques, dans le compost, sur les fruits et légumes. Les espèces

de *Penicillium* sont des contaminants fréquents de l'air, tant dans les logements qu'à l'extérieur. Leurs spores s'isolent toute l'année. De nombreuses espèces sont susceptibles de se rencontrer dans l'habitat humide (**Jard, 2009**).

Pathogène de végétaux, *Alternaria* est cosmopolite et se comporte surtout comme un parasite de faiblesse et se développe sur des plantes sénescents, sur des débris organiques divers, sur le sol, sur des produits alimentaires, sur le papier...

III.2. Les mycotoxines

Nous avons énoncé au paragraphe précédent la définition des moisissures, leurs caractéristiques, identifications et leurs habitat naturel. Il arrive parfois que ces moisissures produisent des métabolites secondaires dont certains, les mycotoxines, faisant partie des contaminants alimentaires les plus significatifs en termes d'impact sur la santé publique, la sécurité alimentaire et l'économie de nombreux pays. Elles sont produites sur une large variété de denrées alimentaires avant, pendant et après récolte.

Les principales denrées alimentaires contaminées par ces mycotoxines sont les céréales (blé, orge, maïs, riz, seigle, avoine, orge), les oléagineux (arachide, soja, tournesol), les fruits (agrumes, bananes, pommes, raisins), les fruits secs, le café, le cacao, les épices, les haricots et les petits pois. Les mycotoxines peuvent être également présentes dans la bière et le vin produits à partir de céréales ou de raisins contaminés. Elles peuvent aussi entrer dans la chaîne alimentaire humaine par consommation de produits carnés, les œufs, le lait et le fromage (**Turner et al, 2009**).

III.2.1. Définition et caractéristiques des mycotoxines

Le terme mycotoxine vient du grec «mycos» qui signifie champignon et du latin «toxicum» qui signifie poison. Il désigne des métabolites secondaires sécrétés par des moisissures appartenant principalement aux genres *Aspergillus*, *Penicillium* et *Fusarium*, *Claviceps* et *Alternaria* naturellement présentes dans l'air ambiant, le sol et sur les cultures (**Yiannikouris et Jouany, 2002 ; El khoury, 2007**).

Le métabolisme secondaire est très diversifié, d'où la multitude de métabolites secondaires. Il existe environ 300 à 400 mycotoxines (**Elidemir et al, 1999**).

Elles sont des métabolites de faible poids moléculaire, généralement inférieur à 500 g/mol qui ont, pour la plupart, une structure hétérocyclique. D'après leur structure chimique, les mycotoxines sont considérées comme stables et en particulier thermostables (**Bullerman et Bianchini, 2007**).

Une même espèce fongique peut produire plusieurs sortes de mycotoxines selon les conditions de culture et une même mycotoxine peut être produite par plusieurs espèces fongiques différentes.

Les mycotoxines ne constituent pas une classe chimique, mais peuvent se classer selon leur voie de biosynthèse en trois grands groupes, d'après **Pfohl-Leszkowicz (1999)** :

- a) Les composés dérivés des acides aminés (peptides) : alcaloïdes de l'ergot, acide aspergillique, acide cyclopiazonique, slaframine, gliotoxine, roquefortine, sporodesmine.
- b) Les composés dérivés des polycétoacides (polyacétates) : aflatoxines, ochratoxine, patuline, citrinine, acide pénicillique, stérigmatocystine, zéaralénone.
- c) Les composés dérivés des terpènes : diacétoxyscirpénol, fusarénone, désoxynivalénol, roridines, toxine T-2, verrucarine ou des dérivés d'acides gras fumonisines, alternariol.

III.2.2. Les différents types de mycotoxines

Plusieurs mycotoxines ont été identifiées mais heureusement, seules une vingtaine de familles posent des problèmes en alimentation humaine et animale et seules six familles sont fréquemment rencontrés en agro-alimentaire : les aflatoxines, les ochratoxines, les fumonisines, les trichothécènes, la zéaralénone et la patuline (**Hadjeba, 2012**).

➤ Les trichothécènes

Les trichothécènes constituent un groupe de métabolites secondaires produits par de nombreuses espèces du genre *Fusarium*, en particulier *F. graminearum*, *F. culmorum*, *F. poae* et *F. sporotrichioides*. Plus de 160 trichothécènes ont été identifiés, notamment le déoxynivalénol (DON), le nivalénol (NIV), la toxine T-2, la toxine HT-2, le diacétoxyscirpénol (DAS) et la fusarénone X (FX). Le trichothécène le plus fréquemment retrouvé est le DON (**AFSSA, 2006**).

➤ Les fumonisines

Elles forment une famille d'environ 15 molécules dont les fumonisines B1, B2, B3, B4 sont les plus importantes (**Jard, 2009**). Les fumonisines constituent un groupe de mycotoxines structurellement reliées, solubles dans l'eau, il s'agit de chaînes d'hydroxyles de carbone à la différence des aflatoxines ou des ochratoxines. Cette famille de mycotoxines est principalement produite par *Fusarium verticillioides* (anciennement *F. moniliforme*) et *F. proliferatum* (**Gelderblom et al, 1988 ; Boudih, 2011**).

➤ La zéaralénone

La ZEA est une lactone de l'acide résorcyclique, l'une des propriétés qui inquiète le plus est son effet oestrogénique. Elle est produite par *Fusarium graminearum*, *F. culmorum*, *F. crookwellense*, *F. equiseti* et *F. oxysporum*. qui sont des contaminants fréquents des aliments (AFSSA, 2009 ; Jard, 2009).

➤ La patuline

Elle est produite par *Penicillium expansum* et dans une moindre mesure par *Aspergillus clavatus* et *Byssoschlamys nivea*. Le *P. expansum* produit la patuline entre 0 et 30°C contrairement à la plupart des champignons microscopiques (AFSSA, 2009 ; Boudih, 2011).

Tableau 06. Mycotoxines et moisissures productrices associées (AFSSA, 2009).

Mycotoxine	Principales moisissures productrices
Aflatoxines B1, B2, G1 et G2	<i>Aspergillus flavus</i> , <i>A. parasiticus</i> , <i>A. nomius</i>
Ochratoxines A	<i>Penicillium verrucosum</i> , <i>P. nordicum</i> , <i>A. ochraceus</i> , <i>A. carbonarius</i> , <i>A. niger</i>
Patuline	<i>Penicillium expansum</i> , <i>Aspergillus clavatus</i> , <i>Byssoschlamys nivea</i>
FB1, FB2, FB3	<i>Fusarium verticillioides</i> , <i>F. proliferatum</i>
Trichothécènes (DON, toxines T-2, HT-2)	<i>Fusarium graminearum</i> , <i>F. culmorum</i> , <i>F. crookwellense</i> , <i>F. sporotrichioides</i> , <i>F. poae</i> , <i>F. tricinctum</i> , <i>F. acuminatum</i>
ZEA	<i>F. graminearum</i> , <i>F. culmorum</i> , <i>F. crookwellense</i>
Alcaloïdes de l'ergot	<i>Claviceps purpurea</i> , <i>C. paspali</i> , <i>C. Africana</i>
Citrinine	<i>Aspergillus terreus</i> , <i>A. carneus</i> , <i>A. niveus</i> , <i>Penicillium verrucosum</i> , <i>P. citrinium</i> , <i>P. expansum</i>
Toxines d'Alternaria (alternariol, alternariol méthyl éther...)	<i>Alternaria alternata</i> , <i>Al. solani</i>
Acide cyclopiazonique	<i>A. flavus</i> , <i>A. versicolor</i> , <i>A. tamarisii</i> , <i>P. camemberti</i>
Stéigmatocystine	<i>Aspergillus nidulans</i> , <i>A. versicolor</i> , <i>A. flavus</i>
Sporidesmines	<i>Pithomyces chartarum</i>
Stachybotryotoxines	<i>Stachybotrys chartarum</i>
Toxines d'endophytes (ergovaline, lolitrème B)	<i>Neotyphodium coenophialum</i>
Phomopsines	<i>Phomopsis leptostromiformis</i>
Toxines trémorgènes	<i>Penicillium roquefortii</i> , <i>P. crustosum</i> , <i>P. puberrelum</i> , <i>Aspergillus clavatus</i> , <i>A. fumigatus</i>

III.2.2.1. les mycotoxines ciblés dans cette étude

III.2.2.1.1. Les aflatoxines

III.2.2.1.1.1. Définition et structure chimique

Elles sont produites par *A. flavus* et *A. parasiticus*, champignons particulièrement favorisés dans un environnement chaud et humide. *Aspergillus. nomius*, une souche rare proche de *A. flavus*, est capable aussi de produire des aflatoxines.

Ce sont des dérivés coumariniques, dérivent de la stérigmatocystine, solubles en milieu polaire organique (DMSO, méthanol, chloroforme). Cependant la toxicité de ces molécules est telle que même de faibles concentrations peuvent poser des problèmes (**Boudih, 2011**). Une des plus célèbres mycotoxines est possédant le profil toxicologique le plus sérieux, l'aflatoxine B1 (AFB1). Des dérivés secondaires de l'AFB1 (AFB2, AFG1, AFG2, AFM1) ont été identifiés. Le cycle lactone de l'AFB1 semble être responsable en majorité de sa toxicité (**El khoury, 2007 ; Jard, 2009**). Les structures chimiques de ces différents dérivés sont représentées dans la figure 07.

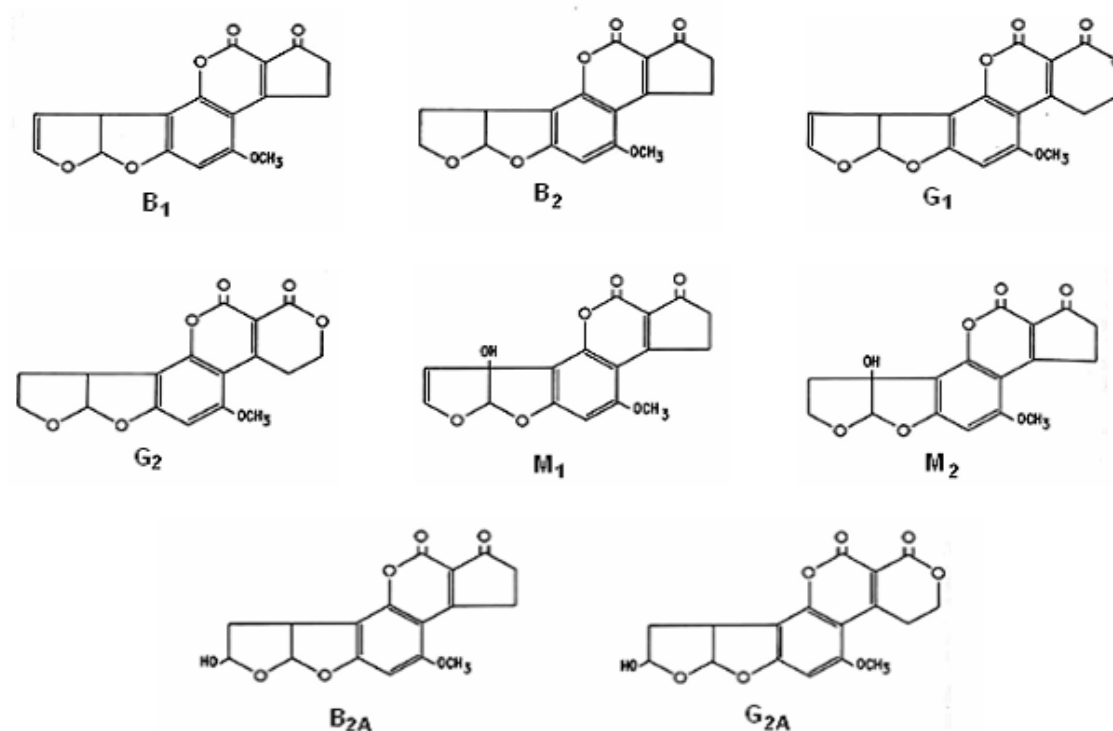


Fig 07. Structures chimiques des différentes aflatoxines (Cole *et al.*, 2003)

III.2.2.1.1.2. Propriétés physico-chimiques des Aflatoxines

Les aflatoxines sont des cristaux incolores ou jaune pâle-fluorescents de façon très intense sous une lumière ultra-violette. Les aflatoxines B 1 et B 2 émettent une fluorescence bleue et les aflatoxines G 1 , G 2 , une fluorescence vert jaune. Ces couleurs de fluorescence sont à l'origine du nom des mycotoxines (B pour Blue et G pour Green). L'aflatoxine M 1 présente une fluorescence bleu-violette sous irradiation ultra-violette. Le M vient de Milk, car ce métabolite a été tout d'abord isolé du lait (Pfohl-Leszkwicz, 1999). Le Poids moléculaire (PM), facteur de rétention (RF) calculé sur gel de silice 60 (0.25 mm), points de fusion et spectre d'absorption sous Ultra-Violet des aflatoxines (solution dans l'éthanol) des différentes aflatoxines sont résumés dans le tableau 07.

Tableau 07. Points de fusion et données spectrales des aflatoxines (Pfohl-Leszkwicz, 1999 ; El khoury, 2007)

Aflatoxines	PM	RF	Point de Fusion °C	Spectre	
				λ max (nm)	ε
B1	312	0.56	268-269 (décomposition) (cristallisation dans le chloroforme)	223	25 600
				265	13 400
				362	21 800
B2	314	0.53	287-289 (décomposition) (cristallisation dans un mélange de chloroforme et de pentane)	222	17 000
				265	11 700
				363	23 400
G1	328	0.48	244-246 (décomposition) (cristallisation dans un mélange de chloroforme et de méthanol)	243	11 500
				257	9 900
				264	10 000
G2	330	0.46	237-239 (décomposition) (cristallisation dans une solution d'acétate d'éthyle)	362	16 100
				214	28 100
				265	11 600
M1	328	0.40	299 (décomposition) (cristallisation dans une solution de méthanol)	363	21 000
				226	23 100
				265	11 600
				357	19 000

Leur stabilité est très variée, dans l'eau elles sont généralement peu solubles (10-30 mg.ml⁻¹) présentant une instabilité totale dans les solvants non polaires. Par contre elles sont très solubles dans les solvants organiques de polarité moyenne (CHCl₃ , CH₃OH, DMSO) (Cole et Cox, 1981).

Les aflatoxines se trouvent instables sous la lumière ultraviolette en présence d'oxygène avec des pH extrêmes (pH < 3 ou pH > 10). Par oxydation le cycle lactone des aflatoxines devient sensible à une hydrolyse alcaline, mais en cas de neutralisation, il peut se reformer. Les aflatoxines sont aussi dégradées par l'ammoniaque (NH₄OH) et l'hypochlorite

de sodium (NaCl). Lors de cette dernière réaction, il se forme le 2,3-dichloro-aflatoxine B1 qui est directement génotoxique (Cole et Cox, 1981).

III.2.2.1.2. Les ochratoxines

III.2.2.1.2.1. Définition et structure chimique

Les ochratoxines constituent une famille de toxines résultant de la condensation d'un résidu phénylalanine et d'un dérivé isocoumarinique (El khoury, 2007). Parmi les 3 ochratoxines existantes (OTA, OTB, OTC), l'ochratoxine A (OTA) est la plus fréquemment rencontrée, elle a d'abord été isolée à partir de cultures d'*Aspergillus ochraceus* d'où son nom. Elle est également synthétisée par plusieurs espèces d'*Aspergillus* et de *Penicillium*, en particulier *A. carbonarius*, *A. niger* et *P. verrucosum*, *P. nordicum* (Cole et al., 2003). Il a été démontré récemment que deux nouvelles espèces, *A. westerdijkiae* et *A. steynii*, produisent l'OTA plus que *A. ochraceus* (Rhouati, 2013).

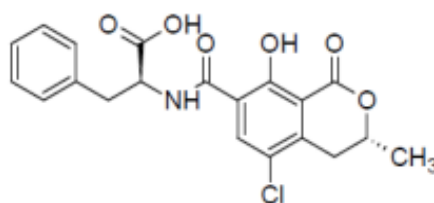


Fig 08. Structures chimiques de l'OTA (Cole et al., 2003)

III.2.2.1.2.1.2. Propriétés physico-chimiques

L'OTA est un composé incolore et cristallin de masse molaire 403,8 g/mole. L'OTA est soluble dans les solvants organiques polaires à pH acide ou neutre ainsi que dans les solutions aqueuses alcalines, mais elle est faiblement soluble dans l'eau. Cristallisée dans le xylène, l'OTA forme des cristaux qui émettent une fluorescence verte (milieu acide) bleue (milieu alcalin) en lumière UV; ces cristaux ont un point de fusion de 169°C. Le point de fusion de l'OTA diminue à 90°C lorsqu'elle est cristallisée dans le benzène. L'OTA est un acide organique faible ayant un pKa de 7,1, présentant deux groupements ionisables : le groupement carboxyle de la phénylalanine (pKa 4,4) et le groupement hydroxyle phénolique (pKa 7,3) (Rhouati, 2013). L'OTA possède une stabilité élevée, elle est résistante à l'acidité et aux hautes températures. Ainsi, une fois contaminées, les denrées alimentaires peuvent difficilement être débarrassées de cette molécule. L'OTA peut résister pendant 3 heures à un autoclavage de 121°C, même à 250°C, sa destruction n'est pas complète (Trivedi et al, 1992).

III.2.3. Conditions de mycotoxinogénèse

La production des mycotoxines est un processus complexe qui n'est pas entièrement connu. La toxinogénèse est liée à la croissance fongique. Ainsi, les facteurs influençant la croissance fongique, influencent également la toxinogénèse. Ils ne sont cependant pas nécessairement du même ordre de grandeur que les conditions optimales de développement d'une espèce fongique donnée (**Shwab et Keller, 2008**).

Le métabolisme secondaire, activé à la fin de la croissance, produit quant à lui des substances n'ayant pas de rôle manifeste ou en tout cas pas connu dans le développement des micro-organismes. Il se diffère du métabolisme primaire par la nature aléatoire de son activation et par la diversité des composés formés et la spécificité des souches impliquées. Il n'est pas lié à la croissance cellulaire mais répond généralement à des signaux issus de l'environnement du champignon (**Yiannikouris et Jouany, 2002**).

Le potentiel de mycotoxinogénèse dépend de plusieurs facteurs environnementaux tels que la température, la disponibilité en eau, le pH, la composition gazeuse et la composition en éléments nutritifs (**Shwab et Keller, 2008**).

La combinaison température/humidité est la plus importante parmi les facteurs pouvant influencer sur la toxinogénèse. Pour une même a_w et sur un même substrat, la température permettant la production d'une mycotoxine est voisine de celle à partir de laquelle commence le développement de l'espèce fongique productrice. Par exemple, sur milieu YES, à une a_w de 0,9, *A. flavus* se développe dès 20°C, et la production d'aflatoxines se fait à partir de 25°C et est optimale à 30°C (**Gqaleni et al, 1997**).

La présence d'autres espèces fongiques peut également dégrader des mycotoxines. Une étude a montré que *A. niger* capable de convertir l'ochratoxine A en ochratoxine α sur milieu YES (**Varga et al, 2000**).

Le métabolisme secondaire des champignons est régulé par des mécanismes génétiques qui répondent à divers stimuli de l'environnement (**Shwab et Keller, 2008**). Cependant, le mode d'action de ces facteurs à l'échelle moléculaire durant la toxinogénèse n'est pas encore élucidé. Le même champignon peut produire une gamme très différente de mycotoxines sous différentes conditions (**Kostecki et al, 1999 ; Velluti et al, 2000**). Les espèces fongiques varient considérablement dans leur capacité de produire des toxines, certains champignons ne possèdent pas les gènes responsables de la mycotoxinogénèse. D'autre part, en présence de ces gènes, les mycotoxines ne sont pas nécessairement synthétisées, celles-ci demandant des conditions particulières (**Kokkonen, 2010**).

III.3. Effets des champignons et de leurs mycotoxines sur la santé humaine

Trois effets pathologiques nocifs pour la santé humaine sont reconnus comme pouvant être consécutifs à l'exposition aux champignons : les effets immunologiques, les infections fongiques et les intoxications par les mycotoxines.

Les effets immunologiques sont liés à des réactions allergiques, suite à l'exposition de protéines allergisantes pouvant activer ou aggraver les allergies. Les genres *Cladosporium*, *Alternaria*, *Penicillium*, *Aspergillus*, seraient fréquemment associés aux allergies et aggraveraient des pathologies telles que la rhinite ou l'asthme (**Bush et Prochnau, 2004 ; Frew 2004 ; Smit et al, 2011**).

Les champignons filamenteux sont essentiellement des champignons ubiquitaires naturellement peu ou non pathogènes. Ce sont des agents d'infections opportunistes qui expriment leur pouvoir pathogène dans des conditions cliniques favorables à leur installation dans l'organisme. Plusieurs pathologies ont été décrites chez l'homme. Elles touchent principalement l'appareil respiratoire, mais plus rarement aussi d'autres organes. L'aspergillose pulmonaire invasive est la principale et la plus grave des pathologies dues à ces champignons (**Paugam et al, 2010**).

Les effets liés aux mycotoxines, sont attribués à la présence de doubles liaisons C = C jouant souvent un rôle dans la toxicité et les propriétés cancérigènes des mycotoxines en formant des adduits à l'ADN (**Bennett et Klich 2003**). La diversité des structures chimiques des mycotoxines entraîne une diversité d'effets toxiques. Selon le type de mycotoxines, elles peuvent avoir des effets génotoxiques (induisant des mutations génétiques), tératogènes (provoquant un développement anormal de l'embryon), cancérigènes (induisant des cancers), immunosuppresseurs (induisant une dépression du système immunitaire), oestrogéniques (mimant les hormones). Les effets toxiques des mycotoxines sont résumés sur le Tableau 8.

Tableau 8. Toxicité de différentes mycotoxines (AFSSA, 2009)

Mycotoxines	Génotoxique	Tératogène	Cancérogène	Immuno-suppresseur	Oestro-génique
AFB1	×	×	×	×	
OTA	×		×	×	
ZEA		×			×
DON				×	
T-2, HT-2				×	
FB1	×	×		×	

III.3.1. Pouvoir cancérogène de l'aflatoxine B1

L'AFB1 est principalement transformée dans le foie en 8 métabolites : l'époxyde-AFB1, l'AFM1, l'AFB2, l'AFQ1, l'AFP1, l'aflatoxicol, l'aflatoxicol H1 et l'aflatoxicol M1 (Figure 09). L'AFB1 est la plus toxique, suivie par ordre décroissant de toxicité par l'AFM1, l'AFG1, l'AFB2 et l'AFG2 (Bilgrami et Sinha, 1992). Le foie semble être la principale cible de l'AFB1 (Richard, 2007). Elle est d'ailleurs prouvée comme responsable, en partie, du cancer du foie (Jackson et Groopman, 1999). En effet, les aflatoxines agissent comme des intercalants à l'ADN en créant des liaisons avec les bases guanines et entraînent la formation de cellules cancéreuses (Bren *et al*, 2004).

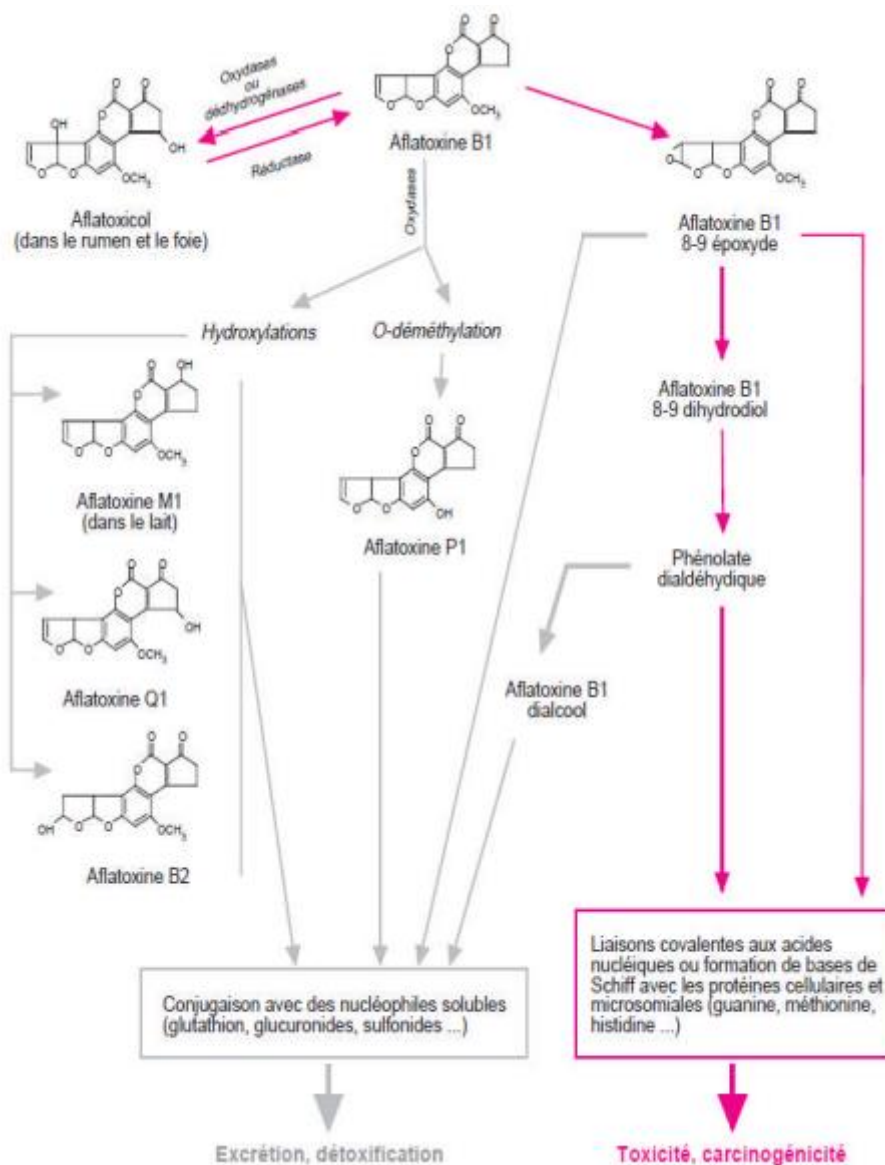


Fig 09. Métabolisme de l'aflatoxine B1 dans le foie (Yiannikouris et Jouany, 2002)

III.3.2. Métabolisation de l'ochratoxine A

L'OTA est absorbée tout d'abord au niveau de l'estomac. Elle peut également être absorbée dans l'intestin grêle où elle est hydrolysée en ochratoxine α ou OT α (non toxique) par la carboxypeptidase A et la chymotrypsine. Au niveau du foie, l'OTA est transformée en métabolites mineurs (Figure 10) qui permettent une détoxification partielle.

Chez l'homme, l'OTA est associée à la survenue d'une pathologie nommée néphropathie endémique des balkans (Mally *et al*, 2007). Cela consiste en une très forte anémie puis une insuffisance rénale.

Les ochratoxicoses chez les animaux se manifestent par des dommages rénaux, une anorexie accompagnée d'une perte de poids, des vomissements, l'apparition de conjonctivites.

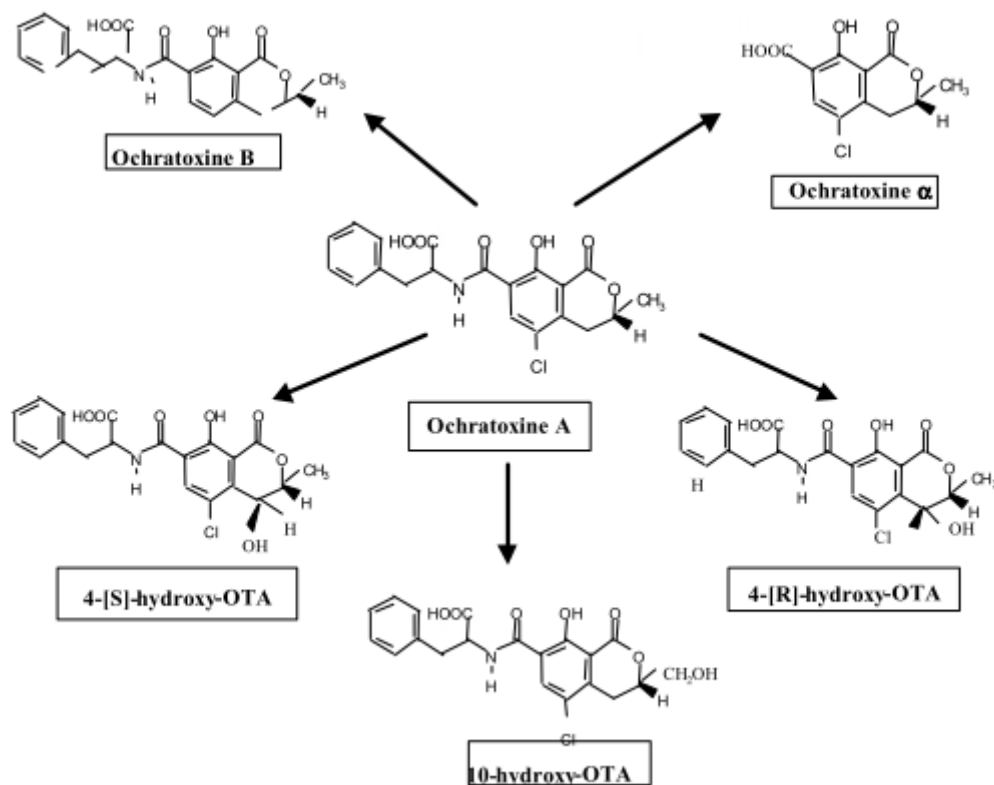
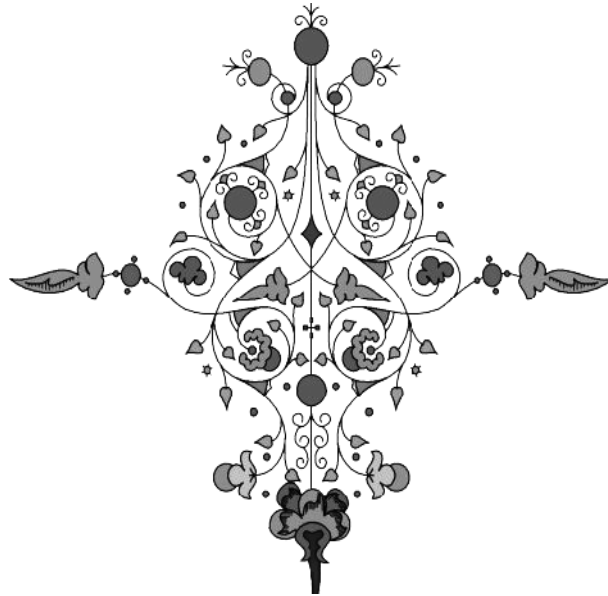


Fig 10. Métabolisme de l'OTA dans le foie (Pfohl-Leskowicz, 1999)



Matériels
Et
Méthodes



I. Choix du matériel végétal

A notre connaissance, et après plusieurs recherches infructueuses, les huiles essentielles des quatre espèces végétales : *Saccocalyx satureioides* Coss. et Dur., *Ammodaucus leucotrichus* Coss. & Dur., *Artemisia campestris* L. et *Anethum graveolens* L. récoltées dans le Sud-ouest algérien, n'ont jamais fait l'objet d'une quelconque étude antifongique.

La partie expérimentale a été réalisée au laboratoire de valorisation des ressources biologiques et sécurité alimentaire des aliments dans les zones semi arides du sud-ouest algérien (VRVSA), Université Tahri Mohamed Bechar, pendant dans la période allant de Janvier 2011 à Juin 2015. La composition chimique des huiles essentielles a été effectuée au Institut National de Recherche et d'Analyse Physico-chimique (INRAP) à Tunis.

II. Protocole expérimental

II.1. Récolte du matériel végétal et séchage

Les parties aériennes (tiges, feuilles, fleurs et graines) de chaque plante ont été collectées au cours de la période de floraison, de façon aléatoire aux alentours de quatre stations de Sud-ouest algérien. Les situations géographiques de ces stations figurent dans la photo 05. L'origine, la date de prélèvement et les organes végétaux destinés pour l'extraction pour chaque plante sont résumées sur le Tableau 09.

Après séchage dans un endroit sec et à l'abri des rayons solaires, les parties utilisées ont été coupées en petits morceaux et récupérées dans des sacs propres et pesées.

L'identification des espèces végétales est réalisé au niveau de laboratoire pédagogique de botanique dans l'institut de biologie, Université Tahri Mohamed Bechar.

Tableau 09. Origine, date des prélèvements et parties utilisées des plantes

Plante	Origine	Dates de prélèvements	Parties utilisées
<i>Saccocalyx satureioides</i> Coss. et Dur.	Mecheria région de Naâma	Mars (2011)	Feuilles, tiges et fleurs
<i>Artemisia campestris</i> L.	Beni Abbès région de Bechar	Avril (2012)	Feuilles, tiges et fleurs
<i>Ammodaucus leucotrichus</i> Coss. & Dur.	région de Abadla Bechar	Avril (2013)	Graines
<i>Anethum graveolens</i> L.	Igli région de Bechar	Mars (2013)	Graines

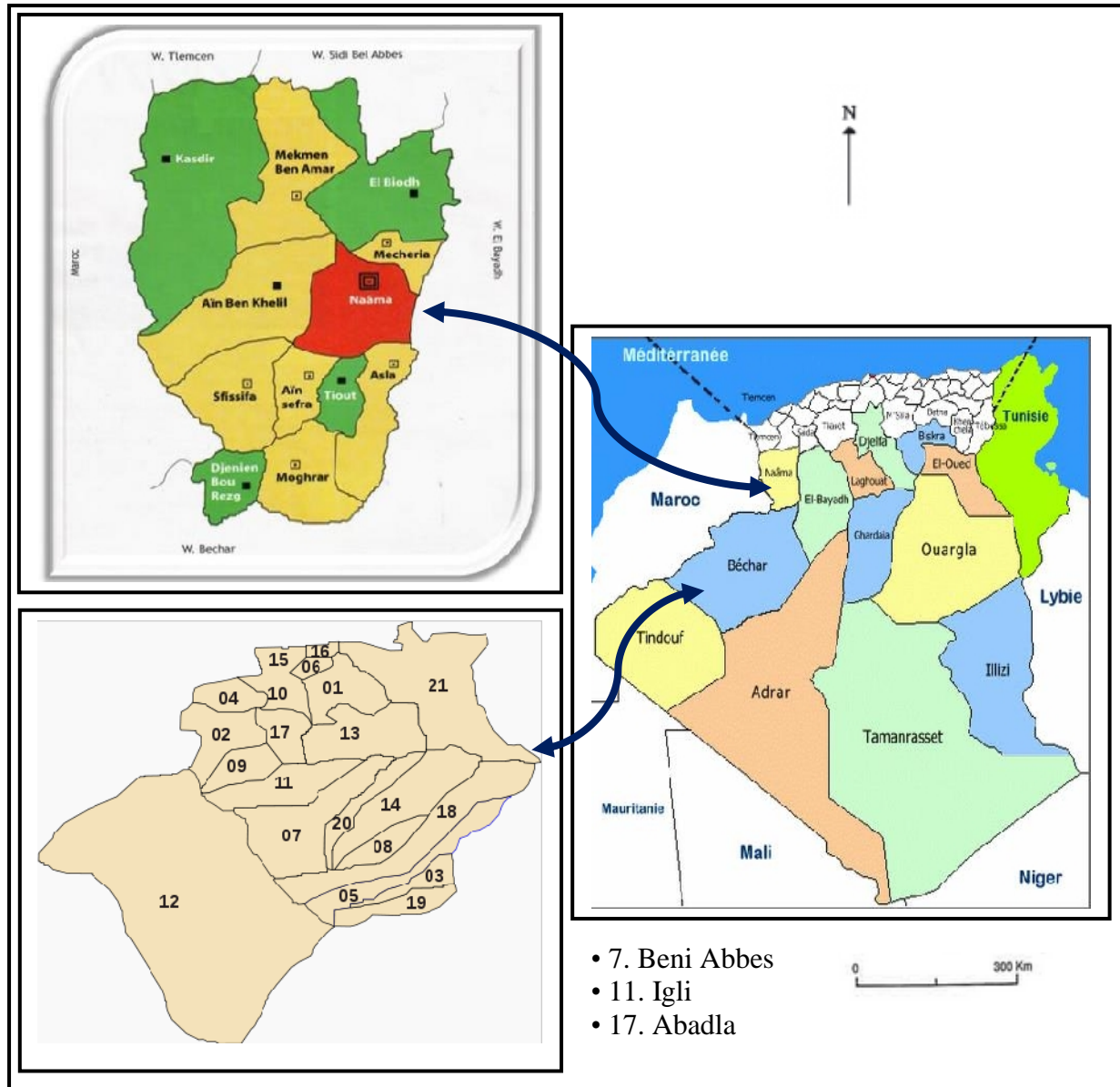


Figure 11. Cartes géographiques des zones de prélèvement

II.2. Extraction de l'huile essentielle

L'extraction des huiles essentielles a été effectuée par hydrodistillation dans un appareil de type Clevenger (Annexe II) (**Clevenger, 1928**). Trois distillations ont été réalisées par ébullition pendant une heure trente de 200 g de matériel végétal sec avec 1 litre d'eau dans un ballon de 2 litres surmonté d'une colonne de 60 cm de longueur reliée à un réfrigérant. L'huile essentielle obtenue est séchée sur du sulfate de sodium anhydre et est conservée à une température de 4°C (**Bouzouita et al, 2008**). Avant la réalisation des analyses CG et CG/SM, l'huile a été diluée dans du méthanol (1%, v/v).

Le rendement en huile essentielle (R%) est défini comme étant le rapport entre la masse de la matière végétale sèche et la masse de l'extrait obtenue (**Bourkhiss *et al*, 2009**).

$R\% = (M_1 / M_0) \times 100$. Dont, M_0 étant la masse en gramme de la matière végétale sèche et M_1 la masse en gramme d'huile essentielle.

II.3. Analyses physicochimiques

La connaissance d'indices physiques et chimiques est importante puisqu'elle permet de caractériser voire d'identifier une huile essentielle.

II.3.1. Indices physiques

La densité spécifique à 20 °C (NFT-75 111), l'indice de réfraction à 20 °C (NFT-75 112), le pouvoir rotatoire (NFT-75 113), la miscibilité à l'éthanol (NFT-75 101) ainsi que le point de congélation (NFT-75 102) sont déterminés par les méthodes conformes aux normes **A.F.N.O.R (2000)**.

II.3.1.1. Point de congélation (NFT-75 102, 2000)

Le point de congélation d'une huile essentielle est la température constante ou maximale observée pendant la phase de libération de la chaleur latente de solidification, lorsque cette huile essentielle à l'état liquide est refroidie suivant la méthode décrite.

Les huiles essentielles sont placées dans des tubes à essai, à l'intérieur d'un congélateur, accompagnées d'un thermomètre.

II.3.1.2. La densité (NFT-75 111, 2000)

C'est le rapport de la masse d'un certain volume de l'huile à 20°C et la masse d'un égal volume de l'eau distillée à 20°C.

A l'aide d'un pycnomètre, peser successivement un même volume d'eau distillée et d'huile essentielle (HE). Peser le pycnomètre vide. Entre chaque pycnomètre, le pycnomètre doit être soigneusement nettoyé avec de l'eau et de l'acétone et séché. Mesurer la température de l'huile essentielle.

La Densité relative est donnée par la formule suivante :

$$D_{20}^{20} = \frac{m_2 - m_0}{m_1 - m_0}$$

m_0 : est la masse en gramme du pycnomètre vide.

m_1 : est la masse en gramme du pycnomètre rempli d'eau.

m_2 : est la masse en gramme du pycnomètre rempli d'huile essentielle.

II.3.1.3. Indice de réfraction (NFT-75 112, 2000)

L'indice de réfraction d'une huile essentielle est le rapport entre le sinus de l'angle de réfraction d'un rayon lumineux de longueur d'onde déterminée passant de l'air dans l'huile essentielle maintenue à une température constante.

Quelques gouttes d'huile essentielle sont déposées dans l'appareil et la lecture de l'indice se fait comme suit :

- On règle le réfractomètre d'une manière à obtenir une moitié supérieure claire et une autre moitié inférieure sombre et ce au niveau du cadran.
- L'appareil utilisé est de type paralux optique de précision 68600 (lustiner France).

L'indice de réfraction n_d^t à la température de référence t , est donné par la formule :

$$n_d^t = n + 0,0004 (t' - t)$$

n : est la valeur de la lecture, obtenue à la température t' , à laquelle a été effectuée la détermination.

II.3.1.4. Pouvoir rotatoire (NFT-75 113, 2000)

Le pouvoir rotatoire d'une huile essentielle c'est l'angle, exprimé en milliradian et/ou degrés d'angle, dont tourne le plan de polarisation d'une radiation lumineuse de longueur d'onde $589.3 \text{ nm} \pm 0.3 \text{ nm}$, correspondant aux raies D du sodium, lorsque celle-ci traverse une épaisseur de 100mm de l'huile essentielle dans des conditions déterminées de température. Si le mesurage est effectué sur une épaisseur différente, la valeur de α_t^d doit être ramenée, par le calcul, à une épaisseur de 100 mm.

Remplir le tube avec l'échantillon pour essai, en assurant qu'il ne reste aucune bulle d'air interposée. Placer le tube dans le polarimètre et lire l'angle de rotation dextrogyre (+) ou lévogyre (-) de l'échantillon pour essai sur l'échelle de l'appareille.

Le pouvoir rotatoire, exprimé en milliradians et/ou degrés d'angle, est donné par la formule :

$$\alpha_t^d = \alpha_{L.C}$$

α : est la valeur de l'angle de rotation, exprimée en milliradian et/ou degrés d'angle.

L : est la longueur du tube utilisé exprimée en millimètre.

C : concentration de l'essence (g/100 ml)

II.3.1.5. Miscibilité a l'éthanol (NFT-75 101, 2000)

Une huile essentielle est dite miscible à volume d'éthanol à 95% à 20 °C, lorsque le mélange d'un volume de l'huile essentielle avec (V) volume d'éthanol à 95% donne une solution homogène.

- Introduire dans la fiole ou le tube à essai 1ml d'huile essentielle,
- Ajouter à l'aide de la burette, le mélange hydro-éthanolique de titre alcoolométrique déterminer 95% par fraction de 0.1ml jusqu'à miscibilité complète, en agitant énergiquement après chaque addition. Lorsque le mélange est parfaitement limpide, noter le volume du mélange hydro-éthanolique utilisé.

II.3.2. Indices chimiques

Les méthodes utilisées pour la détermination des indices d'acide (NFT-75 103) et d'ester (NFT-75 104) sont également conformes aux normes **A.F.N.O.R (2000)**.

II.3.2.1. Indice d'acide (NFT-75 103, 2000)

L'indice d'acide (IA) est le nombre de milligrammes d'hydroxyde de potassium (KOH) nécessaire à la neutralisation des acides libres contenus dans un gramme d'huile essentielle.

- Peser 1g d'huile essentielle dans un tube en verre.
- Ajouter 5ml d'éthanol à 95% et 5 gouttes de la solution de phénolphaléine (2 N).
- Neutraliser le liquide avec la solution d'hydroxyde de potassium (0,1 N), jusqu' à l'obtention d'une coloration rose qui ne persiste que quelques minutes avant de reprendre sa couleur initiale (jaune).
- Noter le volume de la solution éthanolique de KOH ajoutée.

L'indice d'acide est donné par la formule :

$$IA = 5.61 \times V/m$$

V : volume en millilitres de la solution d'hydroxyde de potassium.

m : masse en gramme de l'HE.

II.3.2.2. Indice d'ester (NFT-75 104, 2000)

L'indice d'ester (IE) est le nombre de milligrammes d'hydroxyde de potassium nécessaire à la neutralisation des acides libérés par l'hydrolyse des esters contenus dans 1g d'huile essentielle.

- On pèse 1g d'HE, et on l'introduit dans un ballon en verre.
- On ajoute grâce à une burette 25ml de la solution éthanolique de KOH (0,5N).
- On adapte le réfrigérant et on place le ballon sur la chauffe ballon et on laisse chauffer pendant une heure à partir de l'ébullition.
- On laisse refroidir puis on ajoute 20ml d'eau distillée et 5gouttes de phénolphtaléine (0.2%).
- Enfin, on titre l'excès de KOH avec la solution d'acide chlorhydrique (0,5 N).
- Parallèlement à l'opération citée, on effectue un essai à blanc dans les mêmes conditions et avec les mêmes réactifs.

Le calcul IE est donné par la formule :

$$IE = 28,05 / m \times (V_0 - V_1) - IA$$

V_0 : est le volume en millilitre de la solution d'acide chlorhydrique utilisé pour la prise d'essai à blanc.

V_1 : est le volume en millilitre de la solution d'acide chlorhydrique utilisé pour la détermination.

m : masse en gramme de la prise d'essai.

IA : est la valeur de l'indice d'acide.

- **Remarque** : Toutes les analyses ont été répétées trois fois et toutes les solutions étaient étalonnées avant analyse.

II.4. Analyse chromatographique

Les analyses chromatographiques ont été effectuées sur un chromatographe en phase gazeuse à régulation électronique de pression de type Hewlett Packard (série HP 6890) (Annexe II), équipé d'une colonne capillaire en silice fondue de type DB-5 de 30 m de longueur, 0,25 mm de diamètre et 0,25 μ m d'épaisseur de film, d'un détecteur FID réglé à 260 °C et alimenté par un mélange de gaz H₂/Air et un injecteur split-splitless réglé à 240 °C. Le mode d'injection est split (rapport de fuite : 1/50, débit : 66 ml/min). Le gaz utilisé est l'azote avec un débit de 1,7 ml/min. La température de la colonne est programmée de 60 à 325 °C à raison de 4 °C/min. L'appareil est piloté par un système informatique de type « HP ChemStation », gérant le fonctionnement de l'appareil et permettant de suivre l'évolution des analyses chromatographiques. Le volume injecté est 1 μ l.

L'identification des constituants a été réalisée en se fondant sur leurs indices de Kováts (IK) et sur la chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CG/SM) par comparaison avec les données de la littérature (Adams, 2007). Cette dernière a été réalisée sur un chromatographe en phase gazeuse de type Hewlett-Packard (série HP 6890) couplé avec un spectromètre de masse (série HP 5973). La fragmentation a été effectuée par impact électronique sous un champ de 70eV. La colonne utilisée est une colonne capillaire en silice fondue de type DB-5 de 30 m de longueur, 0,25 mm de diamètre et 0,25 µm d'épaisseur de film. La température de la colonne est programmée de 60 à 325°C à raison de 4°C/min. Le gaz vecteur est l'hélium dont le débit est fixé à 2 ml/min. le mode d'injection est split (rapport de fuite : 1/70 débit 112 ml/min). L'appareil est relié à un système informatique gérant une bibliothèque de spectre de masse NIST 98.

II.5. Étude du pouvoir antifongique

II.5.1. Les souches fongiques testées

Sept champignons ont été choisis pour leurs fréquences élevées à contaminer les denrées alimentaires et pour leurs pathogénicités. Elles appartiennent à la collection de la mycothèque de section mycologie du Laboratoire VRVSA. Elles sont cultivées sur le milieu nutritif PDA (*potato dextrose agar*) pendant sept jours à 25°C à l'obscurité. L'origine et la provenance des souches sont indiquées dans le Tableau 10.

Pour éviter la contamination bactérienne, le milieu PDA est acidifié jusqu'à un PH 4,5 ou 5 on ajoutant 1ml d'acide lactique à 25% par flacon de milieu.

Tableau 10. Les souches fongiques utilisées dans l'étude.

Souche	Laboratoire	Origine
<i>Aspergillus niger</i>	VRVSA	Datte
<i>Aspergillus flavus</i>	VRVSA	Blé dur
<i>Aspergillus ochraceus</i>	VRVSA	Café
<i>Penicillium expansum</i>	VRVSA	Café
<i>Fusarium oxysporum f.sp. albedinis</i>	VRVSA	Palmier dattier Beni abbès (Toumliha)
<i>Alternaria alternata</i>	VRVSA	Son de blé tendre
<i>Cladosporium species</i>	VRVSA	Son de blé tendre

II.5.1.1. Identification et confirmation des souches fongiques

L'identification des moisissures fait essentiellement appel aux caractères cultureux, la morphologie et à la sporulation (Botton *et al.*, 1990).

- **Caractères cultureux :** Ce sont les critères macroscopiques tels, vitesse de croissance, texture et couleur du thalle, couleur du revers de la culture, odeur exsudat et présence d'un pigment diffusible.
- **Caractères morphologiques :** C'est l'étude microscopique du mycélium, nature des organes différenciés et l'étude biométrique.

II.5.1.1.1. Identification des genres

➤ Technique De Micro culture

Décrite par **Haris (1989)** Cette technique consiste à inoculer les spores des moisissures sur des lames menées de petits carrés de PDAA solidifiés et les recouvrir par des lamelles. Les spores sontensemencées sur les limites périphériques du milieu pour leur fournir un potentiel d'oxygène élevé afin qu'elles puissent germer. L'ensemble est conditionné dans une chambre stérile et humide puis incubée à $25 \pm 2^\circ\text{C}$ pendant 3 à 5 jours.

Après incubation, les lamelles aux quelles s'adhèrent le mycélium sont, transférées sur d'autres lames stériles contenant quelques gouttes de lactophénol pour l'observation microscopique aux grossissements $\times 10$, $\times 40$, $\times 100$. Les genres sont déterminés par les caractères cultureux et microscopiques en se référant au manuel de **Barnett (1972)**.

II.5.1.1.2. Identification des espèces d'*Aspergillus* et *Penicillium*

L'identification des espèces d'*Aspergillus* et *Penicillium* est réalisée par la méthode de **Pitt (1973)** et **Ramirez (1982)**.

Cette méthode est dite « **Single Spore** », basée sur la relation entre l' a_w du milieu de culture et la température d'incubation. Elle consiste à l'inoculation de quelques spores d'une culture jeune dans des tubes à hémolyse contenant une suspension semi solide à base de 0,2% d'Agar et 2 gouttes de Tween 80, l'ensemble est agité puisensemencés sur des milieux différents.

Les cultures pour l'identification ont été réalisées sur quatre milieux différents qui sont :

- Czapek Doxtrose Agar (**CDA**) à 25°C ,
- Malt Extract Agar (**MEA**) à 25°C ,
- Glycérol Nitrate Agar (**G25N**) à 25°C ,
- Czapek Yeast Agar (**CYA**) à deux températures différentes: 5°C et 37°C .

Leurs compositions sont données dans l'annexe I et sont inoculés comme la montre la figure suivante:

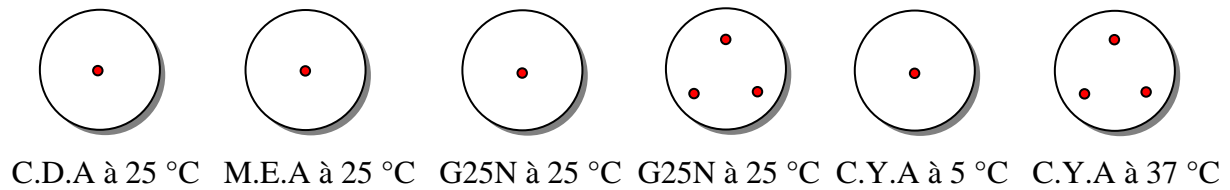


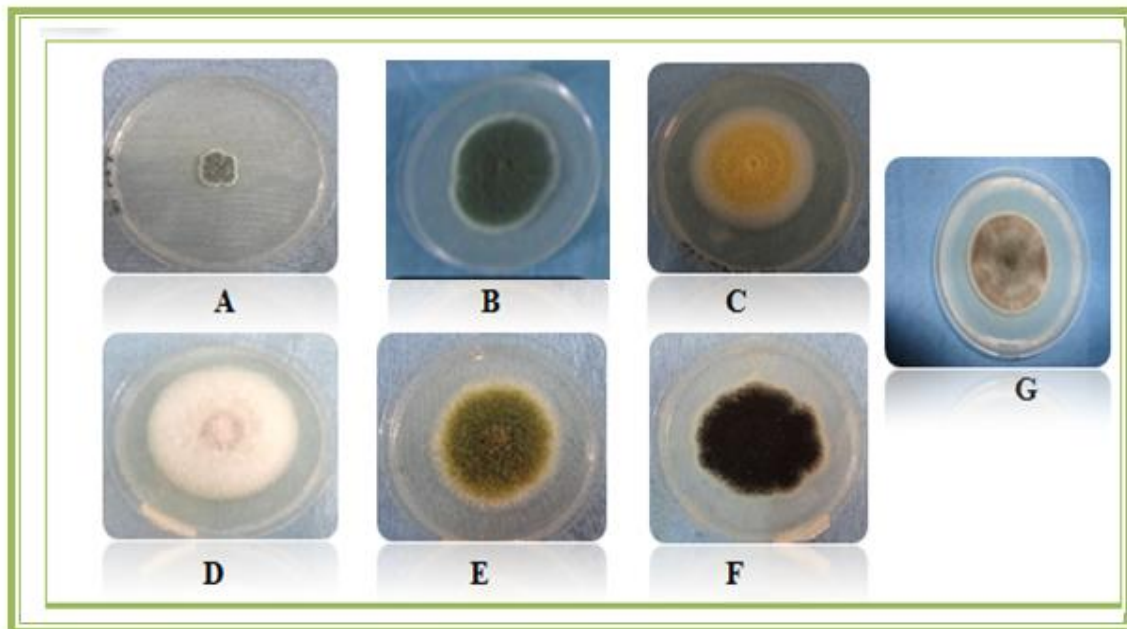
Fig 12. Type d'inoculation des différents isolats d'*Aspergillus* et *Penicillium*

- Le **CDA** (milieu minéral, a_w élevée) et le **G25N** (milieu à base de glycérol, a_w faible) donnent une vitesse de croissance variant en fonction de l' a_w à une température constante 25°C.
- Le **CYA** donnant une croissance variant selon l' a_w à des T° variables 5°C et 37°C.
- Le **MEA** nous informe sur la couleur du thalle à 25°C.

L'agar **AFPA** (*Aspergillus flavus* et *parasiticus* Agar) est utilisé pour identifier les *Aspergillus flavus*. Dans ce milieu, ces souches produisent une couleur jaune orangé apparente à l'envers de la colonie (**Pitt et al., 1994**).

➤ Examen des cultures

La lecture se fait après 7 et 14 jours en se référant aux clefs d'identification de **Pitt (1973)** et **Ramirez (1982)**.



A: *Cladosporium* sp; **B:** *Penicillium expansum*; **C:** *Aspergillus ochraceus*; **D:** *Fusarium oxysporum* f.sp. *albedinis*; **E:** *Aspergillus flavus*; **F:** *Aspergillus niger*; **G:** *Alternaria alternata*.

Fig 13. Souches cultivées par méthode «*Single Spore*» sur milieu PDA à 25°C/7 jours.

II.5.2. Procédure microbiologique

Toutes les expériences ont été réalisées en triple et les résultats sont exprimés en moyenne \pm d'écart-type. L'analyse statistique a été réalisée en utilisant SPSS 11.0 Bivariate Correlation Analysis (SPSS Inc., Chicago, IL, USA.). Une différence significative a été considérée au niveau de $P < 0.05$ and $P < 0.01$. Le test de corrélation de Pearson rank a été utilisé pour les comparaisons entre la dilution de bouillon et les différentes techniques utilisées pour déterminer l'effet antifongique.

II.5.2.1. Évaluation de la croissance radiale sur milieu solide

II.5.2.1.1. Préparation des suspensions sporales

Dans des tubes à hémolyse on met une solution qui contient l'eau distillée stérile, 0.2% d'agar et quelques gouttes de Tween 80. On place les spores récupérées d'une culture pure de 7 jours à l'aide d'une anse de platine pour une meilleure dispersion de ces dernières. L'agitation et l'homogénéisation se fait manuellement.

II.5.2.1.2. Techniques d'activité antifongique des huiles essentielles

Les concentrations minimales inhibitrices (CMI) des huiles essentielles ont été déterminées selon la méthode de contact direct. Du fait de la non-miscibilité de l'huile essentielle à l'eau et donc au milieu de culture, une mise en émulsion a été réalisée grâce à une solution d'agar à 0,2%. Elle permet d'obtenir dans le milieu une répartition homogène des huiles essentielles et d'augmenter au maximum le contact germe/composé (**Amarti et al, 2010**). Des dilutions sont préparées au 1/10e, 1/15e, 1/37e, 1/150e et 1/750e dans cette solution d'agar. Dans des tubes à essais contenant chacun 13,5 ml de milieu solide de PDA, stérilisés à l'autoclave pendant 20 min à 121 °C et refroidis à 45 °C, on ajoute aseptiquement 1,5 ml de chacune des dilutions de façon à obtenir les concentrations finales de 1/100, 1/150, 1/370, 1/1500 et 1/7500 (V/V). On agite convenablement les tubes afin de bien disperser l'essence dans le milieu culture avant de les verser dans les boîtes de Pétri. Des témoins, contenant le milieu de culture et la solution d'agar à 0,2% seule, sont également préparés. L'ensemencement se fait par la méthode de single spore à l'aide d'une anse de platine calibrée afin de prélever le même volume d'inoculum. Ce dernier se présente sous forme d'une suspension dans l'eau physiologique de spores provenant d'une culture de sept jours dans le PDA. Après incubation à 25°C pendant 7 jours en tenant compte de la croissance de témoin (**Amarti et al, 2008**).

L'indice antifongique (P_I) est calculé par la formule suivante (Singh *et al.*, 2009) :

$$P_I = [(DT - D) / DT] \times 100 \%$$

D étant le diamètre de la zone de croissance de l'essai et DT le diamètre de la zone de croissance du témoin.

Pour les boîtes qui ne présentent pas de croissance le disque mycélium est transféré sur un milieu PDA neuf pour confirmer s'il s'agit d'un effet fongistatique ou fongicide (F)

II.5.2.2. Évaluation de la sporulation

A partir des colonies âgées 10 jours de chaque souches à différentes concentration on prend quatre rondelles de 5mm de diamètre dans un 1ml d'eau distillée stérile. La suspension fongique est ensuite agitée à l'aide d'un vortex afin de libérer les spores des conidiophores.

On compte le nombre total des spores à l'aide d'une cellule de Malassez (Annexe II) à raison de 10 comptages par suspension. Les valeurs sont exprimées en nombre des spores par unité de surface (mm^2) (Serghat *et al.*, 2004).

Le pourcentage d'inhibition de la sporulation I_S est déterminé par la formule suivante :

$$I_S = [(N_0 - N_c) / N_0] \times 100 \%$$

N_0 étant le nombre moyen des spores estimé chez le témoin et N_c le nombre moyen des spores estimé en présence d'huile essentielle.

II.5.2.3. Évaluation de la germination

La suspension sporale récoltée est ajustée à 10^5 spores/ml d'eau distillée à l'aide d'une cellule de Malassez. On étale 0.1 ml de la suspension sporale sur des boîtes pétri contenant un milieu PDA auquel on incorpore les huiles aux mêmes concentrations que précédemment à raison de trois répétitions réalisées simultanément par concentration. Le comptage des spores germées ou non a été effectuée sur un total de 200 spores après 18 heures d'incubation à 25°C et à l'obscurité. Une spore est considéré germée si la longueur du tube germinatif est supérieure à son plus petit diamètre (Maouni *et al.* 2001).

Le pourcentage d'inhibition de la germination des spores I_g est déterminé selon la formule suivante :

$$I_g = (N_0 - N_c) / N_0 \times 100\%$$

N_0 étant le nombre moyen de spores ayant germé chez le témoin et N_c le nombre moyen de spores germées en présence d'une concentration (c) d'huile essentielle.

II.5.2.4. Activité antimycotoxinogène

Suivant la méthode décrite par **Multon** en **1982**, l'étude de l'effet antimycotoxinogène des huiles essentielles a été testée contre deux espèces *Aspergillus* sur le milieu YES (Yeast Extract Agar) afin de pouvoir extraire les mycotoxines produites.

II.5.2.4.1. Recherche des souches productrices d'aflatoxines et ochratoxines

Quatre souches fongiques toxigènes ont été choisies pour leurs pathogénicités et leurs implications fréquentes dans la contamination des denrées alimentaires, les souches fongiques testées sont des souches productrices des aflatoxines de l'espèce *Aspergillus flavus* (trois souches) et des ochratoxines de l'espèce *Aspergillus ochraceus* (une seule souche).

Ces souches produisent une couleur jaune orangé apparente à l'envers de la colonie sur le milieu agar AFPA. Les quatre souches sont cultivées sur milieu PDAA pendant 7 jours à $25 \pm 2^\circ\text{C}$ et sont soumises aux analyses mycotoxicologiques. Après incubation on prépare la suspension sporale.

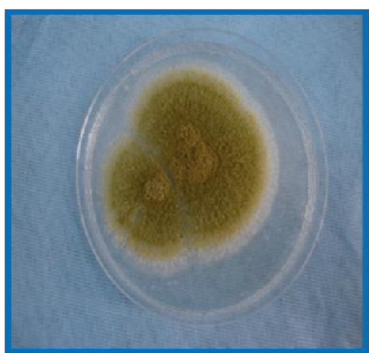


Photo 05. *Aspergillus flavus* par méthode « *Single Spore* » sur milieu PDA à 25°C

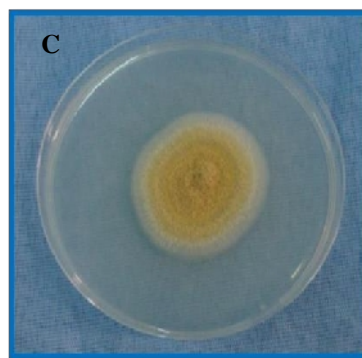


Photo 06. *Aspergillus ochraceus* par méthode « *Single Spore* » sur milieu PDA à 25°C

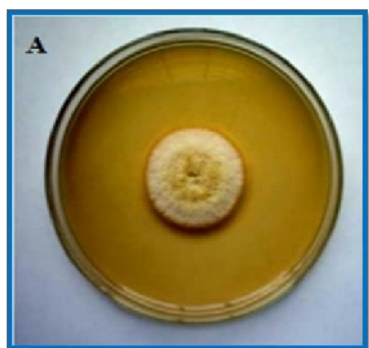


Photo 07. *Aspergillus flavus* sur milieu **AFAP** à 25°C

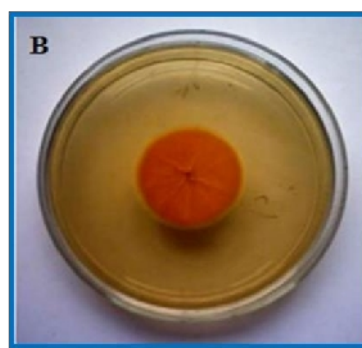


Photo 08. Face revers d'*Aspergillus flavus parasiticus* sur milieu **AFAP** à 25°C

II.5.2.4.2. Ensemencement sur milieu YES

Du fait du non miscibilité de l'huile essentielle à l'eau et donc aux milieux de culture, une mise en émulsion a été réalisée grâce à une solution d'agar à 0,2 % afin de favoriser le contact germe/composé. Des dilutions sont préparées au 1/10^e, 1/15^e, 1/37^e, 1/150^e et 1/750^e dans cette solution d'agar. Dans des flacons contenant 45 ml de milieu YES, stérilisés à l'autoclave (20 minutes à 121°C) et refroidis à 45°C, avec quelques gouttes de l'acide lactiques, on ajoute 5ml de chacune des dilutions de façon à obtenir les concentrations finales de 1/100, 1/150, 1/370, 1/1500 et 1/7500 (V/V). Des témoins, contenant le milieu YES plus la solution d'agar à 0,2 % seule, sont également préparés.

Ensuite, on ajoute 0,1 ml de l'inoculum des souches *Aspergillus flavus* et *Aspergillus ochraceus* dont la suspension sporale récoltée à partir d'une culture de 7 jours est ajustée à 10⁵ spores /ml d'eau distillé à l'aide de cellule de Malassez. L'incubation se fait à 25 ± 2°C pendant 14 jours (Davis *et al*, 1966).

Après filtration du milieu par du papier filtre on obtient des biomasses, ces derniers sont séchées dans l'étuve à 65°C pendant 5h et après séchage on prend les poids des marcs (Dhandhukia et Thakkar, 2007).

Le poids de la biomasse est déterminé selon la formule suivante (Imtiaj et Lee, 2007) :

$$P = P_1 - P_0$$

P_0 étant le poids du papier filtre et P_1 le poids du papier filtre et la biomasse des champignons après le séchage.

Les milieux récupérés par la filtration sont utilisés pour l'analyse chromatographique des mycotoxines.

Le pourcentage d'inhibition de la biomasse I_b est déterminé par la formule suivante :

$$I_b = [(C - P) / C] \times 100 \%$$

C étant la biomasse formée chez le témoin et P la biomasse formée en présence d'huile essentielle.

II.5.2.4.3. Analyse chromatographique par CCM

II.5.2.4.3.1. Extraction des aflatoxines et ochratoxines

Après 14 jours d'incubation, on se débarrasse de la biomasse formée en filtrant le milieu YES à travers du papier filtre, 50ml du filtrat obtenu sont additionnés à 180 ml de chloroforme (Nagy et Loutfy, 2002) selon le protocole ci-dessous (Fig 14). L'ensemble

vigoureusement agité pendant 30 minutes, on laisse le mélange décomter en utilisant une ampoule à décomter.

Les trois phases chloroformique ainsi obtenues sont mélangées et filtrées sur du papier filtre plissé en ajoutant sodium sulfate anhydres a pour but d'absorber les bulles d'air, puis concentrées par évaporation sous vide à l'aide d'un rotavapor jusqu'à un volume de 2 à 3 ml. Ce filtrat est conservé dans des tubes à hémolyse bien fermés (**Frayssinet et Cahagnier, 1982**).

II.5.2.4.3.2. Séparation chromatographique

La chromatographie sur couche mince constitue la méthode de base. Elle permet une séparation efficace des produits, leur identification et leur quantification avec une bonne précision (**Frayssinet et Cahagnier, 1982**).

Elle se fait sur une plaque de sélicagel sur laquelle il déposé un spot de 10 µl de chaque extrait à analyser et 5 µl de chaque solution standard d'aflatoxine et d'ochratoxine. La plaque est ensuite placée dans une cuve chromatographique et trempée dans un solvant d'élution (Chloroforme – Acétone V=1ml/V=1ml) pendant 1 à 2 heures.

Après migration et évaporation des éluants à sec à l'aide d'un évaporateur rotatif, la plaque est examinée sous UV à 365 nm (**Nagy et Loutfy, 2002**). La présence d'aflatoxines se traduit par des fluorescences caractéristiques bleue pour AFB1 et verte pour l'ochratoxine A.

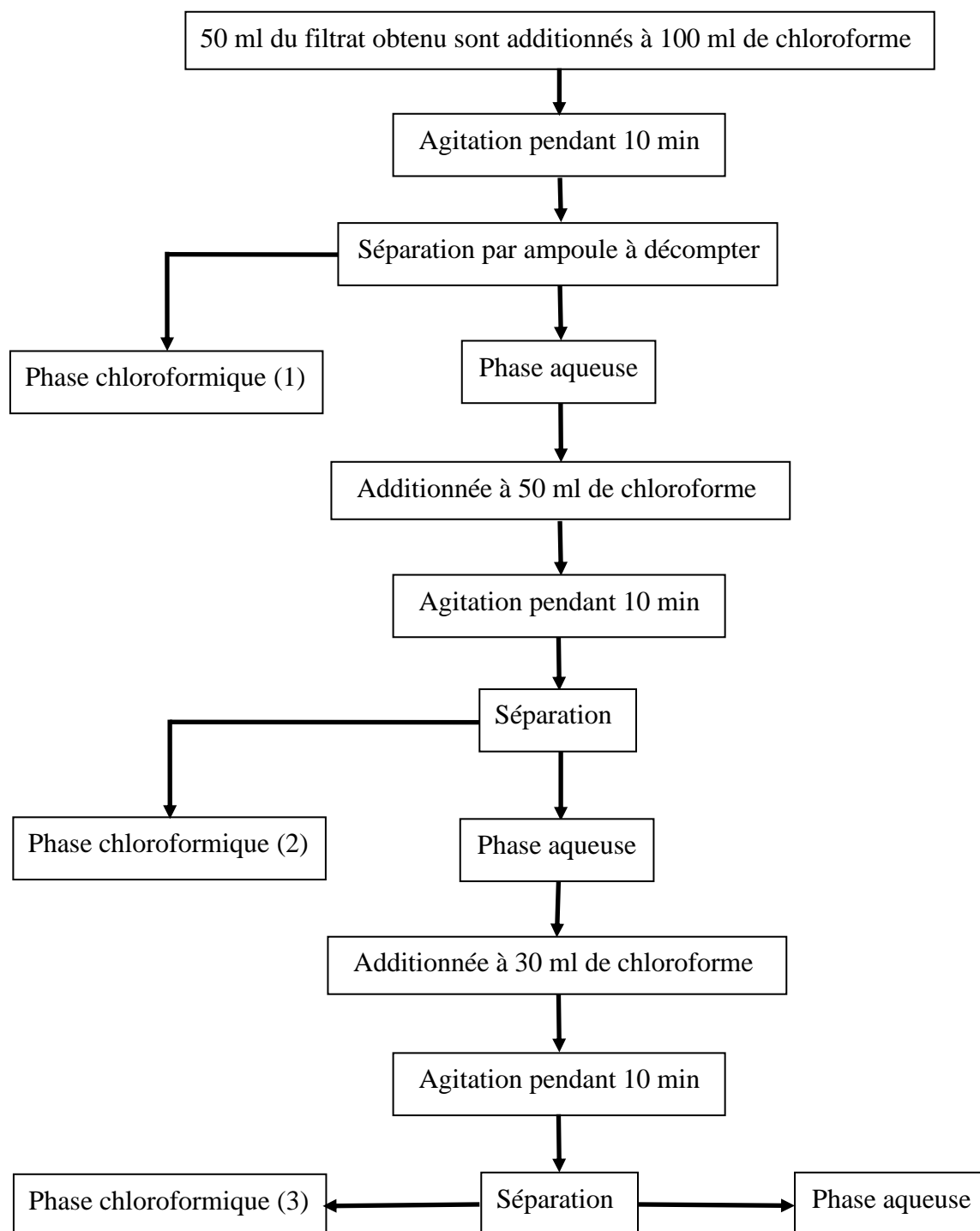
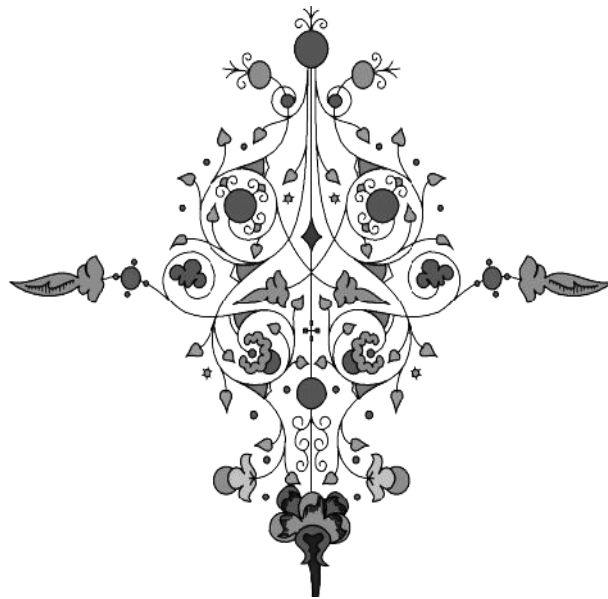


Fig 14. Méthode d'extraction d'aflatoxine et ochratoxines (Frayssinet *et* Cahagnier, 1982)



Résultats
Et
Discussion



I. Caractères organoleptiques

Selon **Afnor (2000)** les huiles essentielles sont habituellement liquides à température ambiante et volatiles, ce qui les différencie des huiles dites fixes. Elles sont plus ou moins colorées et leur densité est en général inférieure à celle de l'eau.

A l'issue des distillations, l'huile essentielle obtenue de *Saccocalyx satureioides* Coss. et Dur. a un aspect liquide limpide de couleur jaune, dégage une forte odeur phénolique aromatique caractéristique.

L'HE d'*Artemisia campestris* L. a un aspect liquide de couleur jaune pâle, odeur forte et saveur piquante.

L'HE des graines d'*Ammodaucus leucotrichus* Coss. & Dur. est très aromatique. Elle est liquide de couleur bleu vert foncé, avec une odeur forte pénétrante et saveur piquante épicée.

L'HE des graines d'*Anethum graveolens* L. est liquide mobile, de couleur jaune clair et odeur épicée (anisé).



Photo 9. H.E de *Saccocalyx satureioides* Coss. et Dur.



Photo 10. H.E d'*Artemisia campestris* L.



Photo 11. H.E d'*Ammodaucus leucotrichus* Coss. & Dur.



Photo 12. H.E d'*Anethum graveolens* L.

II. Rendement en huile essentielle

Les rendements moyens en huiles essentielles ont été calculés en fonction de la matière végétale sèche de la partie aérienne de la plante. Les échantillons de *Saccocalyx satureioides* Coss. et Dur., *Ammodaucus leucotrichus* Coss. & Dur. et *Anethum graveolens* L. ont fourni un bon rendement en huile essentielle, environs 2,41%, 2,15% et 2,10% respectivement, plus élevés que celui obtenu à partir d'*Artemisia campestris* L. et qui est de 0,37% (figure 14).

Le taux de notre huile essentielle de *Saccocalyx satureioides* Coss. et Dur. est relativement plus élevé que celui obtenu à partir d'El Masrane, région de Djelfa (Centre de L'Algérie) qui est de 1,5% (**Zerroug et al, 2011**) et plus faible par rapport à celui de M'Sila (Nord central de l'Algérie) (3,5%) (**Biondi et al, 2006**), et ce qui est obtenu par **Gourine et al (2012)** (3,3%).

Pour l'essence d'*Ammodaucus leucotrichus* Coss. & Dur., le taux est relativement plus faible que celui obtenu à partir de la région de Dakhla au Sahara occidental (Nord-Ouest de l'Afrique) qui est 2,76% (**Velasco-Negueruela et al, 2006**) et à celle de la région de Guerrara (Ghardaia) (**Abu Zarga et al, 2013**) (3,0%).

Le rendement en huile obtenue à partir des graines d'*Anethum graveolens* L., est élevé comparé à ceux de l'île de La Réunion (0,8%) (**Vera et Chane-Ming, 1998**) et de la Turquie (0,23%) (**Orhan et al, 2013**). Cependant, ce taux est inférieur à ceux de la Chine (3,5%) (**Tian et al, 2011**) et d'Ouzbékistan (4,2%) (**Yili et al, 2009**).

Enfin, le taux de l'essence obtenue à partir des parties aériennes d'*Artemisia campestris* L. est proche à de Boussaada (sud-est de L'Algérie) (0,66%) (**Belhattab et al, 2011**), mais il est relativement élevé comparé à celle rapporté par **Dob et al. (2005)** (0,1%) et de la Serbie (0,2%) (**Chalchat et al, 2003**). Cependant, il est relativement inférieur à de Khenchela (Est de L'Algérie) (1,0%) (**Ghorab et al, 2013**) et de la Tunisie (1,20%) (**Akrout et al, 2010**). Les variations des rendements peuvent être attribuées non seulement à l'origine géographique de la plante, mais également aux nombreux facteurs comme : stade de croissance, conditions pédoclimatiques, lieu de production, l'état de fraîcheur du végétal, etc. (**Garnero, 1996 ; Bruneton, 1999 ; Satrani et al, 2007**). Plusieurs études ont montré, l'influence de cycle végétatif et la technique d'extraction sur le rendement et la qualité de l'huile essentielle (**Fellah et al, 2006 ; Bendahou et al, 2008**).

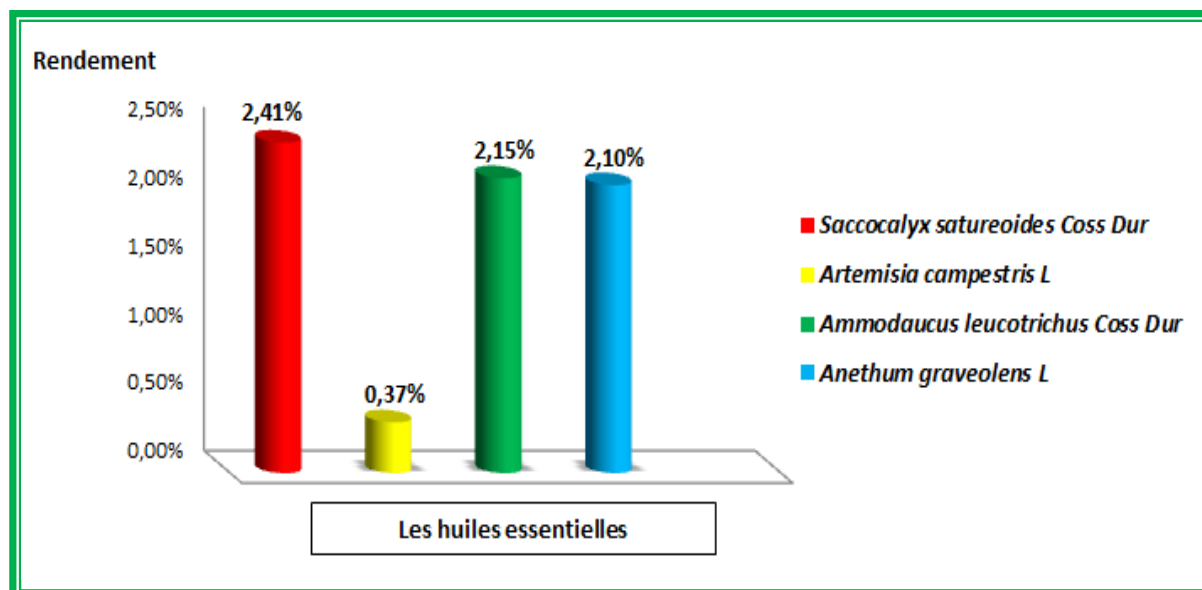


Fig 15. Rendement en huile essentielle extrait par hydro-distillation pour les quatre plantes testées.

III. Résultats des analyses physicochimiques

III.1. Indices physicochimiques des huiles essentielles

Les propriétés physicochimiques constituent un moyen de vérification et de contrôle de la qualité de l'huile essentielle (Afssaps, 2008). Ces essais sont déterminés selon un protocole précis édictées par l'association française de normalisation (A.F.N.O.R). Les résultats obtenus sont consignés dans le tableau 10.

A partir de ces valeurs, il en ressort que toutes ces constantes étant influencées par les conditions édaphiques et climatiques ainsi que les conditions de culture des plantes. Cela fait partie de la complexité de la notion de chémotype (Gildo, 2006).

La densité est parmi les caractéristiques physiques généralement utilisées dans la classification des huiles essentielles. Les densités de nos huiles essentielles est inférieure à celle d'eau.

Un indice de réfraction dépend de la composition chimique qui augmente en fonction des longueurs des chaînes d'acides, de leurs degrés d'insaturation et de la température. Il varie essentiellement avec la teneur en monoterpènes et en dérivés oxygénés. Une forte teneur en monoterpènes donnera un indice élevé. Pour certains auteurs (Boukhatem *et al*, 2010), le faible indice de réfraction de l'HE indique sa faible réfraction de la lumière ce qui pourrait favoriser son utilisation dans les produits cosmétiques. Les indices de réfraction de nos essences sont supérieurs à celle de l'eau (1.3356).

Pour le point de congélation, nos HES ont présenté des températures à un intervalle de $-10,2^{\circ}\text{C}\pm 0,1$ à $-19,7^{\circ}\text{C}\pm 0,1$.

Le pouvoir rotatoire indique si l'huile est dextrogyre ou lévogyre ce qui est un critère important pour connaître la pureté optique d'une huile essentielle. Les résultats du pouvoir rotatoire montrent des valeurs (-), que signifie nos huiles essentielles sont lévogyres, à l'exception de l'HE d'*Anethum graveolens* L. elle est dextrogyre avec une valeur de $+71,5^{\circ}\pm 0,1$.

La miscibilité à l'éthanol est un moyen rapide pour l'évaluation de la qualité d'une huile essentielle. La falsification des essences par des produits relativement insolubles affectera la solubilité. Les résultats révèlent que l'essence de *Saccocalyx satureioides* Coss. et Dur. est miscible de 0,2 volume pour 5 volumes d'éthanol, HE d'*Artemisia campestris* L. de la moitié (d'un volume pour 2 volumes d'éthanol), alors que les HES d'*Ammodaucus leucotrichus* Coss. & Dur. et d'*Anethum graveolens* L. par le tiers (d'un volume pour 3 volumes d'éthanol).

Tableau 11. Caractéristiques physiques et chimiques des huiles essentielles fraîchement extraites

Spécification	<i>Saccocalyx satureioides</i> Coss. et Dur.	<i>Artemisia campestris</i> L.	<i>Ammodaucus leucotrichus</i> Coss. & Dur.	<i>Anethum graveolens</i> L.
Indices physiques				
Densité D^{20}	$0,910\pm 0,3$	$0,701\pm 0,4$	$0,902\pm 0,2$	$0,821\pm 0,3$
Indice de réfraction	$1,511\pm 0,4$	$1,592\pm 0,3$	$1,501\pm 0,1$	$1,494\pm 0,2$
Point de congélation	$-19,7^{\circ}\text{C}\pm 0,1$	$-19,2^{\circ}\text{C}\pm 0,1$	$-18^{\circ}\text{C}\pm 0,1$	$-10,2^{\circ}\text{C}\pm 0,1$
Pouvoir rotatoire	$-8,8^{\circ}\pm 0,1$	$-6,8^{\circ}\pm 0,2$	$-12,5^{\circ}\pm 0,1$	$+71,5^{\circ}\pm 0,1$
Miscibilité à l'éthanol	0,2v : 5v	1v : 2v	1v : 3v	1v : 3v
Indices chimiques				
Indice d'acide (mg KOH/g)	$1,92\pm 0,2$	$3,37\pm 0,4$	$1,12\pm 0,2$	$1,65\pm 0,2$
Indice d'ester (mg KOH/g)	$72,32\pm 0,3$	$5,25\pm 0,3$	$22,23\pm 0,3$	$12,6\pm 0,1$

Pour les constantes chimiques, l'indice d'acide donne une idée sur le taux d'acides libres. En effet, une huile fraîche ne contient que très peu d'acides libres. C'est pendant la période de stockage que l'huile peut subir des dégradations telle l'hydrolyse des esters. Un indice d'acide inférieur à 2 est une preuve de bonne conservation de l'essence (faible quantité d'acides libres) (**Boukhatem et al, 2010**). Dans notre étude, cet indice, est inférieur à 2 sauf l'HE d'*Artemisia campestris* L. ($3,37 \pm 0.4$ mg KOH/g) demeure relativement élevé. Cela peut trouver une explication dans la dégradation de l'HE (hydrolyse des esters) durant sa conservation, ce qui est à terme préjudiciable. Les travaux de **Lazouni et al (2007)** ont affirmé qu'une HE de très haute qualité doit avoir un indice d'ester plus élevé et un indice d'acide inférieur qu'une huile de basse qualité. Ils ont constaté des variations des indices d'acide et d'ester au cours du temps et en fonction de la température.

Enfin, selon **Dumortier (2006)** une huile de bonne qualité aura une densité relative, un pouvoir rotatoire et un indice d'ester plus élevé qu'une huile de basse qualité, mais aura un indice de réfraction plus bas.

La détermination des propriétés physico-chimiques est une étape nécessaire mais demeure non suffisante pour caractériser l'HE. Il sera donc primordial de la compléter par des analyses chromatographique (CG et CG/SM).

III.2. Composition chimique des huiles essentielles

Les analyses chromatographiques des huiles essentielles ont permis d'identifier 33 composés qui représentent environ 94,05% pour *Saccocalyx satureioides* Coss. et Dur. (Tableau 11), contre 25 composés (99,59%) pour *Artemisia campestris* L. (Tableau 12), 19 composés (98,62%) pour *Ammodaucus leucotrichus* Coss. & Dur. (Tableau 13) et 15 composés (98,93%) pour *Anethum graveolens* L. (Tableau 14).

L'huile essentielle de *Saccocalyx satureioides* Coss. et Dur. du Mechria est composée principalement par le α -terpinéol (32,65%), de thymol (22,26%), de borneol (11,04%) et de isoborneol (8,15%) accompagnés d'autres constituants à des teneurs relativement faibles : p-cymène (3,62%), camphène (3%) et carvacrol (2,79%) totalisant environ 83,51%. Cette composition chimique est relativement analogue à celle d'El Masrane, région de Djelfa (Centre de l'Algérie) qui présente 42 composés représentant 94.1% de toute l'huile essentielle et constituée majoritairement par le α -terpineol (35.9%), thymol (15.6%) et borneol (12.4%), suivi du p-cymene (7.2%), camphene (4.3%) avec la présence de γ -terpinene

(4.0%) (**Zerroug et al, 2011**). En effet l'huile essentielle du nord central de l'Algérie analysée par **Biondi et al (2006)** présente qualitativement presque le même profil chimique que celui de notre essence. Les monoterpènes oxygénés sont les principaux constituants : α -terpineol (32.7%), thymol (22.8%), borneol (11.6%) et carvacrol (6.9%). D'autres composés sont aussi identifiées à des teneurs moins importantes : p-cymene (5.0%), camphene (2.9%), γ -terpinene (2.8%), α pinene (1.8%) et limonene (1.5%). L'essence du nord-est algérien est caractérisée par sa richesse en borneol (56%), suivi du thymol (11.5%), α -terpineol (7.9%) et p-cymene (2.6%) (**Laouer et al, 2004**). On note aussi que l'huile essentielle de sud ouest de l'Algérie analysée par **Bendimerad et al. (2009)** est dominée par le borneol (24.7%), thymol (21%), α -terpineol (19.1%) et camphene (6.3%). La composition chimique de la même essence originaire du l'ouest de l'Algérie, analysée par **Bendahou et al (2008)**, extraite par hydro-distillation (HD) et extraction assistée par micro-ondes (MAE) est dominée par le borneol (28%), suivi du thymol (18%), α -terpineol (17%) et camphene (6% à 8%). Réciproquement, le thymol (25.0%) suivi par le borneol (21.6%), α -terpineol (11.7%) et ethyl o-methylbenzoate (2.6%) étaient les principaux constituants des composés volatils extraits par hexane MAE.

Cependant, cette composition chimique est différente à celle de l'essence étudiée par **Gourine et al (2012)** qui contient le carvacrol (51,82%), γ -terpinene (18,96%) et o-cymene (11.3%) comme principaux constituants.

L'huile essentielle d'*Artemisia campestris* L. de notre région est caractérisée par sa richesse en spathulenol (27,81%) et en Z,E-farnesol (19,08%). D'autres composés sont aussi identifiés mais à des teneurs moins importantes : 8- α -acetoxyelemol (10,10 %), α -bisabolol acetate (6,21%), α -curcumene (5,47%), oxide caryophyllene (4,10%), α -cadinol (2,79%), limonene (2,46%), β -pinene (2,43%), trans-nerolidol (2,40%) et α -pinene (2%). L'ensemble de ces constituants participe au mélange avec environ 84,85%. Cette composition chimique relativement analogue à celle de l'huile essentielle d' *Artemisia campestris* L. d'Algérie analysée par **Dob et al (2005)** qui ont indiqué une prépondérance des composés oxygénés (43.7%) dominés par le Z,E-farnesol (10.3%) suivi par le cedrol (5.4%) et le verbenone (3.8%). De même, l'essence d'*Artemisia campestris* L. de la Serbie est dominée par le spathulenol (9,2%) et le β -pinene (9,1%) suivi du α -pinene (3,4 %), germacrene D (3,3%), 4-hydroxy-9-epi-beta-caryophyllene (3%) et limonene (2,5%) (**Chalchat et al, 2003**).

En effet, le polymorphisme chimique de l'essence de cette plante en Algérie est très variable d'une région à une autre. L'huile essentielle d'*Artemisia campestris* L. originaire de

Khenchela (Est de L'Algérie) présente un profil chimique différent que celui de notre région, les composés majoritaires sont : le β -myrcene (16,47%), α -pinene (14,18%) et le trans- β -ocimene (12,61%), accompagné d'autres constituants comme le β -cymene (8,15%) et le camphor (5,85%) (**Ghorab et al, 2013**). Quant, les principaux constituants de l'essence de Boussaada (sud-est de L'Algérie) sont le acetate α -terpenyl et α -pinene (19% et 18%) respectivement, suivi par le camphor (9%), du camphene (8%), limonene et borneol (5% chacun) (**Belhattab et al, 2011**).

L'huile essentielle d' *Artemisia campestris* L. de la Tunisie (sud de la Tunisie) est plus riche en β -pinene avec un taux de 45,8% suivi du α -pinene (12,5%), D'autres composés sont également présents, mais à des teneurs moins importantes : limonene (7,7%), p-cymene (4,6%), γ -terpinene (3,6%), (Z)- β -ocimene (3%) et (E)- β -ocimene (2,4%) (**Akrout et al, 2010**).

Les résultats de tableau 13 indiquent que l'huile essentielle d'*Ammodaucus leucotrichus* Coss. & Dur. de sud ouest algerien est en majorité monoterpénique, avec une prépondérance des composés oxygénés dominés par le perilla aldehyde (81,62%). D'autres composés (monoterpènes hydrocarbonés) sont aussi identifiés mais à des teneurs moins importantes : limonene (8,29%) et le α -pinene (3,14%). L'ensemble de ces constituants contribue au mélange avec environ 93,05 %. Cette composition chimique présente qualitativement le même profil chimique que celui de l'HE d'une espèce endémique (*Ammodaucus leucotrichus* subsp. *Leucotrichus*) du Nord Afrique analysée par **Velasco-Negueruela et al. (2006)** : perillaldehyde (63,6%), limonene (26,8%) et le α -pinene (4,7%). On note aussi qu'elle est sensiblement analogue à celle de la région de Guerrara (Ghardaia) constituée majoritairement par le perilla aldehyde (84.43%), caryophyllene acetate (3,03%), limonene (1,71 %), δ -cadinene (1.52%) et d'isovalerate allyl (1.19 %) (**Abu Zarga et al, 2013**).

L'analyse chimique de l'essence d'*Anethum graveolens* L. a permis d'identifier l'apiol et le carvone comme composés majoritaires avec 32.78% et 31.04% respectivement, suivi par le limonene 21,26%, accompagnés d'autres constituants à des teneurs relativement faibles : piperitone 6,11% et le α -phellandrène 3.28%, le tout totalisant environ 94,47%.

Selon **Small (2006)**, l'huile essentielle de l'aneth se compose au moins de 10 composés aromatiques différents, carvone, le limonene et le α -phellandrène constituent approximativement les 90%. **Attokaran (2011)** indique que le constituant majoritaire de l'essence des graines d'aneth c'est le carvone avec un taux de 30 à 60%.

En effet, l'analyse chimique de l'huile essentielle des graines d'*Anethum graveolens* L. a fait l'objet de nombreux travaux. L'HE d'aneth d'Ouzbékistan est plus riche en carvone (73,61%), suivi du limonene (14,69%), cis-dihydrocarvone (5,87%), diplaniol (2,16%) et 1,2-diethoxyethane (1,43%) (**Yili et al, 2009**). De même l'essence d'aneth de la Roumanie est constituée majoritairement par le carvone (75,21%), suivi du limonene (21,56%) et le trans-dihydrocarvone (3,02%) (**Radulescu et al, 2010**). Alors que de l'Inde est plus riche en limonene (42,67%), suivi du carvone (22,50%) et dill apiole (15,92%) (**Attokaran, 2011**).

La composition chimique de notre essence présente qualitativement le même profil chimique que celui de la Chine analysée par **Tian et al. (2011)** donc, les principaux constituants sont le carvone (41.5%), le limonene (32.6%) et l'apiol (16.8%). On note aussi qu'elle ressemble relativement à celle de l'Iran qui est dominée par la D-carvone (36.09%) suivi du limonene (19.89%), de l'apiole (16.83%), et la E-dihydrocarvone (7.36%) et Z-dihydrocarvone (6.59%) (**Roomiani et al, 2013**).

Par contre, la composition chimique d'une HE d'aneth originaire de la chine analysée par **Yili et al. (2006)** est complètement différente, elle est composée principalement par le n-pentacosane (27.96%), dioctylester de 1,2-phenyldicarboxylic acid (25.10%), suivi du octacosane (13.81%), tricosane (9.14%) et n-nonacosane (6.85%).

Cependant, l'huile essentielle d'Islande est caractérisée par sa richesse en α -phellandrène (56,5%) suivi par dill ether (20,8%), limonene (10,9%) et *p*-cymene (3,8%) (**Vera et Chane-Ming, 1998**). L'HE d'aneth de la Turquie (cultivée dans des conditions organiques) est sensiblement analogue à celle d'Islande constituée majoritairement par le α -phellandrene (47,74%), suivi du *p*-cymene (10,24%), dill ether (9,84%), trans-anethole (9,42), β -phellandrene (7,91%) et limonene (6,97%) (**Orhan et al, 2013**).

Généralement, la teneur et la composition chimique des huiles essentielles varient considérablement d'un échantillon à l'autre en fonction de l'origine des plantes et de la période de végétation, dépend aussi d'autres facteurs tels que l'espèce, les influence environnementales et le patrimoine génétique (**Bounatirou et al, 2007; Amarti et al, 2008 ; Amarti et al, 2010**).

Tableau 12. Composition chimique de l'essence *Saccocalyx satureioides* Coss. et Dur.

N°	IK	Composés	Ss Aire %	N°	IK	Composés	Ss Aire %
1	926	tricyclene	0.11	18	1285	bornyl acetate	0.45
2	931	α -thujene	0.20	19	1290	thymol	22.26
3	937	1R- α -pinene	1.52	20	1298	carvacrol	2.79
4	953	camphene	3.00	21	1355	thymol acetate	0.83
5	980	β -pinene	0.17	22	1409	α -gurjenene	0.10
6	991	myrcene	0.27	23	1418	β -caryophyllene	0.41
7	1018	α -terpinene	0.28	24	1454	α -caryophyllene	0.10
8	1026	p-cymene	3.62	25	1461	allo-aromadendrene	0.17
9	1030	R-limonene	0.79	26	1493	viridiflorene	0.10
10	1062	γ -terpinene	0.85	27	1505	α -amorphene	0.19
11	1088	α -terpinolene	0.18	28	1524	Δ -cadinene	0.35
12	1098	linalool	0.25	29	1576	(-)-spathulenol	0.71
13	1139	L-camphor	0.18	30	1581	caryophyllene oxide	0.22
14	1156	isoborneol	8.15	31	1590	viridiflorol	0.28
15	1165	borneol	11.04	32	1653	α -cadinol	0.21
16	1177	terpin-4-ol	1.49	33	1689	shyobunol	0.13
17	1189	α-terpineol	32.65				
Total							94,05 %

IK: Kováts indices

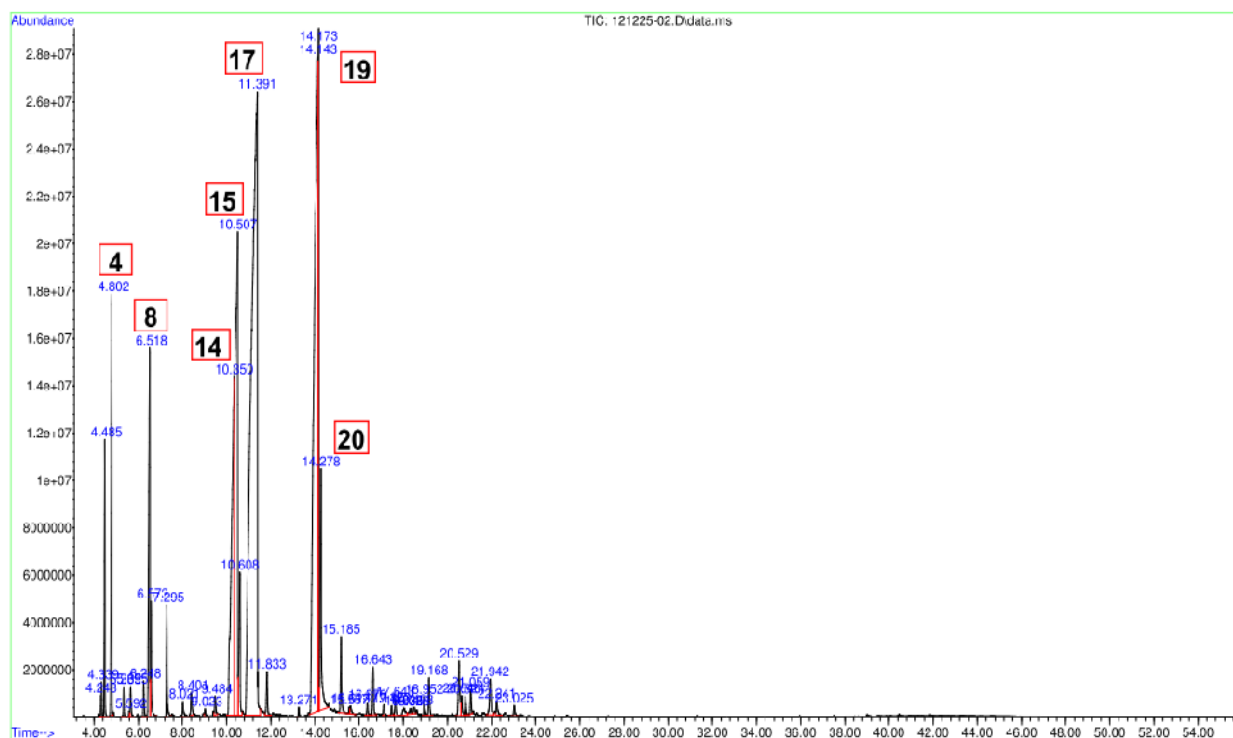


Fig 16. Profil chromatographique de l'huile essentielle de *Saccocalyx satureioides* Coss. et Dur. (les numéros des pics peuvent s'identifier dans le tableau 11).

Tableau 13. Composition chimique d'huile essentielle d'*Artemisia campestris* L.

N°	IK	Composés	Ss Aire %	N°	IK	Composés	Ss Aire %
1	939	α-pinene	2.00	14	1565	ledol	0.60
2	980	β-pinene	2.43	15	1568	caryophyllene alcohol	0.82
3	991	myrcene	0.49	16	1576	spathulenol	27.81
4	1026	p-cymène	0.78	17	1581	caryophyllene oxide	4.10
5	1031	limonene	2.46	18	1596	cedrol	1.60
6	1271	perilla aldehyde	4.86	19	1606	β -oploponone	0.74
7	1418	β -caryophyllene	0.56	20	1649	β -eudesmol	1.12
8	1480	germacrene D	0.70	21	1653	α-cadinol	2.79
9	1486	α-curcumene	5.47	22	1697	Z,E-farnesol	19.08
10	1493	viridiflorene	0.37	23	1725	trans-farnesol	0.75
11	1516	1,3-dimethyl-1-cyclohexene	0.42	24	1789	8-α-acetoxyelemol	10.10
12	1524	δ -Cadinene	0.93	25	1796	α-bisabolol acetate	6.21
13	1564	trans-nerolidol	2.40				
Total							99,59 %

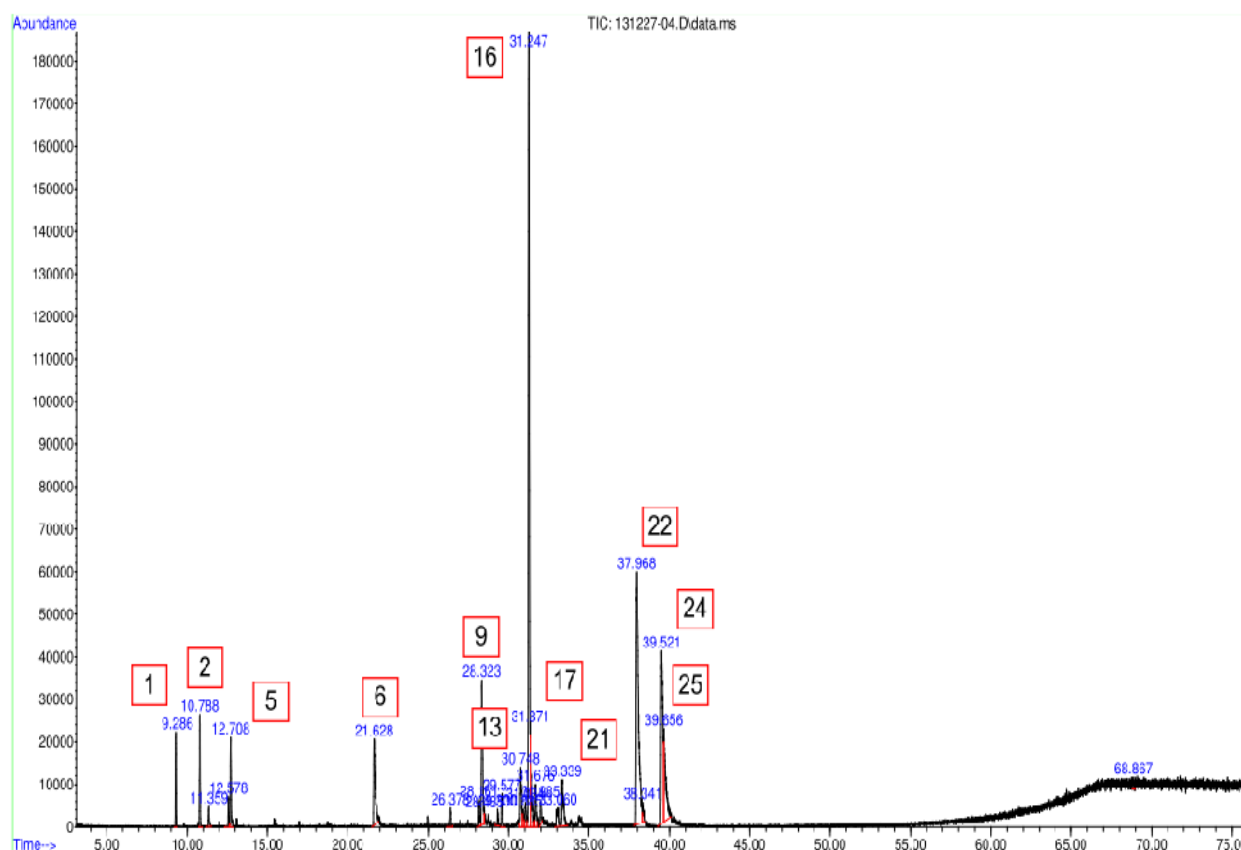


Fig 17. Profil chromatographique de l'huile essentielle d'*Artemisia campestris* L. (les numéros des pics peuvent s'identifier dans le tableau 12).

Tableau 14. Composition chimique d'huile essentielle d'*Ammodaucus leucotrichus* Coss. & Dur.

N°	IK	Composés	Ss Aire %	N°	IK	Composés	Ss Aire %
1	939	α-pinene	3.14	11	1285	bornyl acetate	0.22
2	953	camphene	0.24	12	1295	perilla alcohol	0.67
3	980	β -pinene	0.65	13	1376	α -copaene	0.77
4	991	β -Myrcene	0.41	14	1418	caryophyllene	0.15
5	1011	3-Carene	0.63	15	1486	α -curcumene	0.21
6	1031	limonene	8.29	16	1494	bicyclogermacrene	0.14
7	1165	borneol	0.20	17	1504	beta-dihydroagarofuran	0.34
8	1189	α -terpinéol	0.15	18	1576	spathulenol	0.47
9	1239	cuminaldehyde	0.19	19	1653	α -cadinol	0.13
10	1271	perilla aldehyde	81.62				
Total							98,62 %

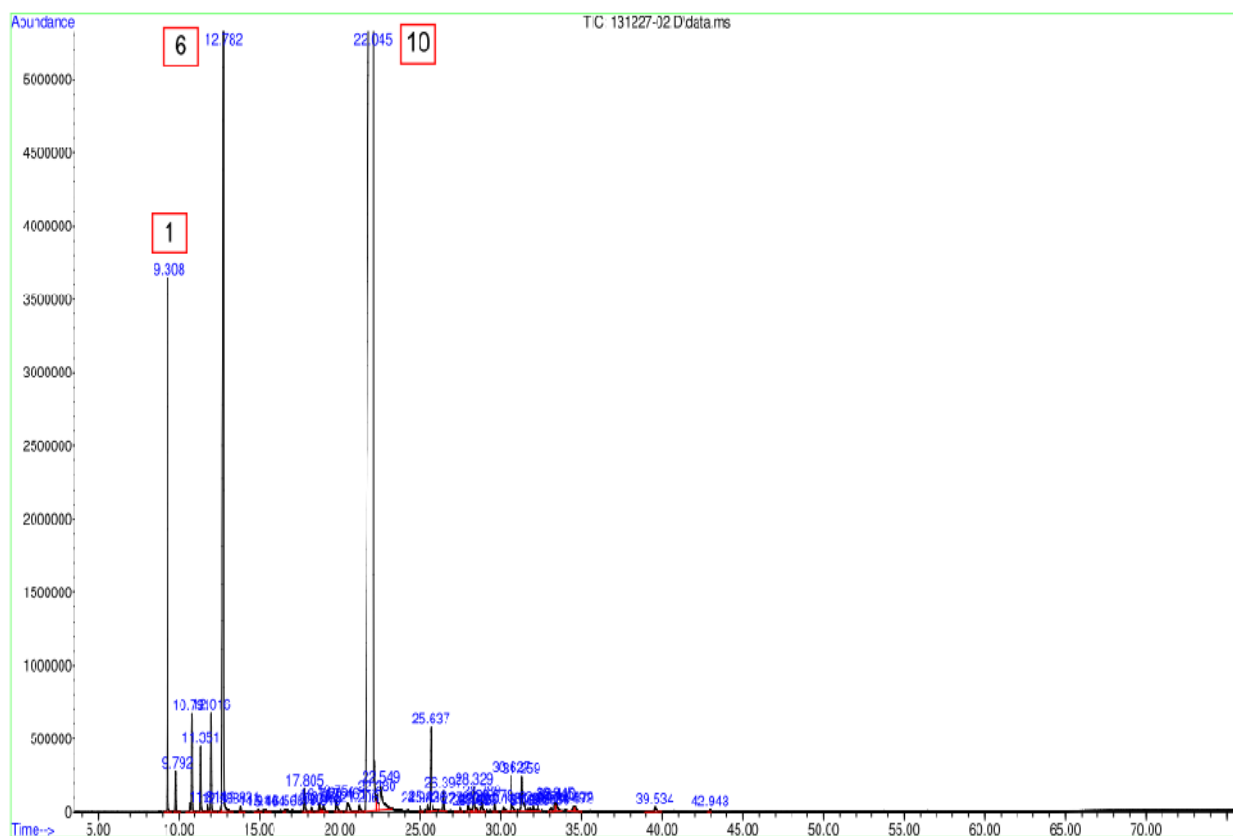
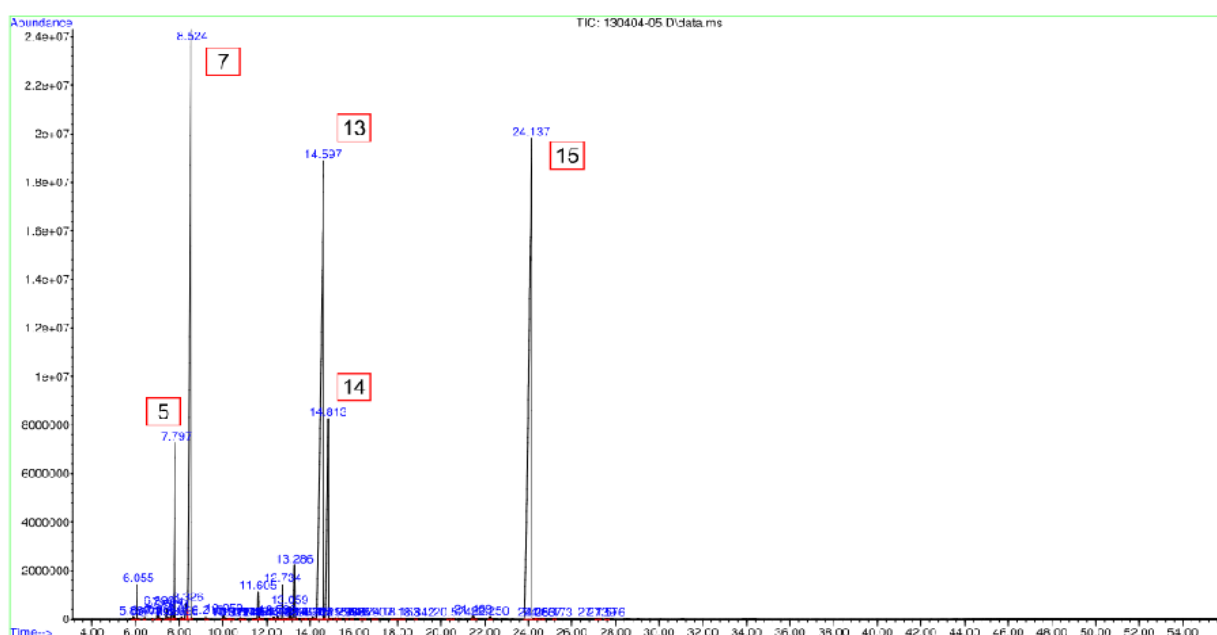


Fig 18. Profil chromatographique de l'huile essentielle d'*Ammodaucus leucotrichus* Coss. & Dur. (les numéros des pics peuvent s'identifier dans le tableau 13).

Tableau 15. Composition chimique d'huile essentielle d'*Anethum graveolens* L.

N°	IK	Composés	Ss Aire %	N°	IK	Composés	Ss Aire %
1	937	1R- α -pinène	0.54	9	1139	L-camphor	0.53
2	976	sabinene	0.20	10	1184	Dill ether	0.67
3	991	myrcene	0.19	11	1193	dihydrocarvone	0.30
4	1001	2-carene	0.22	12	1200	E-dihydrocarvone	1.18
5	1005	α-phellandrene	3.28	13	1242	carvone	31.04
6	1026	p-cymène	0.51	14	1252	piperitone	6.11
7	1031	limonene	21.26	15	1680	apiol	32.78
8	1076	o-Isopropenyltoluene	0.12				
Total							98,93 %

**Fig 19.** Profil chromatographique de l'huile essentielle d'*Anethum graveolens* L. (les numéros des pics peuvent s'identifier dans le tableau 14).

IV. Résultats d'activité antifongique des huiles essentielles

IV.1. Croissance radiale sur milieu solide, Sporulation et germination

L'activité antifongique des huiles essentielles a fait l'objet d'un grand nombre de publications à l'échelle internationale, dont plusieurs ont spécifiquement noté la forte activité sur les champignons filamenteux (**Giordani et al, 2006 ; Kaloustian et al, 2008 ; Bendimerad et al, 2009 ; Bssaibis et al, 2009 ; Amarti et al, 2010**). Cependant rares sont ceux qui ont été consacrés à l'activité antifongique de nos quatre essences et ces résultats ont été confirmés dans le présent travail, une importante activité a été témoignée contre ces moisissures.

Les résultats de l'activité antifongiques des huiles essentielles sont consignés dans les tableaux 15, 16, 17 et 18. Les résultats de la méthode de contact directe montre que nos essences ont exercé une importante activité inhibitrice vis-à-vis la croissance mycélienne des sept souches fongiques testées.

L'huile essentielle de *Saccocalyx satureioides* Coss. et Dur. a inhibé la croissance de toutes les souches fongique à partir d'une faible concentration de l'ordre de 1/880 v/v. le *Fusarium oxysporum f.sp. albedinis*, *Alternaria alternata* et *Cladosporium sp* se sont montrés plus sensibles que les autre champignons, ils ont été inhibés à partir de 1/1660 v/v. Notant qu'*Aspergillus ochraceus* a été inhibé à partir de 1/1150 v/v. La concentration 1/370 v/v a été fongicide pour toutes les souches testées.

Tableau 16. Activité antifongique de l'huile essentielle de *Saccocalyx satureioides* Coss. et Dur. sur la croissance radiale, sporulation et germination exprimées en (%)

		<i>A. flavus</i>	<i>A. ochraceus</i>	<i>A.niger</i>	<i>F.oxysporum f.sp. Albedinis</i>	<i>P. expansum</i>	<i>Alternaria alternata</i>	<i>Cladosporium sp</i>
Témoin	P _I	0	0	0	0	0	0	0
	I _S	0	0	0	0	0	0	0
	I _G	0	0	0	0	0	0	0
1/7500 (V/V)	P _I	29,41±0.1	5±0.3	40±0.2	25,39±0.2	21,81±0.5	9,09±0.1	9,09±0.1
	I _S	31,14±0.3	20,97±0.2	30,93±0.5	26,54±0.1	34,86±0.6	42,23±0.2	24,57±0.1
	I _G	1,15±0.3	14,04±0.4	4,18±0.5	6,38±0.2	5,23±0.6	2,6±0.3	8,37±0.2
1/1500 (V/V)	P _I	76,47 **	68,75 *	76,47 *	100 ***	56,36±0.4	100 ***	100 ***
	I _S	57,22 *	43,87±0.6	66,74 *	100 ***	52,24±0.4	100 ***	100 ***
	I _G	8,67±0.4	23,03±0.3	35,6±0.4	29,78±0.2	30,15±0.5	21,35±0.3	30,72±0.2
1/370 (V/V)	P _I	100 *** (F)	100 *** (F)	100 *** (F)	100 *** (F)	100 *** (F)	100 *** (F)	100 *** (F)
	I _S	100 ***	100 ***	100 ***	100 ***	100 ***	100 ***	100 ***
	I _G	38,15±0.3	39,32±0.4	41,36±0.4	40,42±0.3	38,62±0.4	36,97±0.3	52,51±0.2
1/150 (V/V)	P _I	100 ***	100 ***	100 ***	100 ***	100 ***	100 ***	100 ***
	I _S	100 ***	100 ***	100 ***	100 ***	100 ***	100 ***	100 ***
	I _G	56,06±0.2	57,3±0.3	55,49±0.3	50,53±0.4	66,13±0.2	52±0.1	79,88±0.1
1/100 (V/V)	P _I	100 ***	100 ***	100 ***	100 ***	100 ***	100 ***	100 ***
	I _S	100 ***	100 ***	100 ***	100 ***	100 ***	100 ***	100 ***
	I _G	80,34 ±0.1	89,88 **	75,91±0.2	65,42±0.2	85,71 *	83,85 *	89,38 **
CMI (V/V)		1/880	1/1150	1/880	1/1660	1/880	1/1870	1/1870

P_I : Croissance radiale ; I_S : Sporulation ; I_G : Germination ; F : Effet fongicide

* Significatif à p < 0.05; ** Significatif à p < 0.01;*** Significatif à p < 0.001 en accord avec les témoins.

Note : CMI (V/V), est la concentration minimale inhibitrice de la croissance radiale.

Beaucoup de travaux ont souligné l'efficacité de la bioactivité de l'huile essentielle et l'extrait de *Saccocalyx satureioides* Coss. et Dur. Les études de **Gourine et al (2012)** ;

Belmekki et Bendimerad (2012) ont montré que l'essence et l'extrait méthanolique de cette plante ont un bon effet antioxydant, et ils représentent un potentiel important comme antioxydant naturel. De même, d'autres travaux ont révélé que cette essence exerce une grande activité inhibitrice sur le *Staphylococcus aureus*, l'*Escherichia coli* et le *Klebsiella pneumoniae*, le *Bacillus subtilis*, le *Listeria monocytogenes*, l'*Enterococcus faecalis*, le *Proteus mirabilis* et le *Salmonella typhimurium* (**Laouer et al, 2004 ; Bendahou et al, 2008**).

Cependant, l'huile essentielle d'*Artemisia campestris* L. s'est avéré relativement la moins active sur la croissance mycélienne par rapport aux autres huiles, ceci est bien clair en comparant les concentrations inhibitrices (Tableau 16). La majorité des souches testées n'ont été inhibées qu'avec de fortes CMI (1/70 et 1/80 v/v), suivi par *A. ochraceus* et *Alternaria alternata* (1/200 v/v), tandis que le *F. oxysporum f.sp. albedinis* et le *P. expansum* sont les plus sensibles, ils ont été inhibés à partir de 1/800 (v/v) et 1/500 (v/v) respectivement. Cette essence n'exerce aucun effet fongicide, elle possède un effet fongistatique.

Tableau 17. Activité antifongique de l'huile essentielle d'*Artemisia campestris* L. sur la croissance radiale, sporulation et germination exprimées en (%)

	A. <i>flavus</i>	A. <i>ochraceus</i>	<i>A.niger</i>	<i>F.oxysporum</i> <i>f.sp. Albedinis</i>	<i>P.</i> <i>expansum</i>	<i>Alternaria</i> <i>alternata</i>	<i>Cladosporium</i> <i>sp</i>
Témoin	P_I	0	0	0	0	0	0
	I_S	0	0	0	0	0	0
	I_G	0	0	0	0	0	0
1/7500 (V/V)	P_I	41,27±0.2	60,22±0.1	4,76±0.3	37,14±0.2	24,32±0.1	56,86±0.2
	I_S	20±0.1	21,42±0.2	13,25±0.1	87,5±0.2	27,58±0.3	86,88±0.2
	I_G	90,4 *	78,94±0.3	87,74±0.1	68,7±0.2	65,33±0.2	85,71±0.1
1/1500 (V/V)	P_I	57,14±0.3	87,63±0.3	26,19±0.2	91,43 *	51,35±0.2	74,51±0.1
	I_S	54,28±0.2	71,42±0.2	24,09±0.3	100 ***	84,48±0.2	95,08 **
	I_G	96 **	87,22±0.1	92,25 *	88,54±0.2	95,33 **	93,71 **
1/370 (V/V)	P_I	74,60±0.1	90,55 *	50±0.2	100 ***	100 ***	88,24±0.1
	I_S	74,28±0.2	85,71±0.2	38,55±0.3	100 ***	100 ***	98,36 **
	I_G	97,6 **	93,23 *	95,48 **	96,18 **	100 ***	96,57 **
1/150 (V/V)	P_I	93,65 *	100 ***	64,28±0.1	100 ***	100 ***	100 ***
	I_S	100 ***	92,85 *	93,97 **	100 ***	100 ***	100 ***
	I_G	100 ***	100 ***	98,7 **	100 ***	100 ***	98,28 **
1/100 (V/V)	P_I	96,82**	100 ***	90,48 *	100 ***	100 ***	84,46±0.1
	I_S	100 ***	100 ***	100 ***	100 ***	100 ***	100 ***
	I_G	100 ***	100 ***	100 ***	100 ***	100 ***	100 ***
CMI (V/V)	1/70	1/200	1/70	1/800	1/500	1/200	1/80

P_I : Croissance radiale ; **I_S** : Sporulation ; **I_G** : Germination

* Significatif à p < 0.05; ** Significatif à p < 0.01;*** Significatif à p < 0.001 en accord avec les témoins.

Nos résultats sont en accord avec ceux de **Akrout et al. (2011)** qui ont montré que l'essence d'*Artemisia campestris* L. possède une faible activité antioxydante en comparaison avec l'extrait aqueux et organique. Dans une autre étude réalisée par **Akrout et al. (2010)** sur trois huiles essentielles (*Artemisia campestris* L., *Artemisia herba alba* et *Thymus capitatus*) originaires du sud de la Tunisie, les résultats ont montré que l'HE d' *Artemisia campestris* L. s'est avérée moins antioxydante et moins efficace vis-à-vis l'activité antibactérienne de six bactéries par rapport aux autres huiles, elle possède une action inhibitrice contre *Escherichia coli* (18 mm), *Klebsiella pneumoniae* (10 mm), *Serratia marcescens* (5 mm) et *Citrobacter freundii* (10 mm) et inactive contre *Pseudomonas aeruginosa* et *Enterobacter amnigenus*. Cependant, **Ghorab et al. (2013)** ont signalés que les souches les plus sensibles sont *Pseudomonas aeruginosa* et *Escherichia coli*.

Par contre, l'huile essentielle d'*Ammodaucus leucotrichus* Coss. & Dur. est avérée le plus efficace sur la croissance des moisissures parmi les quatre essences. Toutes les souches ont été inhibées à une très faible concentration de 1/3000 (v/v). le *Fusarium oxysporum* f.sp.albedinis, *Cladosporium* sp et *Penicillium expansum* sont les plus sensibles, ils ont été inhibés à partir de 1/8500 (v/v), tandis que l'*Alternaria alternata* à une concentration de 1/8000 (v/v). L'HE d'*Ammodaucus leucotrichus* Coss. & Dur. est fongicide pour *Alternaria alternata*, *F. oxysporum*, *P. expansum* et *Cladosporium* sp à une concentration de 1/7500 (v/v), alors que pour *A. flavus* à 1/1500 (v/v) et pour *A. ochraceus* et *A. niger* à 1/370 (v/v).

L'activité antibactérienne de l'huile essentielle d'*Ammodaucus leucotrichus* Coss. & Dur. a été testée par **Abu Zarga et al. (2013)** contre huit bactéries, ils ont trouvé que l'huile pure était le plus actif contre *Micrococcus luteus* (20 mm), tandis que modérément active contre *Bacillus subtilis* (14 mm), *Staphylococcus aureus* (12 mm), *Streptococcus faecalis* (10 mm) et *Klebsiella pneumoniae* (8 mm). En outre, elle était inactive contre *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Salmonella typhi*. Signalons à ce passage que, l'activité anti tumoral de cette essence a été testée contre les lignées cellulaires de cancer MCF7 et T47D et les résultats n'ont montré aucune activité.

Tableau 18. Activité antifongique de l'huile essentielle d'*Ammodaucus leucotrichus* Coss. & Dur. sur la croissance radiale, sporulation et germination exprimées en (%)

		<i>A. flavus</i>	<i>A. ochraceus</i>	<i>A. niger</i>	<i>F. oxysporum</i> <i>f.sp. Albedinis</i>	<i>P. expansum</i>	<i>Alternaria alternata</i>	<i>Cladosporium sp</i>
Témoin	P_I	0	0	0	0	0	0	0
	I_S	0	0	0	0	0	0	0
	I_g	0	0	0	0	0	0	0
1/7500 (V/V)	P_I	73,33±0.3	60,65±0.6	50±0.2	100*** (F)	100*** (F)	100*** (F)	100*** (F)
	I_S	48,75±0.6	100***	41,81±0.3	100***	100***	100***	100***
	I_g	95,41**	100***	97,77**	100***	100***	100***	100***
1/1500 (V/V)	P_I	100*** (F)	100***	100***	100***	100***	100***	100***
	I_S	100***	100***	100***	100***	100***	100***	100***
	I_g	100***	100***	100***	100***	100***	100***	100***
1/370 (V/V)	P_I	100***	100*** (F)	100*** (F)	100***	100***	100***	100***
	I_S	100***	100***	100***	100***	100***	100***	100***
	I_g	100***	100***	100***	100***	100***	100***	100***
1/150 (V/V)	P_I	100***	100***	100***	100***	100***	100***	100***
	I_S	100***	100***	100***	100***	100***	100***	100***
	I_g	100***	100***	100***	100***	100***	100***	100***
1/100 (V/V)	P_I	100***	100***	100***	100***	100***	100***	100***
	I_S	100***	100***	100***	100***	100***	100***	100***
	I_g	100***	100***	100***	100***	100***	100***	100***
CMI (V/V)		1/5000	1/4000	1/3000	1/8500	1/8500	1/8000	1/8500

P_I : Croissance radiale ; **I_S** : Sporulation ; **I_g** : Germination ; **F** : Effet fongicide

* Significatif à p < 0.05; ** Significatif à p < 0.01;*** Significatif à p < 0.001 en accord avec les témoins.

L'huile essentielle d'*Anethum graveolens* L. vient en troisième position parmi les différentes essences vis-à-vis la croissance des champignons, le *A. niger* s'est avérée être le plus résistant de toutes les souches, il a été inhibé à partir d'une forte concentration de 1/180 v/v. Le reste des souches fongiques ont été inhibées avec des CMI s'échelonnant entre 1/500 et 1/750 v/v, alors qu'*Alternaria alternata* s'est montré plus sensible que les autres champignons (1/6500 v/v). Cette huile essentielle est fongicide pour toutes les souches à une concentration de 1/370 (v/v), sauf *A. niger* à 1/150 (v/v).

Par ailleurs, l'activité antifongique de l'essence des grains d'Aneth a été testée *in vitro* par **Tian et al. (2011)**, les résultats ont montré qu'une CMI de 2 µl/ml était suffisante pour inhiber toutes les champignons testés (*Aspergillus flavus*, *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus niger* et *Alternaria alternata*).

Singh *et al.* (2005) attestent que l'huile essentielle d'Aneth peut être considérée comme une source antimicrobienne naturelle, car elle a montré une activité antibactérienne importante contre le *Pseudomonas aeruginosa* et antifongique très efficace contre le *Penicillium citrinum* et l'*Aspergillus niger*, alors qu'elle a inhibée totalement la croissance du *Fusarium graminearum* à une dose de 6 µl. En comparaison l'huile essentielle d'aneth d'ouzbékistan a inhibée la croissance de *Staphylococcus aureus* et *Candida albicans* avec une CMI de 0.273 et 0.00273 mg/ml respectivement (Yili *et al.*, 2009). De même, une étude récente réalisée par Roomiani *et al.* (2013) a montré que cette essence inhibe la croissance de *Streptococcus iniae* l'agent pathogène zoonotique du poisson d'élevage, avec une CMI de 7,8 µg/ml.

Enfin, on peut ajouter que l'essence de cette plante possède une puissante activité anti-enzymatique contre l'acétylcholinestérase et la butyrylcholinestérase (Orhan *et al.*, 2008).

Tableau 19. Activité antifongique de l'huile essentielle d'*Anethum graveolens* L. sur la croissance radiale, sporulation et germination exprimées en (%)

	<i>A. flavus</i>	<i>A. ochraceus</i>	<i>A.niger</i>	<i>F.oxysporum f.sp. Albedinis</i>	<i>P. expansum</i>	<i>Alternaria alternata</i>	<i>Cladosporium sp</i>	
Témoin	P_I	0	0	0	0	0	0	
	I_S	0	0	0	0	0	0	
	I_g	0	0	0	0	0	0	
1/7500 (V/V)	P_I	8,39±0.2	11,62±0.3	11,94±0.4	36,36±0.1	36,53±0.2	58,82±0.2	23,80±0.3
	I_S	50±0.3	22,07±0.2	31,57±0.1	44,44±0.2	20±0.3	29,16±0.2	51,25±0.1
	I_g	73,91±0.2	77±0.1	70,30±0.3	88,50±0.1	81,05±0.2	92,85±0.3	89,09±0.2
1/1500 (V/V)	P_I	51,56±0.1	23,25±0.3	30,91±0.2	45,45±0.1	42,30±0.2	100***	50,33±0.2
	I_S	100***	42,85±0.2	78,97±0.1	100***	42±0.3	100***	61,25±0.2
	I_g	91,30*	92*	87,28±0.1	100***	94,73**	100***	94,44**
1/370 (V/V)	P_I	100*** (F)	100*** (F)	77.61±0.2	100*** (F)	100*** (F)	100*** (F)	100*** (F)
	I_S	100***	100***	100***	100***	100***	100***	100***
	I_g	100***	100***	100***	100***	100***	100***	100***
1/150 (V/V)	P_I	100***	100***	100*** (F)	100***	100***	100***	100***
	I_S	100***	100***	100***	100***	100***	100***	100***
	I_g	100***	100***	100***	100***	100***	100***	100***
1/100 (V/V)	P_I	100***	100***	100***	100***	100***	100***	100***
	I_S	100***	100***	100***	100***	100***	100***	100***
	I_g	100***	100***	100***	100***	100***	100***	100***
CMI (V/V)	1/550	1/550	1/180	1/750	1/500	1/6500	1/600	

P_I : Croissance radiale ; **I_S** : Sporulation ; **I_g** : Germination ; **F** : Effet fongicide

* Significatif à p < 0.05; ** Significatif à p < 0.01;*** Significatif à p < 0.001 en accord avec les témoins.

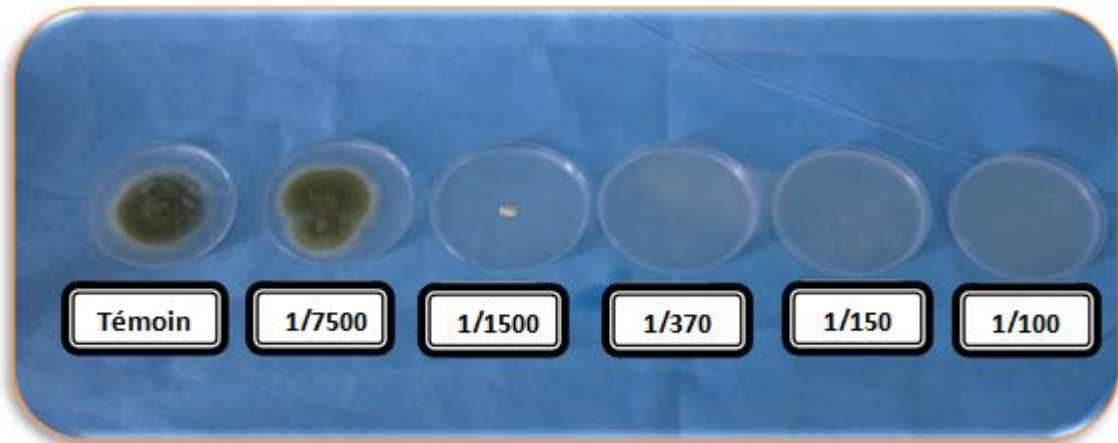


Photo 13. Effet de l'huile essentielle de *Saccocalyx satureioides* Coss. et Dur. sur *A. flavus*



Photo 14. Effet de l'huile essentielle de *Saccocalyx satureioides* Coss. et Dur. sur *A. niger*

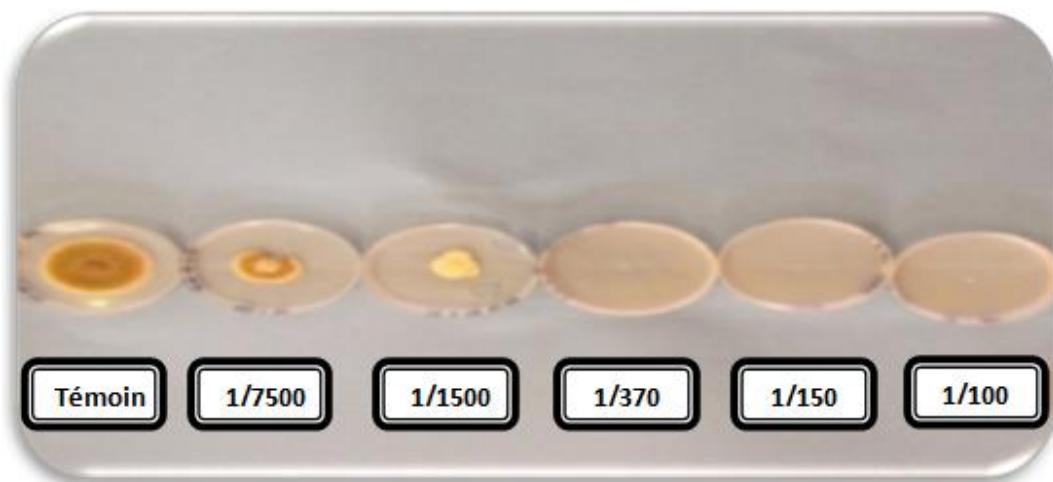


Photo 15. Effet de l'He de *Saccocalyx satureioides* Coss. et Dur. sur *A. ochraceus*

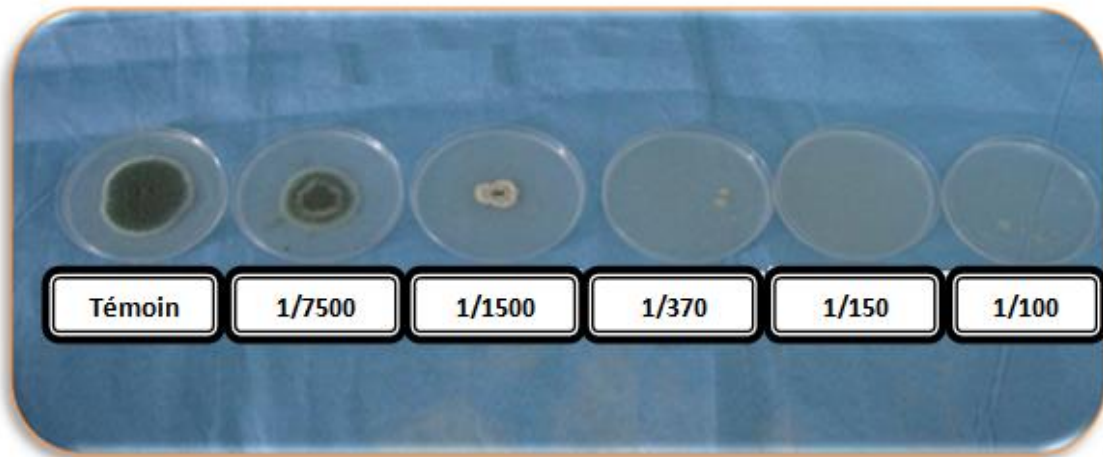


Photo 16. Effet de l'He de *Saccocalyx satureioides* Coss. et Dur. sur *P. expansum*

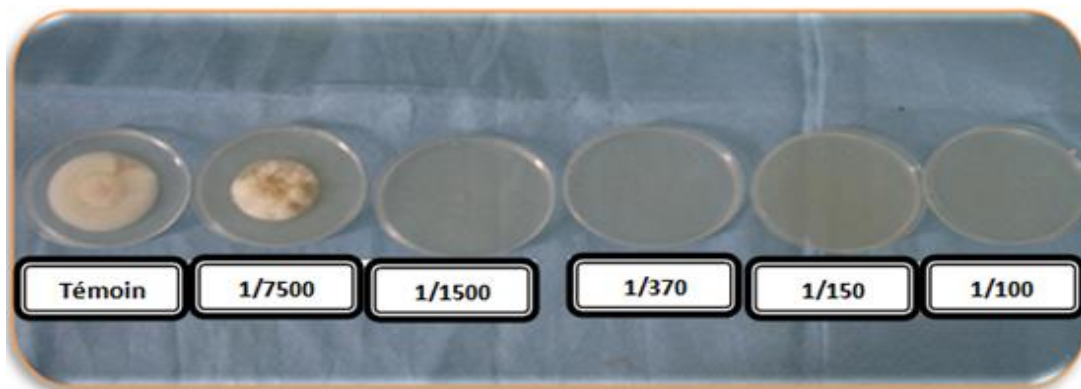


Photo 17. Effet de l'huile essentielle (v/v) de *Saccocalyx satureioides* Coss. et Dur. sur *Fusarium oxysporum f.sp. albedinis*

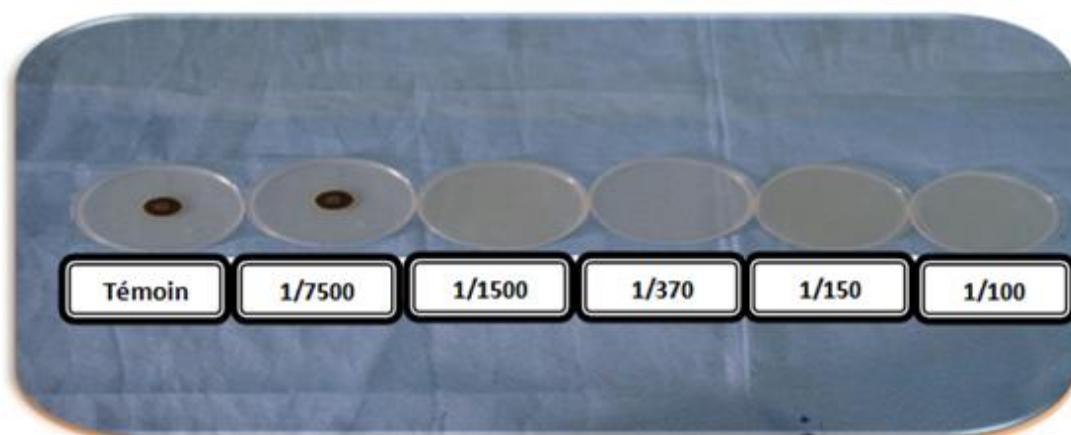


Photo 18. Effet de l'huile essentielle (v/v) de *Saccocalyx satureioides* Coss. et Dur. sur *Alternaria alternata*

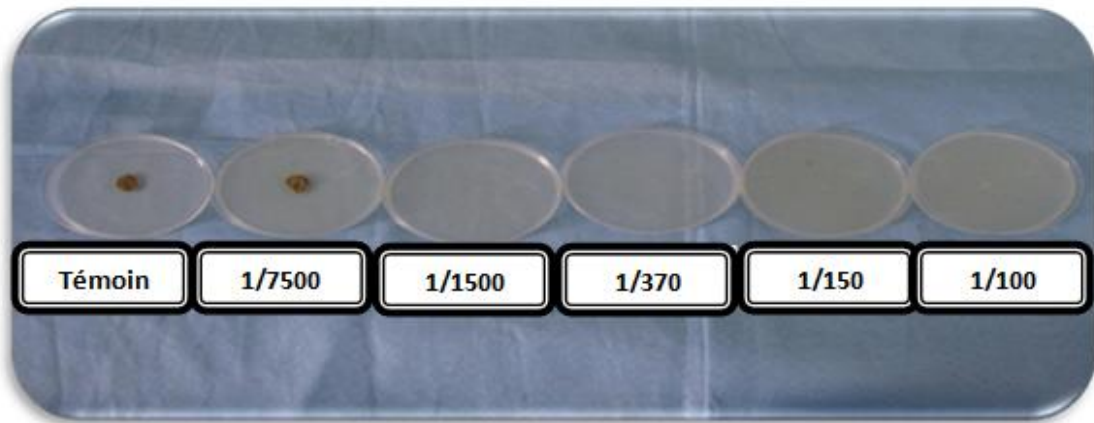


Photo 19. Effet de l'huile essentielle (v/v) de *Saccocalyx saturoioides* Coss. et Dur. sur *Cladosporium* sp



Photo 20. Effet de l'huile essentielle (v/v) d'*Artemisia campestris* L. sur *A. flavus*

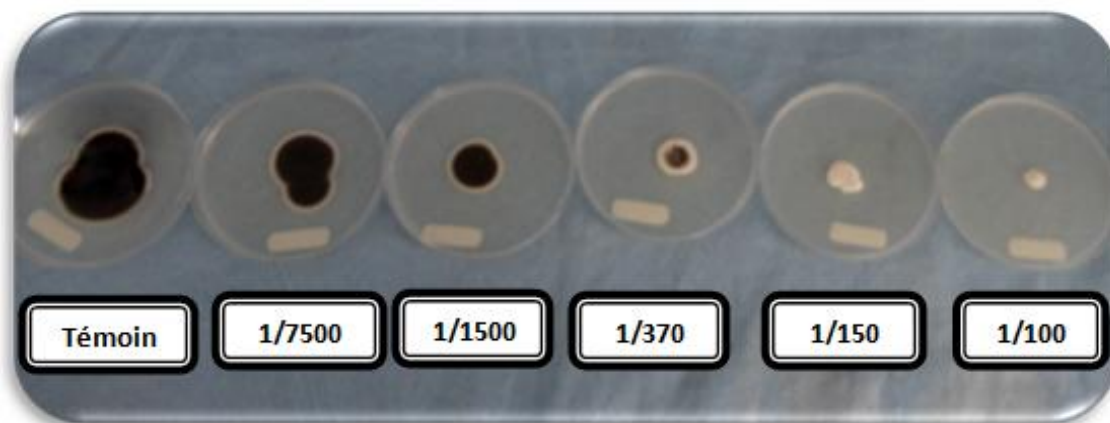


Photo 21. Effet de l'huile essentielle (v/v) d'*Artemisia campestris* L. sur *A. niger*



Photo 22. Effet de l'huile essentielle (v/v) d'*Artemisia campestris* L. sur *Aspergillus ochraceus*



Photo 23. Effet de l'He (v/v) d'*Artemisia campestris* L. sur *Penicillium expansum*



Photo 24. Effet de l'huile essentielle (v/v) d'*Artemisia campestris* L. sur *Fusarium oxysporum f.sp. albedinis*



Photo 25. Effet de l'huile essentielle (v/v) d'*Artemisia campestris* L. sur *Alternaria alternata*



Photo 26. Effet de l'huile essentielle (v/v) d'*Ammodaucus leucotrichus* Coss. & Dur. sur *A. flavus*

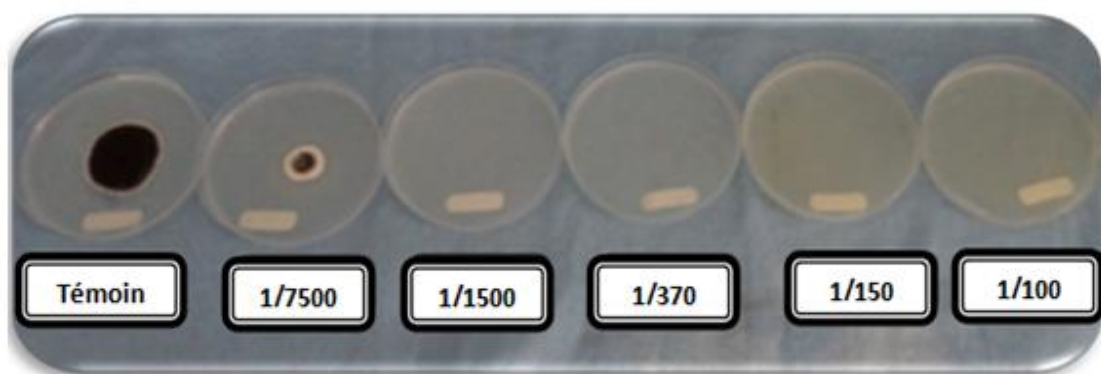


Photo 27. Effet de l'huile essentielle (v/v) d'*Ammodaucus leucotrichus* Coss. & Dur. sur *A. niger*



Photo 28. Effet de l'huile essentielle (v/v) d'*Ammodaucus leucotrichus* Coss. & Dur. sur *Aspergillus ochraceus*



Photo 29. Effet de l'huile essentielle (v/v) d'*Ammodaucus leucotrichus* Coss. & Dur. sur *Penicillium expansum*



Photo 30. Effet de l'huile essentielle (v/v) d'*Ammodaucus leucotrichus* Coss. & Dur. sur *Fusarium oxysporum f.sp. albedinis*

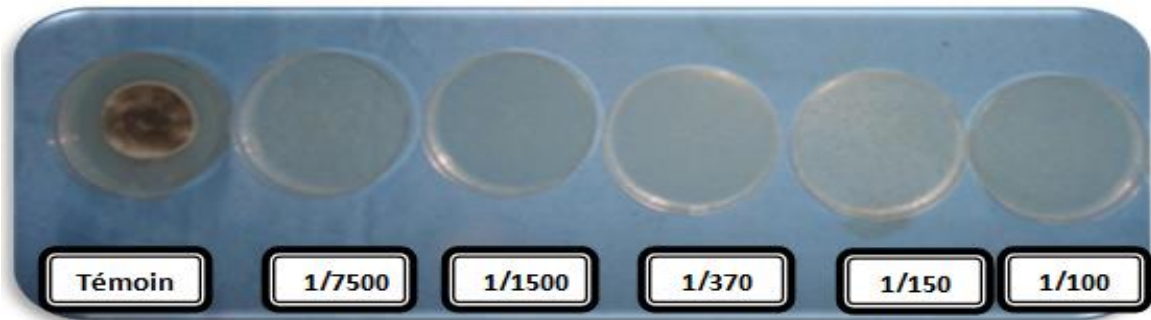


Photo 31. Effet de l'huile essentielle (v/v) d'*Ammodaucus leucotrichus* Coss. & Dur. sur *Alternaria alternata*



Photo 32. Effet de l'huile essentielle (v/v) d'*Ammodaucus leucotrichus* Coss. & Dur. sur *Cladosporium* sp

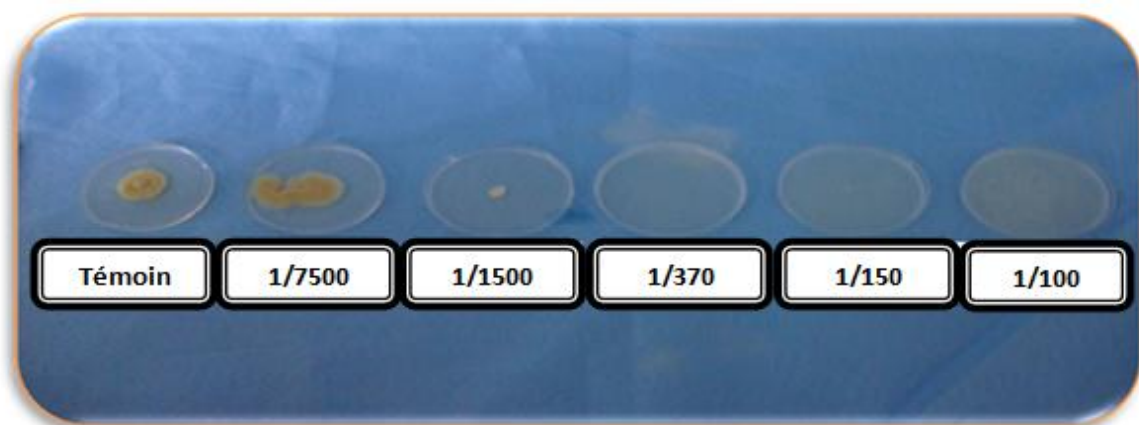


Photo 33. Effet de l'huile essentielle (v/v) d'*Anethum graveolens* L. sur *A. flavus*

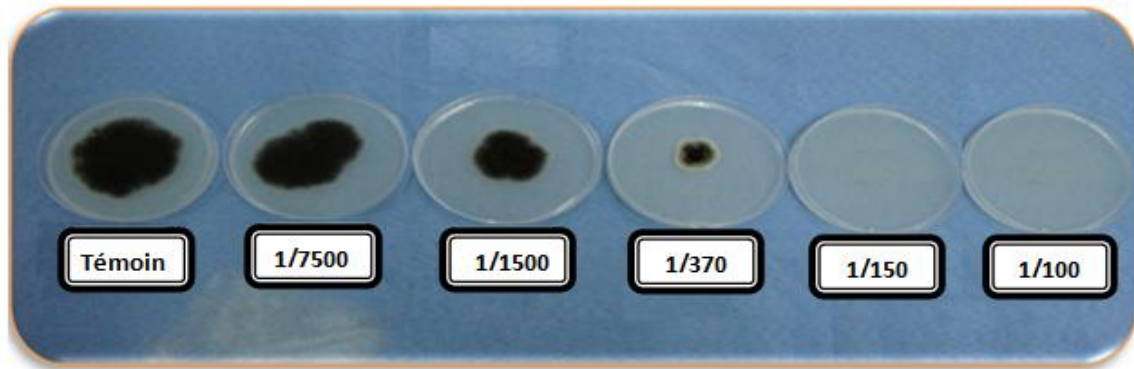


Photo 34. Effet de l'huile essentielle (v/v) d'*Anethum graveolens* L. sur *A. niger*



Photo 35. Effet de l'huile essentielle (v/v) d'*Anethum graveolens* L. sur *Aspergillus ochraceus*

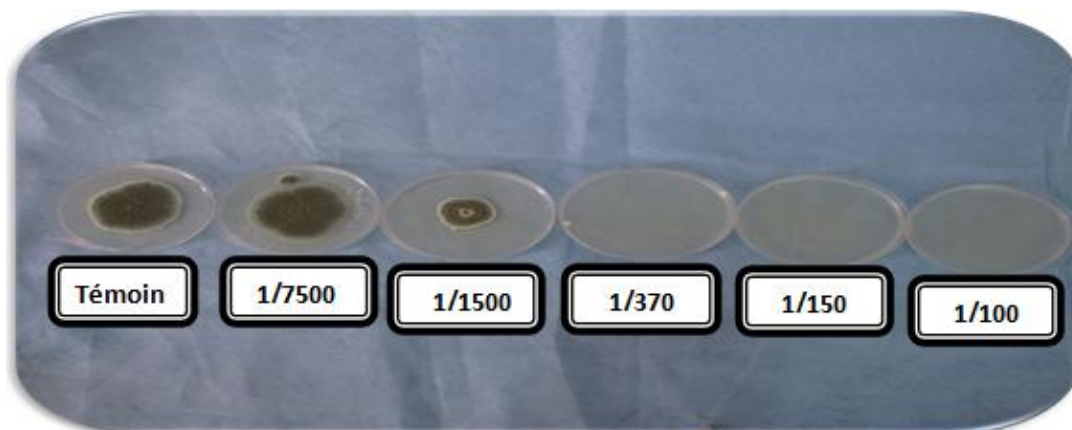


Photo 36. Effet de l'huile essentielle (v/v) d'*Anethum graveolens* L. sur *Penicillium expansum*

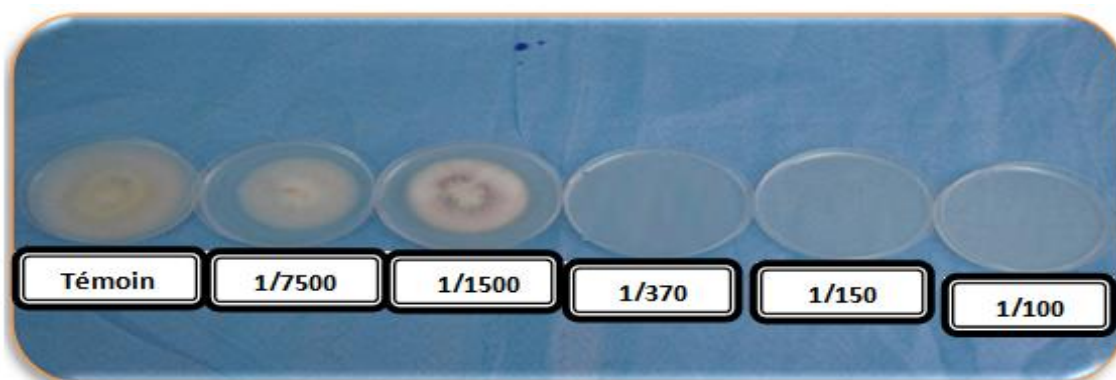


Photo 37. Effet de l'huile essentielle (v/v) d'*Anethum graveolens* L. sur *Fusarium oxysporum f.sp. albedinis*

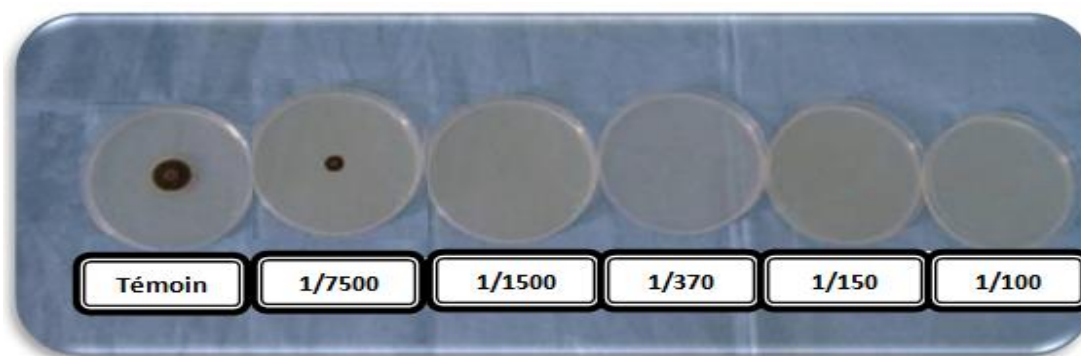


Photo 38. Effet de l'huile essentielle (v/v) d'*Anethum graveolens* L. sur *Alternaria alternata*



Photo 39. Effet de l'huile essentielle (v/v) d'*Anethum graveolens* L. sur *Cladosporium sp*

D'après notre recherche bibliographique approfondie, aucune étude n'a été réalisée sur l'effet des huiles essentielles de PAM d'origine algérienne sur les différentes étapes du développement des champignons.

Outre la croissance du mycélium, les quatre huiles essentielles ont montré, *in vitro*, une activité inhibitrice des spores importante vis-à-vis les deux autres stades de développement, la germination et la sporulation, contre la plupart des souches testées.

Dans l'ensemble, les résultats obtenus dans cette étude révèlent une inhibition significative par les huiles essentielles ou leur fraction volatile tant sur la sporulation des spores que sur la croissance mycélienne des champignons. Néanmoins, leur action sur la germination est ainsi très favorable. Les résultats de l'effet inhibiteur des huiles essentielles sur la germination et la sporulation sont résumés dans les tableaux ci-dessus (15, 16, 17 et 18).

Une concentration de l'HE de *Saccocalyx satureioides* Coss. et Dur. 1/370 v/v était suffisante pour inhiber la sporulation de toutes les souches fongiques ; *Cladosporium sp*, *Alternaria alternata* et *Fusarium oxysporum f.sp. albedinis* sont les souches les plus sensibles, ont été inhibées avec une faible dose de 1/1500 (v/v). Cependant, pour la germination des spores, les résultats (tableaux 15) ont montré que le pourcentage d'inhibition augmente proportionnellement avec la concentration et inversement avec le nombre moyen des spores germées jusqu'à un taux d'inhibition plus élevé à la concentration 1/100 v/v. Notant qu'*Aspergillus ochraceus* présente le taux le plus élevé (89.88%).

L'HE d'*Artemisia campestris* L. exerce une activité inhibitrice de sporulation et germination des spores plus importante que la croissance radiale et plus meilleur que l'effet de l'essence *Saccocalyx satureioides* Coss. et Dur. sur la germination. Toutes les souches ont été inhibées de sporuler et germer à une concentration de 1/100 v/v. *Fusarium oxysporum f.sp. albedinis* s'est montré plus sensible que les autres champignons vis-à-vis la sporulation (1/1500 v/v) et *P. expansum* vis-à-vis la germination (1/370 v/v).

Par ailleurs, l'huile essentielle d'*Ammodaucus leucotrichus* Coss. & Dur. est avérée le plus active entre tous les essences. Une concentration de 1/1500 (v/v) était suffisante pour inhiber la sporulation et la germination des spores de sept souches fongiques. *A. ochraceus*, *Fusarium oxysporum f.sp. albedinis*, *Penicillium expansum*, *Cladosporium sp* et *Alternaria alternata* se sont montrés les plus sensibles, ont été inhibés à partir d'une très faible concentration de l'ordre de 1/7500 (v/v)

L'essence d'*Anethum graveolens* L. possède un effet moins important que l'HE d'*Ammodaucus leucotrichus* Coss. & Dur. L'inhibition totale de la sporulation et la germination des spores de toutes les moisissures a été signalée avec une concentration de

(1/370 v/v). *Fusarium oxysporum f.sp. albedinis* et *Alternaria alternata* se sont montrés plus sensibles que les autres champignons, ils ont été inhibés à partir de 1/1500 (v/v), notant à ce passage qu'*A. flavus* a été inhibé de sporuler avec cette concentration.

Oussalah et al. (2007) attestent que les huiles essentielles inhibent la germination des spores, l'élongation du mycélium, la sporulation et la toxino-génèse chez les moisissures.

Les résultats ci-dessus ne varient pas seulement selon la nature de l'huile essentielle, mais également suivant l'espèce fongique. **Magan et Olsen (2004)** ont montré l'existence de cette différence de sensibilité à l'huile entre différentes espèces appartenant aux mêmes genres et entre les diverses structures fongiques du même genre: spores, sclérotites et fragments mycéliens.

L'inhibition de la sporulation est liée à une inhibition de la croissance mycélienne, notamment avec les concentrations élevées en huile essentielle. Le nombre de conidies est souvent plus élevé chez les espèces qui résistent le plus à l'effet antifongique des huiles essentielles, tel est le cas de *A. niger* et *A. ochraceus*. En outre, où la sporulation est stimulée les mycelia sont plus denses et moins grands que le témoin.

Richter (1993) affirme que les huiles essentielles ont des fonctions multiples l'un de ces fonctions c'est l'inhibition de la germination des champignons. L'activité inhibitrice de trois terpènes citronellol, menthol et α -terpinéol (composé majoritaire (32,65%) de *Saccocalyx satureioides* Coss. et Dur.) a été déjà prouvé par **Belaiche et al. (1996)** sur la germination des spores d'*Aspergillus flavus*, *A. parasiticus* et *A. niger*.

L'empêchement de la germination des conidies est dû aux composés volatils des huiles essentielles. La germination des conidies est la première étape essentielle dans la séquence d'opérations menant à l'établissement d'un tube germinatif et d'un hyphé, par la suite. Le processus commence par l'hydratation suivie de l'action des enzymes lytiques telles que la chitinase et α et β - glucanases. Ceci décompose la paroi cellulaire des conidies épaissie pour permettre l'apparition du tube digestif initial. Une fois que cet événement a lieu, il y a un équilibre entre les systèmes lytiques et synthétiques d'enzymes nécessaires pour la prolongation normale des hyphes. Un déséquilibre dans l'un ou l'autre système d'enzymes mène à l'inhibition et/ou à l'empêchement de croissance (**McEwan, 1994**). Il s'avérerait que ces événements sont fortement susceptibles à la rupture par les composants d'huile volatile.

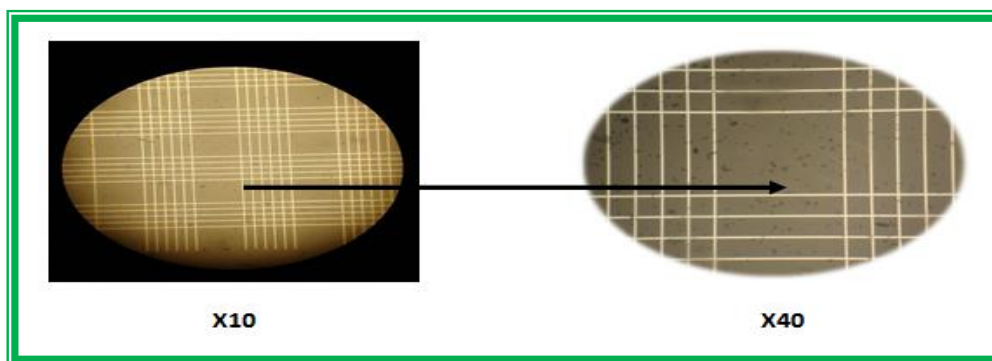


Fig 20. Comptage des spores dans la cellule de Malassez par microscope optique (x10) (x40)



Fig 21. Observation microscopique (x40) des spores germées et non germées d'*Alternaria alternata*

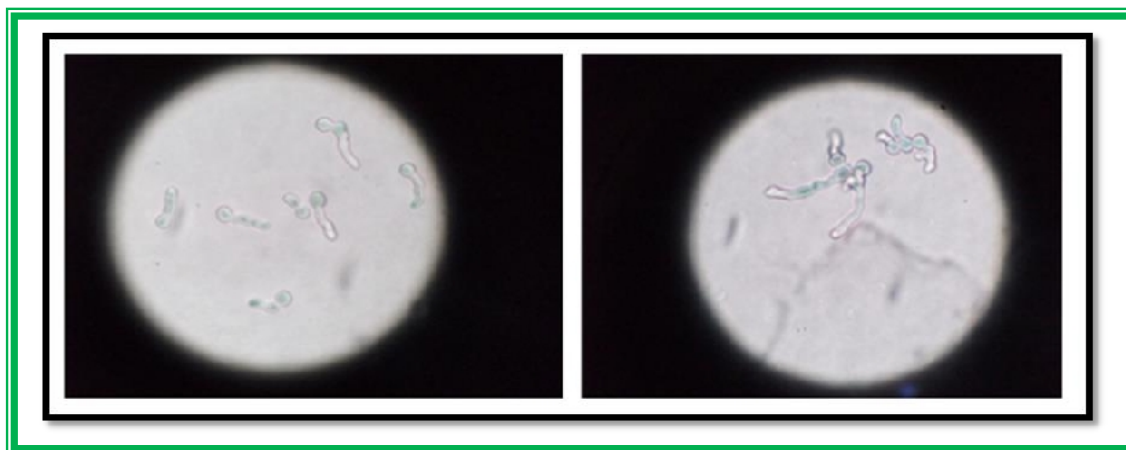


Fig 22. Observation microscopique (x40) des spores germées et non germées d'*A. ochraceus*

Les huiles essentielles sont reconnues par leurs composants naturels, comme les monoterpènes, diterpènes et les hydrocarbures avec des groupes fonctionnels divers.

Selon Akono *et al.* (2012) l'activité biologique d'une huile essentielle est liée à sa composition chimique, leur structure et les groupes fonctionnels de leurs constituants (alcools, phénols, composés terpéniques et cétoniques), ainsi les proportions des composés majoritaires jouent un rôle déterminant (Lahlou, 2004).

L'importance bioactivité de l'huile essentielle de *Saccocalyx satureioides* Coss. et Dur. est en relation avec leur teneur élevée respectivement en alcools terpéniques et composés phénoliques : α -terpinéol (32,65%) et le thymol (22,26%) respectivement, ces deux composés sont connus pour leurs propriétés antimicrobiennes (**Dorman et al, 2000**) et nos résultats corroborent ceux d'autres recherches qui ont démontré que le thymol et le α -terpinéol sont parmi les composés des huiles essentielles les plus actifs contre les champignons du fait de leur grande solubilité dans l'eau et donc ce qui leur confère une haute habilité à pénétrer les parois des cellules fongiques (**El Ajjouri et al, 2008 ; Bourkhiss et al, 2007**). Alors que pour l'huile essentielle d' *Artemisia campestris* L. est due au sesquiterpènes oxygénés représentés par le spathulenol (27,81%) et le Z,E-farnesol (19,08%), concernant elle est moins active comparée aux autres essences, celle ci peut être due à la présence dans l'huile d' *Artemisia campestris* L. des monoterpènes hydrocarbonés tel que limonene (2,46%), β -pinene (2,43%) et α -pinene (2%) reconnus pour leur faible activité antimicrobienne même en quantités relativement faibles (**Amarti et al, 2010**), leur faible solubilité dans l'eau limite leur diffusion à travers les parois des cellules microbiennes (**Soković et al, 2007**). Tandis que pour l'huile d'*Ammodaucus leucotrichus* Coss. & Dur., cette importance bioactivité est essentiellement due à sa richesse en composés monoterpéniques oxygénés représenté par perilla aldehyde (81,62%). Quant l'essence d'*Anethum graveolens* L. est en relation avec leur teneur élevé en apiol (composé d'ester) (32,78%) et en carvone (cétone terpéniques) (31,04%), car le limonene (monoterpènes hydrocarboné) (21,26%) comme déjà signalé, possède une faible activité antimicrobienne (**Amarti et al, 2010**).

Les molécules réputées actives dans une huile essentielle sont des terpénoïdes, car les hydrocarbones saturés et les acétates ioniques sont inactifs, par la nature même de leur faible capacité de liaisons hydrogène et de leur faible solubilité (**Griffin, 1999 ; Wyllie et al, 1999**). Les composants des HEs tels que les terpènes affectent non seulement la perméabilité mais aussi d'autres fonctions dans les membranes cellulaires. Ces composés peuvent traverser les membranes cellulaires, pénètrent ainsi à l'intérieur de la cellule et interagissent avec des sites critiques intracellulaire tels que les enzymes et les protéines, ce qui conduit à la mort cellulaire (**Omidbeygi et al, 2007 ; Cristani et al, 2007**).

Akrouit et al. (2010) ont rapporté que la présence d'une fonction oxygène dans la structure (tel serait le cas de composés oxygénés comme le spathulenol et Z,E-farnesol dans l'HE d' *Artemisia campestris* L. et perilla aldehyde dans l'HE d'*Ammodaucus leucotrichus* Coss. & Dur.) augmente les propriétés bactériostatique et fongistatique des terpénoïdes, ils présentent

une forte activité antimicrobienne plus que les monoterpènes hydrocarbonés. De même les terpènes carbonylés (comme le carvone) et les esters (comme apiol) peuvent aussi participer à l'effet antibactérien et antifongique, ils augmentent l'action bactériostatique et fongistatique.

Soković et al. (2007) ont indiqué que les cétones, aldéhydes et alcools terpéniques possèdent une activité antibactérienne et antifongique, dont cette bioactivité est liée au groupe fonctionnel présent dans la structure, mais dans tous les cas associée à l'hydrogène. Ainsi *in-vitro*, une activité antimicrobienne plus élevée des terpènes oxygénés en comparaison des terpènes hydrocarbures a été observée (**Griffin et al, 1998 ; Dorman et Deans, 2000 ; Cox et al, 2000**).

Par ailleurs, l'efficacité des composés phénoliques et des alcools terpéniques a été démontrée par **Tripathi et al. (1985)** sur les champignons tels que *Alternaria alternata* et *Colletotrichum capsicii*. Dans une autre étude, **Chaumont et Leger (2001)** ont testé 12 composés aromatiques vis-à-vis de huit souches pathogènes *Candida albicans*, *Aspergillus fumigatus*, *Microsporum canis* et *Trichophyton spp.* Ils concluent que les phénols sont plus antifongiques. Ils présentent également des propriétés fongistatiques très marquées.

En parallèle, Beaucoup de travaux ont souligné l'efficacité antifongique des phénols et alcools terpéniques et plus particulièrement celle du thymol et/ou du α -terpinéol (**Crespo et al, 1990 ; Cosentino et al, 1999 ; Arras et al, 2001 ; Chebli et al, 2003 ; Hammer et al, 2003 ; Pepeljnjak et al, 2003**). Des études réalisées par l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS, 1999) ont également montré que le thymol possède une forte activité antifongique et antibactérienne contre de nombreuses espèces, y compris *Aspergillus sp.*, *S. aureus* et *E. coli*. **Cosentino et al. (1999)** attestent que plus les teneurs en phénols sont élevées, plus l'efficacité antimicrobienne des huiles essentielles est grande.

Contre les champignons, les phénols et les alcools terpéniques des huiles essentielles provoquent plusieurs dégâts tels que des perturbations morphologiques des hyphes mycéliens, la rupture de la membrane plasmique et l'altération de la structure des mitochondries (**Arras et al, 2001 ; De Billerbeck et al, 2001**). Selon **Farag et al. (1989)**, la présence des groupements OH dans les composés phénoliques est capable de former des liaisons hydrogènes avec les sites actifs des enzymes et d'accroître l'activité antimicrobienne.

D'ailleurs, le mécanisme de la toxicité phénolique et alcoolique est basé aussi sur l'inactivation des enzymes fongiques contenant le groupement SH dans leur site actif (**Farag et al, 1989 ; Cowan, 1999**). Les terpènes phénoliques et alcooliques agissent aussi en se fixant sur les groupes amine et hydroxylamine des protéines membranaires microbiennes

provoquant l'altération de la perméabilité et la fuite des constituants intracellulaires (**Knowles et al, 2005 ; Lopez-Malo et al, 2005**).

Dans une étude réalisée par **Tian et al. (2011)**, l'observation microscopique d'*Aspergillus niger* avec microscope électronique à balayage après traitement par l'huile essentielle des grains d'*Anethum graveolens* L. (1 µl/ml) a révélé des modifications dégénératives dans les têtes des conidies et la morphologie des hyphes, diminution dans les diamètres des hyphes, des agrégats hyphes échaudés et un gonflement de la paroi fongique. Pour bien élucider le mécanisme d'action antifongique de cette essence, l'effet sur la membrane plasmique et les mitochondries d'*Aspergillus flavus* a été étudiée. La lésion de la membrane plasmique est déterminée par la cytométrie en flux et vérifiée par l'inhibition de la synthèse de l'ergostérol. Les résultats ont montré que l'huile essentielle a provoqué : des changements morphologiques dans les cellules d'*A. flavus*, une diminution de la quantité d'ergostérol, une élévation dans le potentiel de la membrane mitochondriale (MMP), une diminution dans les activités d'ATPase et déshydrogénase mitochondriales et par conséquent une accumulation d'espèces réactives de l'oxygène (ROS).

L'efficacité antifongique d'une huile essentielle peut être due aussi à l'effet synergique entre leurs constituants (**Dorman et al, 2000**), plus en détails, **Tian et al. (2011)** attestent que l'effet synergique des principaux composants d'une HE est responsable de leur activité antifongique.

Cependant, les constituants dominants ne sont pas les seules responsables de l'intégralité de l'activité, la totalité de la composition chimique doit être prise en compte. **Senhaji et al. (2006)** ont rapporté que les composés minoritaires joueraient également un rôle important dans l'activité des HEs qui sembleraient agir en synergie d'action avec les composés majoritaires. A cet effet, Il est frappant de noter que la bioactivité de l'essence *Saccocalyx satureioides* Coss. et Dur., peut être due aussi à l'effet synergique entre le thymol (22.26%) et le carvacrol (2.79%) car, la synergie entre ces deux phénols a été constatée dans plusieurs études (**Crespo et al, 1990 ; Didry et al, 1993 ; Deferera et al, 2000**).

En effet, certaines études ont montré que l'activité antimicrobienne des huiles essentielles peut être supérieure à celle de ces composés majoritaires testés séparément (**Lahlou et al, 2004**). Donc, la dominance d'activité des essences sur celle d'un composant majoritaire confirme bien l'effet de synergie que pourrait apporter les composants minoritaires à l'activité des HEs (**Franchomme, 1981 ; Lahlou et al, 2004**). De cette manière, la valeur d'une huile essentielle tient à son « totum », c'est à dire dans l'intégralité de ses composants et non seulement à ses composés majoritaires (**Lahlou, 2004**).

IV.2. Activité antimycotoxinogène

IV.2.1. Effet sur milieu YES

Le problème de réduction des mycotoxines est plutôt complexe, plusieurs méthodes ont été proposées en s'attaquant au développement des moisissures (activité antifongique) (Canet, 1999). La littérature révèle qu'aucune étude n'a été publiée, à ce jour, portant sur l'activité antimycotoxinogène de nos essences.

Dans l'optique de compléter les testes antérieurs de nos huiles essentielles sur l'action antifongique, nous jugeons intéressant de poursuivre cette étude et d'aller plus loin dans la détermination de l'efficacité de ces essences végétales contre la mycotoxinogénèse de certaines souches productrices des mycotoxines : trois souche d'*Aspergillus flavus* et une souche d'*Aspergillus ochraceus*. La technique de culture sur milieu YES a permis de tester la production d'aflatoxine ou d'ochratoxine à partir des souches isolées. C'est un milieu riche en vitamine B complexes, ainsi qu'il favorise la métabolisation secondaire et induit les réactions anabolisantes (Yrjonen, 2004). Les résultats obtenus par cette technique fondée sur les mesures de poids des biomasses formées en milieu liquide sous l'action des différentes concentrations des huiles essentielles sont illustrés dans le tableau 19.

Communément, les essences faisant l'objet de cette étude ont montré une importante activité inhibitrice vis-à-vis ces souches fongiques productrices des mycotoxines, à l'exception de l'HE d'*Artemisia campestris* L. qui est modérément active. Oussalah *et al.* (2007) attestent que les huiles essentielles agissent sur la biomasse et la production de pseudomycélium.

Une concentration de 1/370 (v/v) de l'huile essentielle *Saccocalyx satureioides* Coss. et Dur. était suffisante pour inhiber totalement les biomasses formées et donc la production des mycotoxines de toutes les souches fongique testées. Zerroug *et al* (2011) ont testé et prouvé l'effet antifongique de cette essence contre la croissance de *Ascochyta rabiei* et la production de solanapyrone A, ils ont obtenu une inhibition totale pour une concentration de 6,3 mg / ml et 1,5 mg / ml d'huile essentielle en fonction de la concentration de l'inoculum.

En revanche, l'huile essentielle d'*Artemisia campestris* L. est avérée le moins active sur l'action antimycotoxinogène par rapport aux autres huiles. Les souches d'*Aspergillus flavus* se sont montrés très résistants car, la sécrétion des mycotoxines n'a pas été inhibée totalement même à une grande concentration (1/100 v/v). Cependant, *Aspergillus ochraceus* a montré un comportement de sensibilité différent à l'égard de cette essence, il a été inhibé à partir de 1/150 (v/v). De même, l'huile essentielle d'*Ammodaucus leucotrichus* Coss. & Dur. possède

un bon effet contre la mycotoxinogénèse des quatre souches testées, la 1^{ère} souche d'*A. flavus* (S1) a été inhibée à partir une concentration de 1/1500 (v/v), suivi par la 2^{ème} souche S2 (1/370 v/v) et enfin la 3^{ème} souche S3 (1/150 v/v). Cependant, *Aspergillus ochraceus* a été inhibé à partir de 1/370 (v/v). Quant, l'essence d'*Anethum graveolens* L. a inhibé la formation des biomasses mycéliennes de la 1^{ère} et la 2^{ème} souche (S1 et S2) à partir des concentrations de l'ordre de 1/370 v/v et 1/150 v/v respectivement. Alors que, la 3^{ème} souche (S3) d'*A. flavus* et *Aspergillus ochraceus* se sont montrés plus sensible, ils ont été inhibés à une faible concentration de 1/7500 v/v. Dans une autre étude, **Tian et al. (2011)** ont montré que cette essence à la concentration de 2 µl/ml a inhibé la production de biomasse dans un milieu liquide d'*A. flavus*, *A. oryzae*, *A. niger* et *Alternaria alternata*.

Tableau 20. Activité antimycotoxinogène de différentes huiles essentielles exprimé en (%)

		<i>A. flavus</i> (S1)	<i>A. flavus</i> (S2)	<i>A. flavus</i> (S3)	<i>A. ochraceus</i>
Témoin	a	0	0	0	0
	b	0	0	0	0
	c	0	0	0	0
	d	0	0	0	0
1/7500 (V/V)	a	53.27±0.3	41.90±0.4	22.22±0.5	3.60±0.6
	b	22.45±0.4	20.94±0.2	13.44±0.3	9.80±0.4
	c	10.38±0.9	8.75±0.5	40.89±0.3	59.01±0.5
	d	50±0.1	38±0.3	100***	100***
1/1500 (V/V)	a	71.27±0.1	51.85±0.2	49.49±0.3	28.20±0.4
	b	38.27±0.3	41.88±0.2	34.95±0.3	19.60±0.5
	c	100***	13.40±0.5	41.96±0.3	90.86*
	d	90*	40±0.3	100***	100***
1/370 (V/V)	a	100***	100***	100***	100***
	b	43.37±0.3	47.12±0.2	45.70±0.2	58.82±0.1
	c	100***	100***	71.42±0.2	100***
	d	100***	73±0.1	100***	100***
1/150 (V/V)	a	100***	100***	100***	100***
	b	48.47±0.4	50.26±0.2	56.45±0.1	100***
	c	100***	100***	100***	100***
	d	100***	100***	100***	100***
1/100 (V/V)	a	100***	100***	100***	100***
	b	63.78±0.2	68.06±0.2	72.58±0.1	100***
	c	100***	100***	100***	100***
	d	100***	100***	100***	100***

a : *Saccocalyx satureioides* Coss. et Dur.; b : *Artemisia campestris* L. ; c : *Ammodaucus leucotrichus* Coss. & Dur. ; d : *Anethum graveolens* L. ; S : Souche

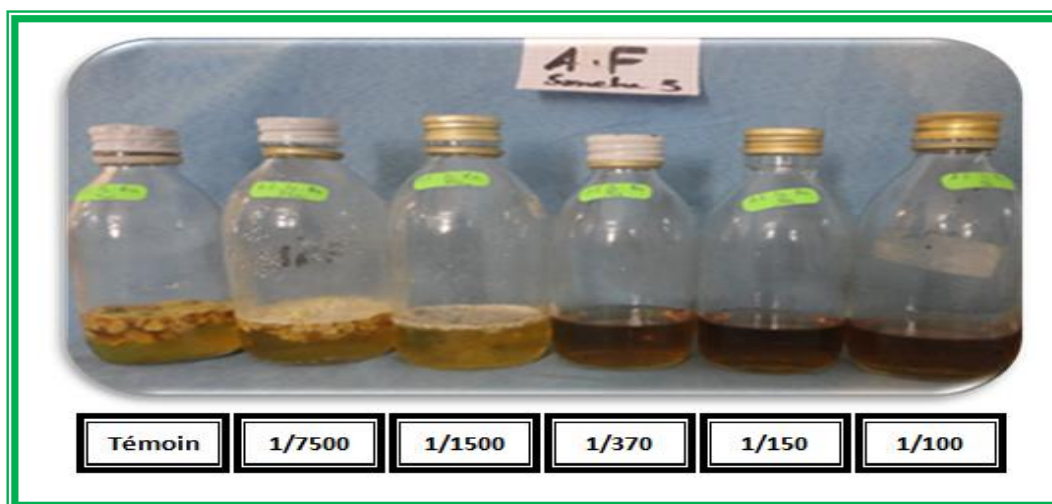


Photo 40. *Aspergillus flavus* (S3) cultivée en milieu YES en présence des différentes concentrations (v/v) de l'HE de *Saccocalyx satureioides* Coss. et Dur.

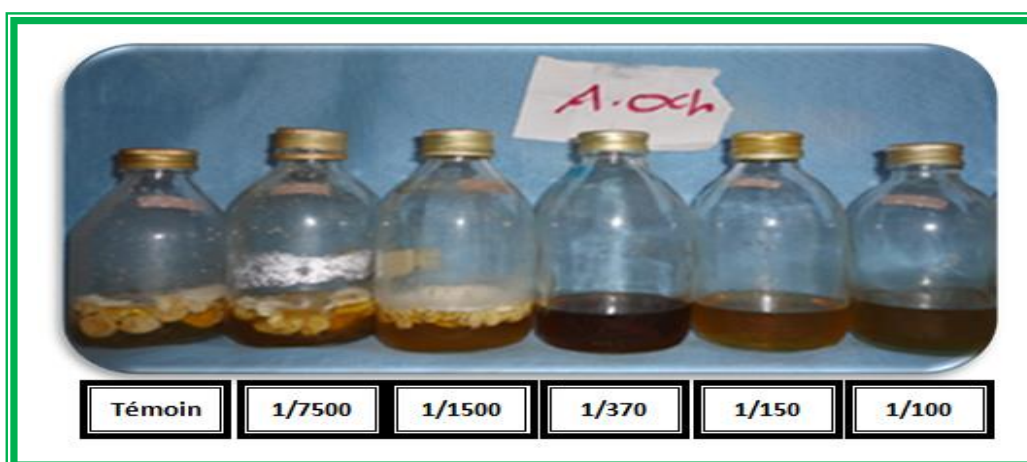


Photo 41. *Aspergillus ochraceus* cultivée en milieu YES en présence des différentes concentrations (v/v) de l'HE de *Saccocalyx satureioides* Coss. et Dur.

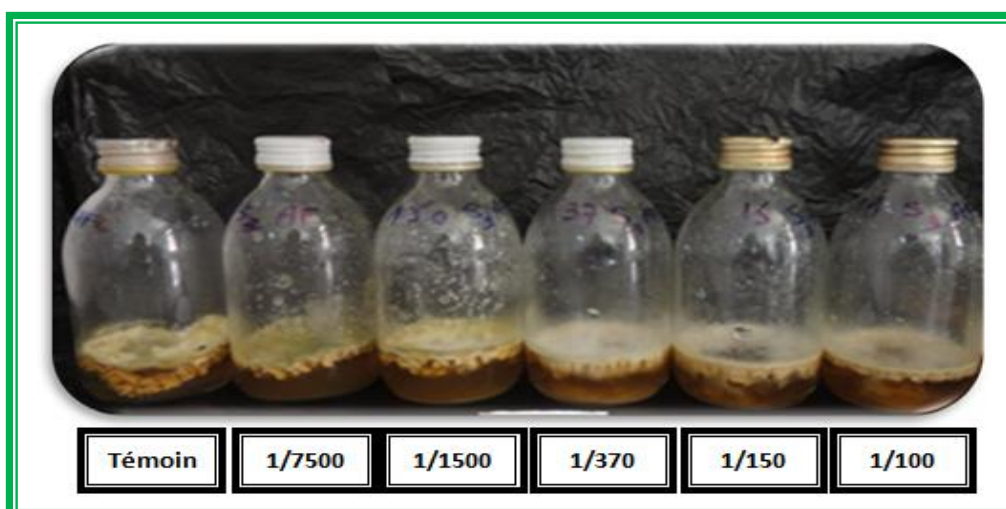


Photo 42. *Aspergillus flavus* (S2) cultivée en milieu YES en présence des différentes concentrations (v/v) de l'HE d'*Artemisia campestris* L.



Photo 43. *Aspergillus ochraceus* cultivée en milieu YES en présence des différentes concentrations (v/v) de l'HE d'*Artemisia campestris* L.



Photo 44. *Aspergillus flavus* (S1) cultivée en milieu YES en présence des différentes concentrations (v/v) de l'HE d'*Ammodaucus leucotrichus* Coss. & Dur.



Photo 45. *Aspergillus ochraceus* cultivée en milieu YES en présence des différentes concentrations (v/v) de l'HE d'*Ammodaucus leucotrichus* Coss. & Dur.

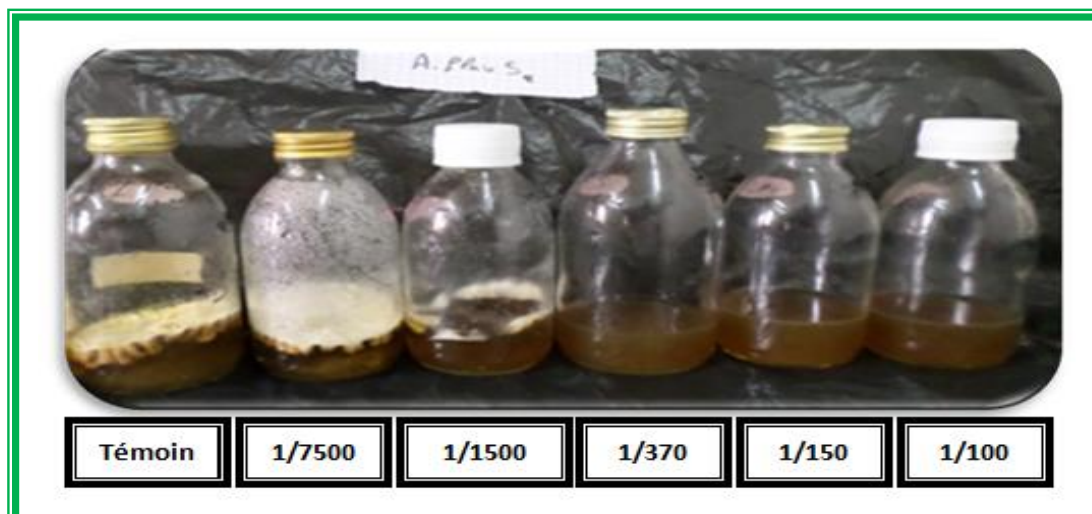


Photo 46. *Aspergillus flavus* (S1) cultivée en milieu YES en présence des différentes concentrations (v/v) de l'HE d'*Anethum graveolens* L.



Photo 47. *Aspergillus ochraceus* cultivée en milieu YES en présence des différentes concentrations (v/v) de l'HE d'*Anethum graveolens* L.

IV.2.2. Révélation des souches productrices de mycotoxines par CCM

Les résultats de la dernière tentative démontrant l'effet des HEs sur la synthèse des mycotoxines révélé par la chromatographie sur couche mince sont présentés sur les chromatogrammes (Fig 56, 57, 58, 59, 60, 61 et 62).

Les CCMs ont montré une bonne séparation chromatographique car les éluants choisis (chloroforme/ acétone ; v/v) ont donné une meilleure migration des spots (séparation visible).

Cette séparation chromatographique sur couche mince a permis de confirmer les résultats obtenus avec ceux des biomasses formées.

Les espèces *Aspergillus flavus* produisent une seule toxine Aflatoxine B1 (AFB1) qui apparaît avec une fluorescence bleue, alors que l'espèce *Aspergillus ochraceus* produit l'ochratoxine A (OTA) qui dévoile une fluorescence verte sous lampe UV pour les différentes concentrations des HEs où il avait la production des biomasses avec le même Rf (facteur de rétention) vis-à-vis les témoins. Par contre les CCMs montrent une absence de fluorescences au niveau des souches mycéliennes après 14 jours de cultures sur le milieu YES en présence de différentes concentrations d'HEs où il n'avait pas des biomasses formées. Cette absence de fluorescences indique l'inhibition de la mycotoxinogénèse sous l'effet des HEs.

Selon **Thanaboripat et al. (1997)** ; **Bhatnagar et McCormick (1988)** les extraits obtenus à partir des parties supérieures de plantes possèdent la capacité de supprimer la croissance des champignons toxigènes et par conséquent, la production de toxines dans les supports synthétiques. Ils peuvent aussi bloquer entièrement la biosynthèse des mycotoxines (**Bhatnagar et McCormick, 1988**).

Hua et al (1999) rapportent que les composés phénoliques inhibent au début plutôt qu'à la fin des étapes de la voie de biosynthèse d'AFB1. **Ghorbanian et al (2008)** indique que l'inhibition de la synthèse des aflatoxines est en relation avec le temps de contact et la dose de l'extrait.

Cette activité antimycotoxinogène des huiles essentielles, traduite par l'absence de fluorescence au niveau des souches potentiellement toxigènes pourraient être due, soit à une réaction entre la mycotoxine (si elle était déjà produite) et l'huile essentielle qui formeraient un complexe non fluorescent sous UV ; ou à une inhibition de la production de la mycotoxine par la souche fongique en présence de l'huile essentielle, favorisée par l'aptitude de cette dernière à traverser la membrane plasmique (**Adjou et Soumanou, 2013**).

En effet, selon **Adjou et Soumanou (2013)**, l'activité des huiles essentielles résiderait non seulement dans leur aptitude à traverser la paroi cellulaire mais aussi serait liée à leur aptitude à endommager le système enzymatique cellulaire, y compris celui relatif à la production d'énergie. Selon les travaux de **Nogueira et al. (2010)** elle provoque des changements pathologiques au niveau du système endomembranaire, principalement la membrane plasmique et les organites membraneux, surtout les mitochondries. **Razzaghi-Abyaneh et al, (2008)** ont également signalé des changements au niveau de la mitochondrie ainsi que la perturbation des membranes nucléaires et du réticulum endoplasmique.

Enfin, on peut dire que le dépistage d'agents bioactifs à partir des plantes est l'un des axes les plus intensifs dans la recherche des produits naturels aujourd'hui, car l'activité des HEs de plantes présente un grand intérêt en particulier contre les souches multi résistantes, mais le domaine est loin d'être épuisé et seulement 10% de toutes les plantes avaient été étudiées en détail pour leur agents bioactifs (Abdel ghani *et al*, 2008).

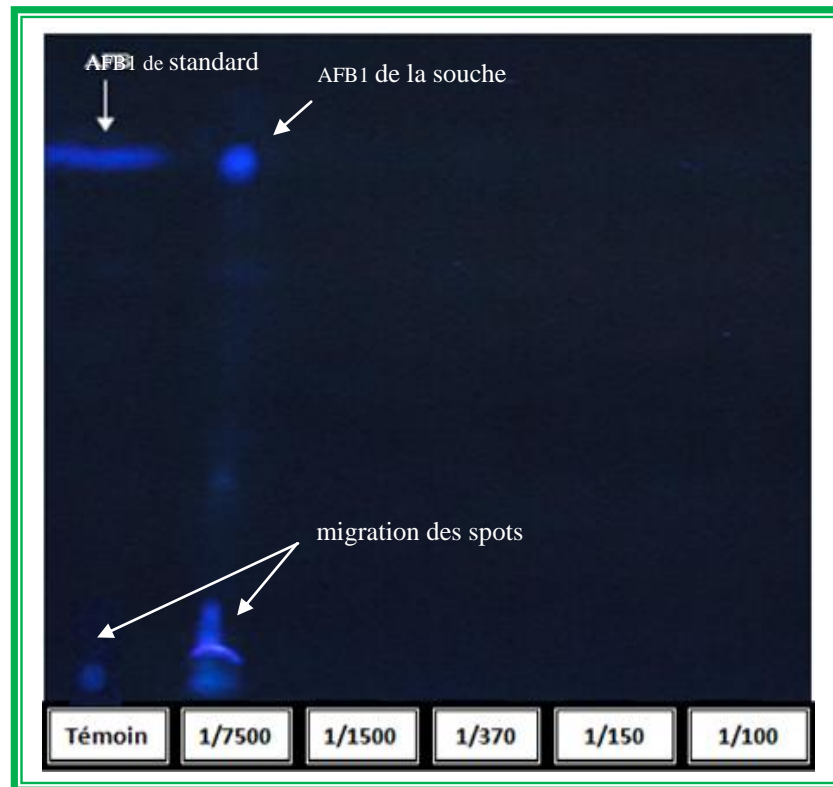


Photo 48. CCM sous UV des isolats d'*Aspergillus flavus* (S1) cultivée en milieu YES en présence des différentes concentrations (v/v) de l'HE d'*Ammodaucus leucotrichus* Coss. & Dur.

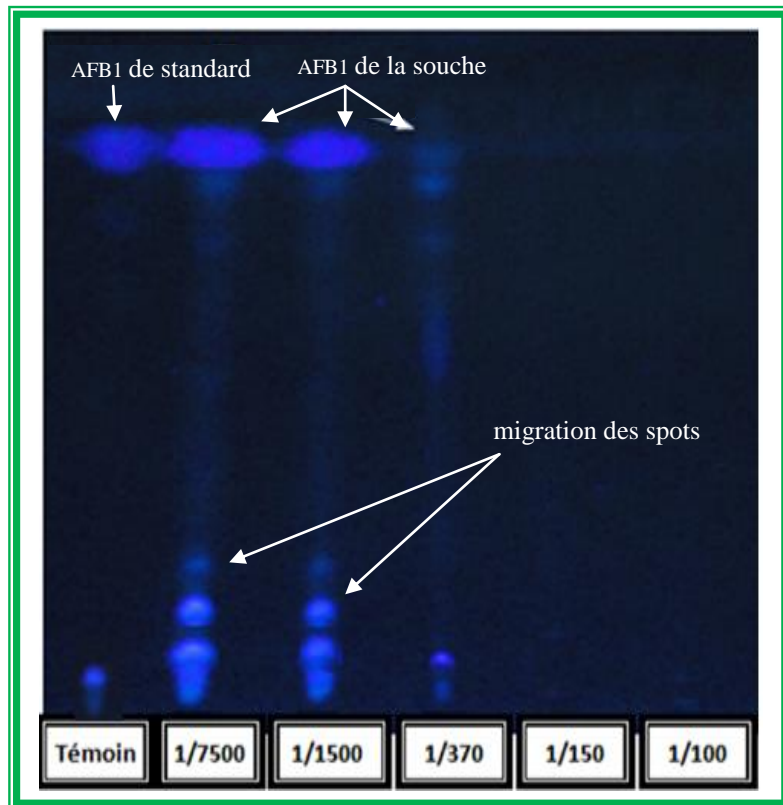


Photo 49. CCM sous UV des isolats d'*Aspergillus flavus* (S2) cultivée en milieu YES en présence des différentes concentrations (v/v) de l'HE d'*Anethum graveolens* L.

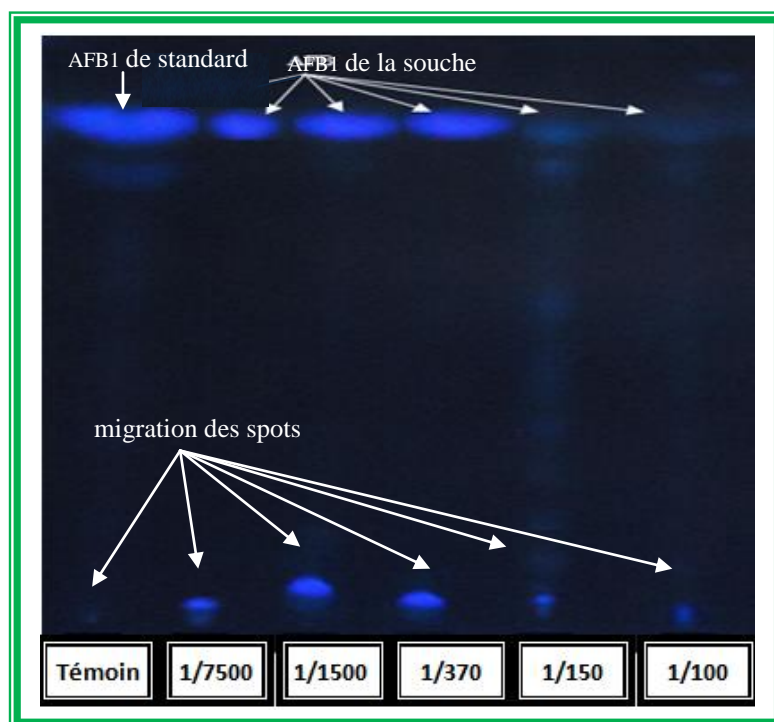


Photo 50. CCM sous UV des isolats d'*Aspergillus flavus* (S3) cultivée en milieu YES en présence des différentes concentrations (v/v) de l'HE d'*Artemisia campestris* L.

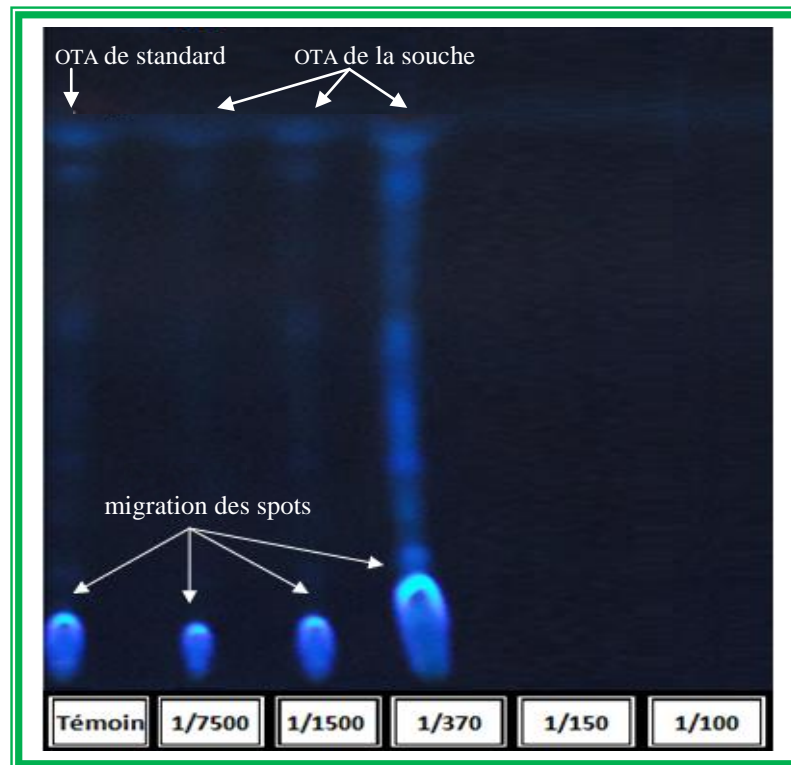


Photo 51. CCM sous UV des isolats d'*Aspergillus ochraceus* cultivée en milieu YES en présence des différentes concentrations (v/v) de l'HE d'*Artemisia campestris* L.

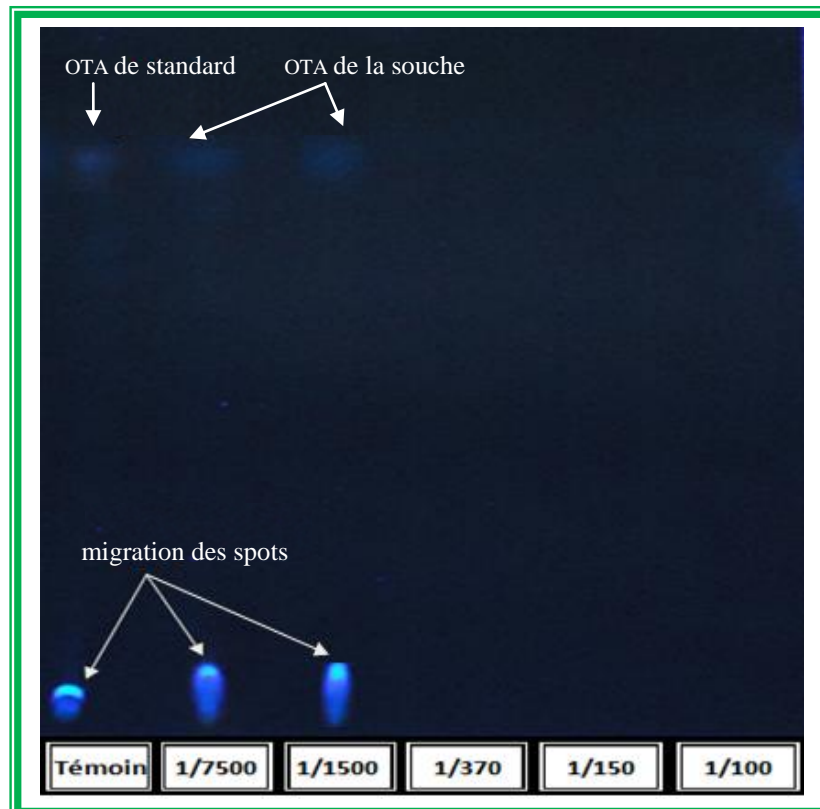


Photo 52. CCM sous UV des isolats d'*A. ochraceus* cultivée en milieu YES en présence des différentes concentrations (v/v) de l'HE de *Saccocalyx satureioides* Coss. et Dur.

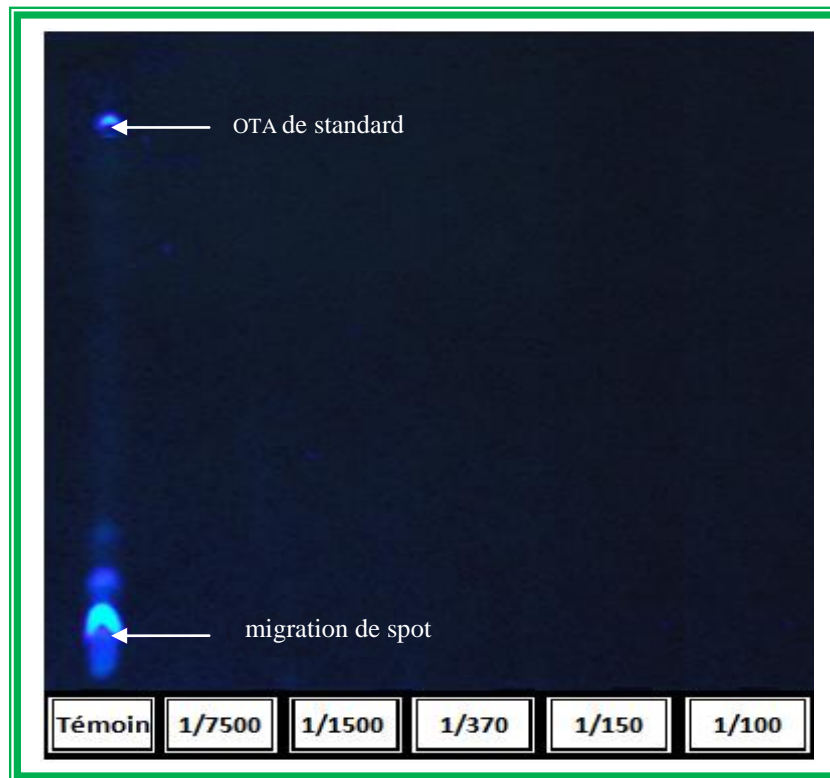


Photo 53. CCM sous UV des isolats d'*A. ochraceus* cultivée en milieu YES en présence des différentes concentrations (v/v) de l'HE d'*Anethum graveolens* L.

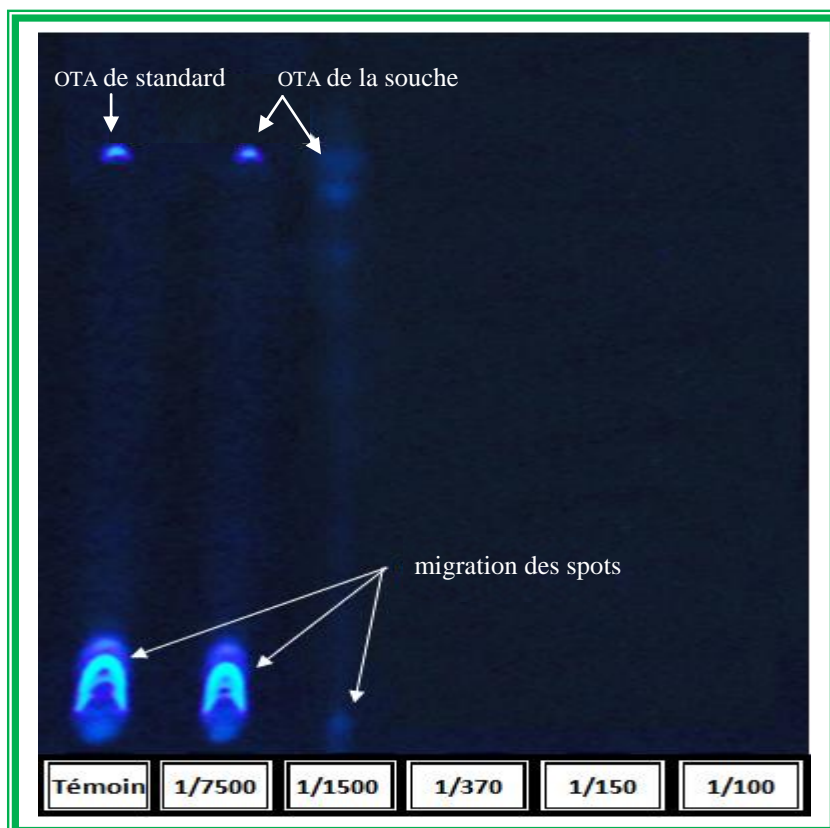
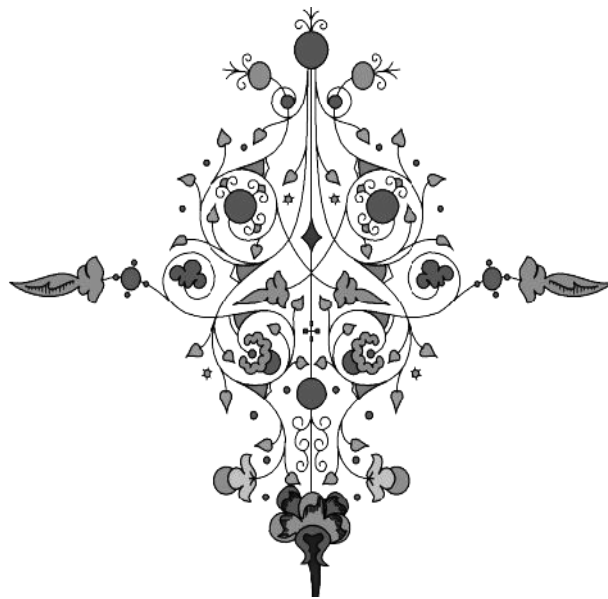


Photo 54. CCM sous UV des isolats d'*A. ochraceus* cultivée en milieu YES en présence des différentes concentrations (v/v) de l'HE d'*Ammodaucus leucotrichus* Coss. & Dur.



Conclusion générale



CONCLUSION GENERALE

La recherche de nouvelles substances antimicrobiennes purement naturelles est la préoccupation capitale de la plupart des gens et des chercheurs, actuellement. Pour cela une évaluation de l'activité antifongique des huiles essentielles de quatre plantes aromatiques et médicinales récoltées dans le Sud-ouest algérien : *Saccocalyx satureioides* Coss. et Dur., *Artemisia campestris* L., *Ammodaucus leucotrichus* Coss. & Dur. et *Anethum graveolens* L., est faite sur la germination, la croissance mycélienne, la sporulation et la sensibilité fongique mycotoxicologique.

De par leurs profils chromatographiques, les huiles essentielles extraites par hydrodistillation de ces plantes possèdent des propriétés organoleptiques très appréciées et seront très convoitées en aromathérapie. Elles ont fourni un bon rendement en huile essentielle, qui s'échelonne entre 2,10% à 2,41% sauf, à celui obtenu à partir d'*Artemisia campestris* L. qui est 0,37%.

La détermination des propriétés physico-chimiques (densité, pouvoir rotatoire, indice de réfraction, indice d'acide, de peroxyde,...etc.) des essences recueillies ont permis de s'assurer leurs puretés et la possibilité de l'utiliser dans les préparations pharmaceutiques.

Il résulte que le potentiel antifongique de nos huiles essentielles montré dans cette étude pourrait être attribué à des terpènes oxygénés surtout alcooliques et phénolique qui sont démontrés majoritaires dans l'HE de *Saccocalyx satureioides* Coss. et Dur. comme le α -terpinéol (32,65%) et le thymol (22,26%), des sesquiterpènes oxygénés représentés par le spathulenol (27,81%) et le Z,E-farnesol (19,08%) pour l'HE d' *Artemisia campestris* L., des composés monoterpéniques oxygénés représenté par le perilla aldehyde (81,62%) dans le cas d'HE d'*Ammodaucus leucotrichus* Coss. & Dur., et des composés ester et cétones terpéniques comme le apiol (32,78%) et le carvone (31,04%) pour l'HE d'*Anethum graveolens* L.

Parmi les quatre essences, L'HE d'*Ammodaucus leucotrichus* Coss. & Dur. est avérée le plus efficace sur la croissance des champignons. Toutes les souches fongiques ont été inhibées à une très faible concentration de l'ordre de 1/3000 v/v, suivie, par l'HE de *Saccocalyx satureioides* Coss. et Dur. avec une CMI de 1/880 v/v. Alors que l'HE d'*Anethum graveolens* L. vient en troisième position avec une CMI de 1/500 v/v. Cependant, l'HE d'*Artemisia campestris* L. est avérée le moins active sur la croissance mycélienne par rapport aux autres huiles, la totalité des souches testées ont été inhibées avec une forte CMI de 1/70 v/v.

Nos essences à une concentration de 1/370 v/v ont été fongicides pour toutes les souches testées. Sauf l'HE d'*Artemisia campestris* L. n'exerce aucun effet fongicide, elle possède un effet fongistatique et *Anethum graveolens* L. a été fongicide pour *A. niger* à 1/150 (v/v).

Outre la croissance du mycélium, les quatre huiles essentielles ont montré, *in vitro*, une activité inhibitrice des spores importante vis-à-vis les deux autres stades de développement, la germination et la sporulation, contre la plupart des souches testées. Les résultats obtenus révèlent une inhibition significative par les huiles essentielles ou leur fraction volatile tant sur la sporulation des spores que sur la croissance mycélienne des champignons. Néanmoins, leur action sur la germination est ainsi très favorable. L'HE d'*Ammodaucus leucotrichus* Coss. & Dur. est avérée le plus active entre tous les essences. Une concentration de 1/1500 (v/v) était suffisante pour inhiber la sporulation et la germination des spores de tous les champignons.

Communément, les essences faisant l'objet de cette étude ont montré une importante activité antimycotoxinogène vis-à-vis les souches fongiques productrices des mycotoxines, à l'exception de l'HE d'*Artemisia campestris* L. qui est modérément active.

Ainsi, les méthodes *in vitro* utilisées pour confirmer l'activité antifongique de différentes huiles essentielles sont insuffisantes et nécessitent d'autres tests supplémentaires plus avancées *in vivo* mais aussi contre les bactéries.

Finalement, l'objectif premier de cette étude a été atteint puisque nous avons contribué à caractériser ces huiles essentielles pour une éventuelle utilisation en phytothérapie. Ceci montre que la flore du Sud-ouest algérien peut constituer une réserve importante d'espèces végétales intéressantes et l'effet inhibiteur de ces huiles sur le développement fongique laisse entrevoir des perspectives d'application dans plusieurs domaines tels que l'industries agroalimentaire, cosmétique et pharmaceutique.

Résumé des différents modes d'utilisation :



Voie orale :
Dilution obligatoire sur un support. Nécessite une demande de conseil auprès d'un professionnel de santé.



Application cutanée et massage :
Utilisation pure ou diluée.



Actif cosmétique :
Ajout possible dans certaines de vos cosmétiques "maison" à froid, en fin de préparation, jusqu'à 2% pour un soin "visage" ou 5% pour un soin "corps".



Bain aromatique :
Mélange dans un dispersant obligatoire.



Diffusion atmosphérique :
A l'aide d'un diffuseur ou brumisateur adapté ou sur un tissu ou un galet.



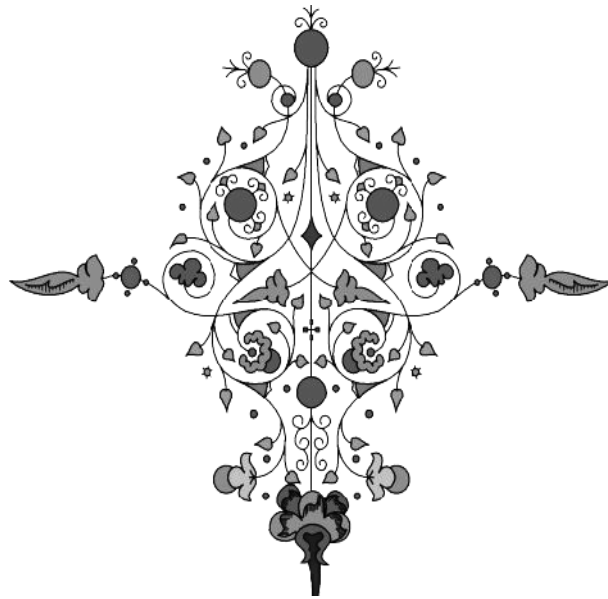
Cuisine :
Une à 2 gouttes suffisent pour parfumer vos plats de façon originale et durable.



Faite des savons parfumés



Références Bibliographiques



RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Abdel ghani S.B, Weaver L, Zidan Z.H, Hussein M.A, Keevil C.W, Brown R.C.D (2008). Microwave-assisted synthesis and antimicrobial activities of flavonoid derivatives. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 18, 518-522.
- Abu Zarga M.H, Al-Jaber H.I, Baba Amer Z.Y, Sakhril L, Al-Qudah M.A, Al-humaidi J.Y.G, Abaza I.F, Afifi F.U (2013). Chemical Composition, Antimicrobial and Antitumor Activities of Essential Oil of *Ammodaucus leucotrichus* Growing in Algeria. *Journal of Biologically Active Products from Nature*, 3:3, 224-231.
- Adams R.P (2007). Identification of essential oil components by gas chromatography / mass spectrometry, 4th Ed. Allured Publishing Co .Carol Stream, Illinois.
- Adl S.M, Simpson A.G, Farmer M.A, Andersen R.A et al. (2005). The new higher level classification of eukaryotes with emphasis on the taxonomy of protists. *Journal of Eukaryotic Microbiology* 52, 399-451.
- Adjou E.S, Soumanou M.M (2013). Efficacité des extraits de plantes dans la lutte contre les moisissures toxigènes isolées de l'arachide en post-récolte au Bénin. *Journal of Applied Biosciences*, 70 : 5555– 5566.
- AFNOR (2000). Huiles essentielles. Echantillonnage et méthodes d'analyse (Tome 1) - Monographies relatives aux huiles essentielles (Tome 2. Volumes 1 et 2). Mars 2000.
- Afssaps : Agence française de sécurité sanitaire des produits de santé (2008). Recommandation relatives aux critères de qualité des huiles essentielles, Contribution pour l'évaluation de la sécurité des produits cosmétiques contenant des huiles essentielles. Mai 2008.
- Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments (2006). Rapport synthétique : Évaluation des risques liés à la présence de mycotoxines dans les chaînes alimentaires humaine et animale. pp 8.
- Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments (2009). Rapport final : Evaluation des risques liés à la présence de mycotoxines dans les chaînes alimentaires humaine et animale. 308 p.
- Akono P.N, Belong P, Tchoumboungang F, Bakwo Fils E.M , Fankem H (2012). Composition chimique et effets insecticides des huiles essentielles des feuilles fraîches d'*Ocimum canum Sims* et d'*Ocimum basilicum L.* sur les adultes d'*Anopheles funestus* ss, vecteur du paludisme au Cameroun. *Journal of Applied Biosciences* 59: 4340–4348.

- Akrout A, Chemli R.C, Chrief, Hammami M (2001). Analysis of the essential oil of *Artemisia campestris L.* J. Flavour Fragr. 16: 337–339.
- Akrout A, El Jani H, Amouri S, Neffati M (2010). Screening of Antiradical and Antibacterial Activities of Essential Oils of *Artemisia campestris L.*, *Artemisia herba alba Asso*, & *Thymus capitatus Hoff. Et Link.* Growing Wild in the Southern of Tunisia. Recent Research in Science and Technology 2(1): 29–39.
- Akrout A, Gonzalez L.A, El Jani H.J, Madrid P.C (2011). Antioxidant and antitumor activities of *Artemisia campestris* and *Thymelaeahirsuta* from southern of Tunisia. J. Food. Chem. Tox. 49: 342–347.
- Al-Ismail K.M, Aburjai T (2004). Antioxidant activity of water and alcohol extracts of chamomile flowers, anise seeds and dill seeds. Journal of the Science of Food and Agriculture, Volume 84, Issue 2, pp 173–178.
- Amarti F, Satrani B, Aafi A, Ghanmi M, Farah A, Aberchane M, El Ajjouri M, El Antry S, Chaouch A (2008). Composition chimique et activité antimicrobienne des huiles essentielles de *Thymus capitatus* et de *thymus bleicherianus* du Maroc. Phytothérapie, Springer (2008) 6 : 342-347.
- Amarti F, Satrani B, Ghanmi M, Abdellah F, Abderrahman A, Lotfi A, Mustapha E, Abdelaziz C (2010). Composition chimique et activité antimicrobienne des huiles essentielles de *Thymus algeriensis Boiss. Reut.* et *Thymus ciliates (Desf.) Benth.* du Maroc. Biotechnol. Agron. Soc. Environ 2010; 14(1): 141-148.
- Anne-Laure (2002). Phytochemical investigation of plants used in African traditional medicine: “*Dioscorea sylvatica*” (Dioscoreaceae), “*Urginea altissima*” (Liliaceae), “*Jamesbrittenia fodina*” and “*J. Elegantissima*” (Scrophulariaceae). Thèse de Doctorat, Université de Lausanne.
- Anton R, Lobstein A (2005). Olantes aromatiques. Epices, aromates, condiments et huiles essentielles ; Tec et Doc, Paris, 522 p.
- Arras G, Usai M (2001). Fungitoxic activity of twelve essential oils against four postharvest Citrus pathogens: chemical analysis of *Thymus capitatus (L.)* oil and its effect in subatmospheric pressure conditions. J. Food Prot., 64, 1025-1029.
- Attokaran M (2011). Natural Food Flavors and Colorants. Published by Oxford : Wiley-Blackwell, 429 p.
- Baba-Aissa F (2000). Encyclopédie des plantes utiles, flore d’Algérie et du Maghreb, substances végétales d’Afrique, d’Orient et d’Occident. EDAS Algérie.

- Bakkali F, Averbeck S, Averbeck D (2008). Review MI. Biological effects of essential oils. A review Food and Chemical Toxicology; Vol. 46; pp 446-475.
- Barnett H.L (1972). Illustred general of imperfection fungi. Burgess publishing company. Minnesota (USA): 3^{eme} edition.
- Beghalia M, Ghalem S, Allali H, Belouatek A, Marouf A (2009). Effects of an aqueous extract from *Ammodaucus leucotrichus* on calcium oxalate crystallization in vitro. Medicinal Plants, 1(1) January.
- Belaiche T, Rutledge D, Ducauze C, Tantaoui-Elaraki A (1996). Inhibition de la germination des spores d'*Aspergillus* par les huiles essentielles. Industries alimentaires et agricoles, vol. 113, n°9, pp. 663-665 (12 ref.)
- Belhattab R, Boudjouref M, Barroso J.G, Pedro L.P, Figueirido A.C (2011). Essential oil composition from *Artemisia campestris L* grown in Algeria. Advances in Environmental Biology, p.429(4).
- Belmekki N, Bendimerad N (2012). Antioxidant activity and phenolic content in methanol crude extracts from three Lamiaceae grown in southwestern Algeria. Scholars Research Library, J. Nat. Prod. Plant Resour., 2012, 2 (1):175-181.
- Bendahou M, Benyoucef M, Muselli A, Desjobet J.M, Paolini J, Bernardini A.F, Costa J (2008). Antimicrobial Activity and Chemical Composition of *Saccocalyx satureioides* Coss. et Dur. Essential Oil and Extract Obtained by Microwave Extraction. Comparison with Hydrodistillation. Journal of Essential Oil Research, 20:2, 174-178.
- Bendahou M, Muselli A, Grignon-Dubois M, Benyoucef M, Desjobert J.M, Bernardini J.F, Costa J (2008). Antimicrobial activity and chemical composition of *Origanum glandulosum* Desf. essential oil and extract obtained by microwave extraction: Comparison with hydrodistillation. Food Chem. 106,132-139.
- Bendimerad N, Bekhechi C, Belmekki N, Fernandez X (2009). Chemical analysis and antimicrobial activity of *Saccocalyx satureioides* Coss. et Dur. essential oil from southwestern Algeria. International journal of essential oil therapeutics, 3, no. 4, (2009): 158-162.
- Benjlali B, Tantaoui-Elaraki A, Ismaïli-Alaoui M, et al. (1986). Méthode d'étude des propriétés antiseptiques des huiles essentielles par contact direct en milieu gélosé. Plantes médicinales et phytothérapie 20 (2): 155-67
- Bennett J.W, Klich M (2003). Mycotoxins. Clinical Microbioligy Reviews 16, 497-516.
- Ben Sassi A, Harzallah-Skhiri F, Aouni1 M (2007). Investigation of some medicinal plants from Tunisia for antimicrobial activities. J. Pharmaco. Bio. 45 (5): 421-428.

- Benyahia S (2006). Recherche des métabolites secondaires terpéniques et phénoliques d'espèces d'*Eucalyptus Algériens*. Détermination structurale et activité biologique, Thèse de doctorat d'état, Université Mentouri, Constantine, 2006.
- Bernadet M (2000). Phyto-aromathérapie pratique, plantes médicinales et huiles essentielles, Edition Dangles.
- Beylier-Maurail M. F (1976). Activité bactériostatique des matières premières de parfumerie. *Rivista Italiana EPPOS*. 58, (1976) 283-286.
- Bhatnagar D, McCormick S.P (1988). The inhibitory effect of neem (*Azadirachta indica*) leaf extracts on aflatoxin synthesis in *Aspergillus parasiticus*. *Journal of the American Oil Chemical Society* 65, 1166–1168.
- Bilgrami K.S, Sinha K.K (1992). Aflatoxins: their biological effects and ecological significance. *Handbook of Applied Mycology*. 5, 5-86.
- Biondi D.M, Sari M, Ghani Z.A, Ruberto G (2006). Essential oil of Algerian *Saccocalyx satureioides* Coss. et Durieu. *Flav. Fragr. J.*, 21, 546–548.
- Botineau M (2010). Botanique systématique et appliquée des plantes à fleurs. Edition Tec et Doc / Lavoisier 1336 p.
- Botton B, Bretton A, Fevre H, Gauthier S, Guy Ph, Larpen JP, Reymond P, Sanglier J, Vayssier Y, Veau P (1990). Moisissures utiles et nuisibles : Importance industrielle. Paris : 2^{ème} Ed. MASSON. p.512.
- Bouchra C, Achouri M, Hassani L.M.I, Hmamouchi M (2003). Chemical composition and antifungal activity of essential oils of seven Moroccan Labiatae against *Botrytis cinerea* Pres: FR. *Journal of Ethnopharmacology*; Vol. 89. PP 165-169.
- Boudih S (2011). Identification des moisissures et de leurs métabolites secondaires colonisant des supports papiers. Evaluation de la toxicité sur des cellules épithéliales respiratoires *in vitro*. Thèse de Doctorat de l'Université de Paris EST, 185 p.
- Boukhatem M.N, Hamaidi M, Saidi F, Hakim Y, Benomier K (2010). Extraction, composition et valorisation de l'eau aromatique de géranium rosat (*Pelargonium graveolens*) dans la dermatopharmacie. *Nature et Technologie* 2010 ; 02 : 59-64.
- Bounatirou S et al., (2007). Chemical composition, antioxidant and antibacterial activities of the essential oils isolated from Tunisian *Thymus capitatus* Hoffm. & Link. *Food Chem.*, 105, 146-155.
- Bourkhiss M, Hnach M, Bourkhiss B, Ouhssine M, Chaouch A (2007). Composition chimique et propriétés antimicrobiennes de l'huile essentielle extraite des feuilles de *Tetraclinis articulata* (Vahl) du Maroc. *Afrique science* 03(2) 232 – 242.

- Bourkhiss M, Hnach M, Bourkhiss B, Ouhssine M, Chaouch A et Satrani B (2009). Effet de séchage sur la teneur et la composition chimique des huiles essentielles de *Tetraclinis articulata (Vahl)* Masters, Agrosolutions, 2009 vol 01, pp.45-6.
- Bourrel C, Vilarem G, Michel G (1995). Étude des propriétés bactériostatiques et fongostatiques en milieu solide de 24 huiles essentielles préalablement analysées. *Rivista Italiana*, EPPOS 16: 3-12.
- Bouzouita N, Kachouri F, Ben Halima M, Chaabouni M.M (2008). Composition chimique et activités antioxydante, antimicrobienne et insecticide de l'huile essentielle de *Juniperus phoenicea*. *Journal de la Société Chimique de Tunisie*, 2008, 10, 119-125.
- Boysen M.E, Jacobsson K.G, Schnürer J (2000). Molecular Identification of Species from the *Penicillium roqueforti* Group Associated with Spoiled Animal Feed, *Appl. Environ.* 21, p :22-32.
- Branger M, Bresler G, Vaamonde G, Degrossi C, Pinto V.F (2007). Moisissures et risques alimentaires (mycotoxicoles). *Revue Française des Laboratoires*, p : 373.
- Bremness L (1998). Les plantes aromatiques et Médicinales. Bordas Editions.
- Bren U, Guengerich F.P, Mavri J (2007). Guanine alkylation by the potent carcinogen aflatoxin B1: quantum chemical calculations. *Chem. Res. Toxicol.*, 20, 1134-1140.
- Bruneton J (1999). Pharmacognosie. Phytochimie des plantes médicinales, monoterpène et sesquiterpène. TEC et DOC, 3^{ème} édition, Lavoisier. Paris. pp 484-497.
- Bruneton J (2009). Pharmacognosie, Phytochimie, Plantes médicinales. Tec & Doc. 4^{ème} Ed Lavoisier, Paris.
- Bssaibis F., Gmira N, Meziane M (2009). Activité antibactérienne de *Dittrichia viscosa (L.)* W. Greuter *Rev. Microbiol. Lnd. San et Environn.* 2009; 3(1) : 44-55pp.
- Bullerman L.B, Bianchini A (2007). Stability of mycotoxins during food processing, *International Journal Food Microbiology.* 119, 140-146.
- Bush R.K, Prochnau J.J (2004). *Alternaria*-induced asthma. *Journal of Allergy and Clinical Immunology.* 113, 227-234.
- Canet, C (1999). Réglementation mondiale. Dans. Conseil supérieur d'hygiène publique de France, section de l'alimentation et de nutrition. Les mycotoxines dans l'alimentation : évaluation et gestion du risque. Chapitre XVI. Quatrième Partie : gestion du risque. (pp. 409-427). Lavoisier, France : Technique & Documentation.
- Carson C. F. & Riely T.V (1995). Antimicrobial activity of the major components of essential oil of *Melaleuca altemifolia*. *J. Appl. Bacteriol.* 78, (1995) 264-269.

- Caratini R (1971). Bordsencyclopedia. Ed Bodas. Belgique. 23: 137-195.
- Cavalli J.F (2002). Caractérisation par CPG/IK, CPG/SM et RMN du carbone-13 d'huiles essentielles de Madagascar. Thèse de doctorat en Chimie Organique et Analytique ; université de Corse Pascal Paoli. 2002.
- Chabasse D, Guiguen C.I, Contet Audonneau N (1999) Mycologie Médicale. Eds Elsevier/Masson, 324 p.
- Chalchat J.C, Cabassu P, Petrovic S D, Maksimovic Z A, Gorunovic M S (2003). Composition of essential oil of *Artemisia campestris L.* from Serbia. Journal of Essential Oil Research : 15, 251-253.
- Chaumont J.P, Leger C (2001). Composition chimique and activité antimicrobienne des huiles essentielles d'*Aeollanthus pubescens Benth.* acclimatée au Togo. C.R. Chimie. 7,p :1107-1111.
- Chebli B, Achouri M, Idrissi Hassani L.M & 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.
- Chemat F, Lucchesi M.E, Smadja J, Favretto L, Colnaghi G, Visinoni F (2006). Microwave accelerated steam distillation of essential oil from lavender: A rapid, clean and environmentally friendly approach. Anal. Chim. Acta 555,157-160.
- Clevenger J.F, (1928). Apparatus for the determination of volatile oil. J. Am. Pharm. Assoc., 17, 336-341.
- Cole R, Cox R.H (1981). Handbook of Toxic Fungal Metabolites. Academic Press, New York, pp. 1-66.
- Cole R, Schweikert M, Jarvis B (2003). Handbook of secondary fungal metabolites. Academic Press (USA) 3, 615-624.
- Cosentino S et al, (1999). In vitro antimicrobial activity and chemical composition of Sardinian *Thymus* essential oils. Lett. Appl. Microbiol., 29(2), 130-135.
- Cowan M.M (1999). Plant products as antimicrobial agents .Clin. Microbiol. Rev., 12, 564-582.
- Cox S.D, Mann C.M, Markham J.L, Bell H.C, Gustafson J.F, Warmington J.R, Wyllie S.G (2000). The mode of antimicrobial action of the essential oil of *Malaleuca alternifolia* (tee tree oil). Journal of Applied Microbiology .88, p:170-175.
- Crespo M.E, Jimenez J, Gomis E & Navarro C (1990). Antimicrobial activity of the essential oil of *Thymus serpylloides subspecies gadorensis*. Microbios, 61, 181-184.

- Cristani M, D'arrigo M, Mandalari G, Castelli F, Sarpietro M.G, Micieli D (2007). Interaction of four monoterpenes contained in essential oils with modal membranes: Implications for their antibacterial activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55, 6300-6308.
- David A et Hervé M (1994). *Flore de la suisse*. Ed Du Griffon Neuchâtel. Suisse. 428p.
- Davis N.D, Diener U.L, Eldridge D.W (1966). Production of Aflatoxins B1 and G1 by *Aspergillus flavus* in a Semisynthetic Medium, *Applied Microbiology*, American Society for Microbiology, Vol. 14, No. 3.
- De Billerbeck V.G *et al.* (2001). Effects of *Cymbopogon nardus* (L.) W. Watson essential oil on the growth and morphogenesis of *Aspergillus niger*. *Can. J. Microbiol.* 47, 9-17.
- Deferera D.J, Ziogas B.N, Polissiou M.G (2000). GC-MS Analysis of essential oil from some Greek aromatic plants and their fungi toxicity on *Penicillium digitatum*. *J. Agric. Food Chem.*, 48(6), 2576-2581.
- DE Hoffmann E, Charette J, Stroobant V (1999). *Spectrométrie de Masse*, 2^{ème} édition, Librairie Dunod, Paris.
- Dhandhukia P.C, Thakkar V.R (2007). Standardization of growth and fermentation criteria of *Lasiodiplodia theobromae* for production of jasmonic Acid. *African Journal of Biotechnology* Vol.6(6), P.707-712.
- Didry N, Dubreuil L, Pinkas M (1993). Antimicrobial activity of thymol, carvacrol and cinnamaldehyde alone or in combination. *Pharmazie*, 48, 301-304.
- Dimitrijevic S.I, Mihajlovski K.R, Antonovic D.G, Milanovic-stevanovic M.R, Mijin D.Z (2007). A study of the synergistic antilisterial effects of a sub-lethal dose of lactic acid and essential oils from *Thymus vulgaris* L., *Rosmarinus officinalis* L. and *Origanum vulgare* L. *Food Chemistry*; Vol. 104; pp 774-782.
- Djarri L (2011). Contribution à l'étude des huiles essentielles et des métabolites secondaires de trois plantes Algériennes de la famille des Apiaceae, *Daucus reboudii* Coss. *Ex Batt. Trab.*, *Kundmannia sicula* (L.) DC., et *Elaeoselinum thapsioides* Maire. Thèse de doctorat en chimie organique, Université Mentouri, Constantine, 267 p.
- Djeridane A ., Yousfi M ., Najemi B ., Vidal N ., Lesgards JF ., and Stocker P . (2007). Screening of some Algerian medicinal plants for the phenolic Compounds and their antioxidant activity. *Eur. Food Res. Technol.*224: 801-809.
- Dob T, Dahmane D, BerramdaneT, and Chelghoum C (2005). Chemical Composition of the Essential Oil of *Artemisia campestris* L. from Algeria. *J. Pharm. Bio.* 43(6): 512-514.

- Dongmo P.M.J, Kuate J, Boyom F.F, Ducelier D, Damesse F, Zollo P.H.A, Menut C, Bessiere J.M (2002). Fruits, Composition chimique et activité antifongique in vitro des huiles essentielles de Citrus sur la croissance mycélienne de *Phaeoramularia angolensis*, (57), 95-104.
- Dob T, Dahmane D, Berramdane T, Chelghoum C (2005). Chemical Composition of the Essential Oil of *Artemisia campestris*. L. from Algeria. *Pharmaceutical Biology*, Vol. 43, No. 6, Pages 512-514.
- Dorman H.J.D, Deans S.G (2000). Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. 88, p: 308-316.
- Dorman H.J.D, Figueiredo A.C, Barroso J.G, Deans S.G (2000). In vitro evaluation of antioxidant activity of essential oils and their components. *Flavour and Fragrance Journal*. 15, 12-16.
- Dumortier D (2006). Contribution à l'amélioration de la qualité de l'huile essentielle d'ylang-ylang *Cananga odorata* (Lamarck) J.D. Hooker et Thomson, variété genuina) des Comores. Faculté universitaire des sciences agronomiques de Gembloux, pp94.
- Dunford N.T, Vazquez R.S (2005). Effect of water stress on plant growth and thymol and carvacrol concentrations in Mexican oregano grown under controlled conditions. *Journal of Applied Horticulture*; Vol. 7; N°1; pp 20-22.
- Dupont F, Guignard J.L (2012). Botanique: Les familles des plantes. Elsevier Masson, 15^{ème} édition, 336 p.
- Duraffourd C, Lapraz J-C, Chemli R (1997). La plante médicinale de la tradition à la science. 1^{er} congrès Intercontinental. Tunis. Ed. Granche. Paris, 222.
- Édouard J et Revuz R (2009). Cosmétologie et dermatologie esthétique. Elsevier, ISBN: 9782842999490.
- El Ajjouri M, Satrani B, Ghanmi M, Aafi A, Farah A, Rahouti M, Amarti F, Aberchane M (2008). Activité antifongique des huiles essentielles de *Thymus bleicherianus* Pomel et *Thymus capitatus* (L.) Hoffm & Link contre les champignons de pourriture du bois d'œuvre. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* 12(4), 345-351.
- Elidemir O, Colasurdo G.N, Rossmann S.N, Fan L.L (1999). Isolation of *Stachybotrysen* from the lung of a child with pulmonary hemosiderosis. *Pediatrics*. 104, 964-966.
- El khoury A (2007). Champignons Mycotoxinogènes et Ochratoxine A (OTA) et Aflatoxine B1 (AFB1) dans les vignobles libanais : Occurrence et Origine. Thèse de doctorat de l'Université de Saint Joseph de Beyrouth 201 p.

- Fabrocini V.C (1999). Comment se soigner avec l'Aromathérapie et guérir. Editions de Vecchi S.A. Paris. 97 p.
- Farag R.S, Daw Z.Y, Hewedi F.M, El-baroty G.S.A (1989). Antimicrobial activity of some Egyptian spice essential oils. J. Food Protect 52, 665–667.
- Farhat A (2010). Vapo-Diffusion assistée par Micro-ondes : Conception, Optimisation et Application. Thèse de Doctorat en Sciences des Procédés, Sciences des Aliments, Université d'Avignon et des Pays de Vaucluse.
- Fellah S, Romdhane M, Abderraba M (2006). Extraction et étude des huiles essentielles de la *Salvia officinalis* L cueillie dans deux régions différentes de la Tunisie. Journal de la Société Algérienne de Chimie J. Soc. Alger. Chin ; Vol. 16 ; N°2 ; PP 193-202.
- Flamini G, Tebano M, Cioni P.L, Ceccarini L, Ricci A.S, Longo I (2007). Comparison between the conventional method of extraction of essential oil of *Laurus nobilis* L and a novel method which uses microwaves applied in situ, without resorting to an oven. J. Chromatogr. A 1143, 36-40.
- Fourement et Roques (1941). Répertoire des : Plantes médicinales et aromatiques d'Algérie 165 p.
- Franchomme P (1981). L'aromatologie à visée anti-infectieuse ». Phytomédecine, 1 et 2, 25-47.
- Franchomme P et Pénéol D (1990). L'aromathérapie exactement. Encyclopédie de l'utilisation thérapeutique des huiles essentielles. Roger Jallois éditeur. Limoges. 445 p.
- Frayssinet C, Cahagnier B (1982). Recherché et dosage des toxines dans les grains et graines et produits dérivés : céréales, oléagineux, protéagineux, aliments pour animaux. Paris : technique et documentation (Lavoisier). p. 558-559.
- Frew A.J (2004). Mold allergy: Some progress made, more needed. Journal of Allergy and Clinical Immunology. 113, 216-218.
- Gachkar L, Yadegari D, Rezaei M.B, Taghizadeh M, Astaneh S.A, Rasooli I (2007). Chemical and biological characteristics of *Cuminum cyminum* and *Rosmarinus officinalis* essential oils. Food Chemistry; Vol. 102; pp: 898-904.
- Gelderblom W.C, Jaskiewicz Marasas W.F, Thiel P.G, Horak R.M, Vlegaar R, Kriek N.P (1988). Fumonisin-novel mycotoxins with cancer-promoting activity produced by *Fusarium moniliforme*. Appl Environ Microbiol, 54, 1806-1811.
- Gildo P.(2006). Précis de phytothérapie, Larousse Encyclopedie MEMO, Edition Alpen , p 3-4.

- Ghorab H, Laggoune S, Kabouche A, Semra Z, Kabouche Z (2013). Essential oil composition and antibacterial activity of *Artemisia campestris L*, from Khenchela (Algeria). *Der Pharmacia Lettre*, 5 (2):189-192.
- Giordani R, Kaloustian J (2006). Action anticandidosique des huiles essentielles : leur utilisation concomitante avec des médicaments antifongiques. *Phytothérapie* 2006; 3 : 121-124.
- Gourine N, Benabed K.H, Ouinten M, Yousfi M (2012). Chemical Composition and Antioxidant Activity of *Saccocalyx satureioides* Essential Oil. Abstract Book (ISBN 978-9957-31-012-7). The 3rd International Symposium on Medicinal Plants, Their Cultivation and Aspects of Uses. Petra - Jordan November 21-23/2012. 149 p.
- Griffin S.G (1999). The role of structure and molecular properties of terpenoids in determining their antimicrobial activity. *Flavour and Fragrance Journal*.14 p :322-332.
- Griffin S. G, Leach D.N, Markham J, Johnstone R (1998). Antimicrobial activity of essential oils from *Zieria*. *Journal of Essential Oil Research*. 10, p: 165-174.
- Gqaleni N, Smith J.E, Lacey J, Gettinby G (1997). Effects of Temperature, Water Activity, and Incubation Time on Production of Aflatoxins and Cyclopiazonic Acid by an Isolate of *Aspergillus flavus* in Surface Agar Culture. *Applied and Environmental Microbiology* 63, 1048-1053.
- Gurinder J.K, Arora D.S (2009). Antibacterial and phytochemical screening of *Anethum graveolens*, *Foeniculum vulgare* and *Trachyspermum ammi*. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 9:30, 10 p.
- Hadjeba M.K (2012). Risque de multi-contaminations en mycotoxines et moyens de désactivation par les parois de levures et levures enrichies en glutathion ou sélénométhionine. Thèse de doctorat. Université de Toulouse, pp 31.
- Hageskal G, Knutsen A.K, Gaustad P, de Hoog G.S, Skaar I (2006). Diversity of Antimicrobial Agents and Chemotherapy. *Journal of Essential Oil Research*. 32, p: 598-600.
- Hamilton Alan (2003). *Medicinal Plants and Conservation : Issues and Aproches*. Surrey (Royaume Uni) : International Plants Conservation Unit, WWF-UK, 51 pages.
- Hammer K.A, Carson C.F & Riley T.V (2003). Antifungal activity of the components of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil. *J. Appl. Microbiol.*, 95, 853-860.
- Haris C (1989). Introduction to modern microbiology black wall scientific publication ». p. 179.

- Hatanaka A, Kajiwara T, Sekiya J (1987). Chem. Phys. Lipids, Biosynthesis pathway for C6-aldehydes formation from linolenic acid in green leaves, (44), 1987, 341-361.
- Hernandez Ochoa, Leon Raul (2005). Substitution de solvants et matières actives de synthèse par un combiné «solvant/actif » d'origine végétale. Docteur de l'institut national polytechnique de toulouse. 225 pages.
- Hmamouchi M, Tantaoui-Elaraki A, Essafi N (1990). Mise en évidence des propriétés antimicrobiennes et antifongiques des huiles essentielles d'eucalyptus. Plantes médicinales et phytothérapie 4: 278-89.
- Imtiaj A, Lee T.S (2007). Screening of antibacterial and antifungal activities from Korean wild mushrooms. World journal of agricultural sciences. Vol.3(3). P.316-321.
- Inouye^a S, Takizawa T, Yamaguchi H (2001). Antibacterial activity of essential oils and their major constituents against respiratory tract pathogens by gaseous contact. Journal of Antimicrobial Chemotherapy. 47, 565-573.
- Inouye^b S, Yamaguchi H and Takizawa T (2001). Screening of the antibacterial effects of a variety of essential oils on respiratory tract pathogens, using a modified dilution assay method. Journal of Infection and Chemotherapy. 7, 251-254.
- Ishikawa T, Kudo M, Kitajima J (2002). Water-soluble constituents of dill. Chem Pharm Bull (Tokyo). 50 (4): 501-7.
- Isbilira S.S, Sagiroglua A (2011). Antioxidant Potential of Different Dill (*Anethum Graveolens L*) Leaf Extracts. International Journal of Food Properties, Volume 14, Issue 4, 894-902 pp.
- IUCN: International Union for Conservation of Nature and Natural Resources (2005). A guide to medicinal plants in North Africa. IUCN The World Conservation Union; 1st edition, Centre for Mediterranean Cooperation, Malaga (Spain), 256 pages (pp 27-28).
- Jackson P.E, Groopman J.D (1999). Aflatoxin and liver cancer. Baillieres Best Pract. Res. Clin. Gastroenterol., 13, 545-55.
- Jard G (2009). Etude de différents modes d'élimination biologique de la zéaralénone, mycotoxine présente dans les céréales : Adsorption et Biotransformation. Thèse de Doctorat de l'Université de Toulouse, 195 p.
- Joao O.M, Vasconcelos, Artur M.S.S, Jose A.S.C (1998). Chromones and flavones from *Artemisia campestris Sub sp Maritima*. Phytochemistry. 49 (5): 1421-1424.
- Johnson G.B, Raven P.H, Losos J.B, Singer S.R (2011). Biologie. De Boeck, 2^{ème} édition, 1406 pages.

- Juteau F, Masotti V, Bessière J-M, Viano J (2002). Compositional characteristics of the essential oil of *Artemisia campestris var. glutinosa*. *Bioch. Syst. Ecol.* (30): 1065-1070.
- Kalembe D, Kunicka (2003). Antibacterial and antifungal properties of essential oils. *Curr. Med. Chem.* 10, 813-829.
- Kaloustian J, Chevalier J, Martino C, Abou L, Vergnes M.F (2008). Étude de six huiles essentielles : composition chimique et activité antibactérienne. *Phytothérapie* 2008; 6 :160-164.
- Kendrick B (1999). The fifth kingdom. 2nd edition. Mycologue Publications. <http://www.mycolog.com/fifhtoc.html>
- Kendrick B (2001). The fifth kingdom. Focus Publishing/R. Pullins, Third Eds, 386 pages.
- Kostecki M, Wisniewska H, Perrone G, Ritieni A, Jerzy P.G, Chelkowski J, Logrieco A (1999). The effects of cereal substrate and temperature on production of beauvericin moniliformin and fusaproliferin by *Fusarium subglutinans* ITEM-1434. *Food Additives and Contaminants*, 16 (9) : p 361-365.
- Knowles J.R, Roller S, Murray D.B, Naidu A.S (2005) . Antimicrobial action of carvacrol at different stages of dual-species biofilm development by *Staphylococcus aureus* and *Salmonella enterica Serovar Typhimurium*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 71, 797-803.
- Kokkonen M, Ojala L, Parikka P, Jestoi M (2010). Mycotoxin production of selected *Fusarium* species at different culture conditions. *International Journal of Food Microbiology*, 143 (1-2): p. 17-25.
- Kundan S, and Anupam S (2010). The Genus *Artemisia*: A Comprehensive Review. *J. Pharm. Biol.*pp:1-9.
- Kurita N, Miyaji M, Kurane R, et al. (1979). Antifungal activity and molecular orbital energies of aldehyde compounds from oils of higher plants. *Agric Biol Chem* 43: 2365-71
- Kurt B.G, Torsell Nat (1998). *Prod. Chem.*, A mechanistic, biosynthetic and ecological approach, Apotekarsocieteten, Stockholm.
- Kyeong W.Y. Anwar M, Jong H.K (2007). Effects of the Aqueous Extract from *Artemisia campestris ssp. caudata* on Mycorrhizal Fungi Colonization and Growth of Sand Dune Grasses. *J. Plant. Biology.* 50 (3): 358-361.
- Lahlou M (2004). Methods to study the phytochemistry and bioactivity of the essential oils. *Phytotherapy research* : Vol. 18 : pp 435-448.

- Lahsissene H, Kahouadji A, Tijane M, Hseini S (2009). Catalogue des plantes médicinales utilisées dans la région de Zaïer (Maroc occidental). *Revue de botanique Lejeunia* N° 186, 30 p.
- Lamendin H (2007). *Soignez votre bouche par les plantes: Remèdes d'hier et d'aujourd'hui*. L'harmattan, Paris. 216 p
- Laouer H, Chaker N, Ferretti G, Reynaud C, De Billerbeck G, Haddioui L, Belkhef H (2004). Composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Saccocalyx satureioides* Coss. et Dur., Poster presentation in the 35 th International Symposium on Essential Oils, Giardini Naxos ME, Italy, 29 September-2 October (2004).
- Lazouni H.A, Benmansour A, Taleb-bendiab S.A, Chabane sari D (2007). Composition des constituants des huiles essentielles et valeurs nutritives du *Foeniculum vulgare* Mill. *Sciences & Technologie C–N°25*, Juin 2007, pp.7-12.
- Lima EO, Gompertz OF, Giesbrecht AM, et al. (1993). In vitro antifungal activity of essential oil obtained from officinal plants against dermatophytes. *Mycoses* 36 (9-10): 333-6.
- Lopez-Malo A, Alzamora S.M, Palou E (2005). *Aspergillus flavus* growth in the presence of chemical preservatives and naturally occurring antimicrobial compounds. *Int. J. Food Microbiol.*, 99, 119-128.
- Loupy A (2006). *Microwaves in Organic Synthesis*, 2ième édition, Tome I et II. Wiley-VCH, Weinheim.
- Loza-Tavera Herminia (1999). Monoterpenes in Essential oils: Biosynthesis and Properties. *Adv. Exp. Med. Biol.* 464, 49-62.
- Lozeine K, Venskutonis P.R (2005). Influence of environmental and genetic factors on the stability of essential oil composition of *Thymus pulegioides*. *Biochemical Systematics and Ecology*; Vol. 33; pp 517-525.
- Lucchesi M.E, Chemat F, Smadja J (2004). Solvent free microwave extraction of essential oil from aromatic herbs: Comparison with conventional hydro-distillation. *J. Chromatogr. A* 1043, 323-327.
- Lucchesi M.E, Smadja J, Bradshaw S, Louw W, Chemat F (2007). Solvent free microwave extraction of *Elletaria cardamomum* L: A multivariate study of a new technique for the extraction of essential oil. *J. Food Engineer.* 79,1079-1086.
- Magan N, Olsen M (2004). *Mycotoxines in food: Detection and control*, Woodhead Publishing in Food Science and Technology. P:190-203.

- Mally A, Hard G.C, Dekant W (2007). Ochratoxin A as a potential etiologic factor in endemic nephropathy: lessons from toxicity studies in rats. *Food Chem. Toxicol.*, 45, 2254-2260.
- Mansouri M, Nayebi N, Keshtkar A, Hasani-Ranjbar S, Taheri E, Larijani B (2012). The effect of 12 weeks *Anethum graveolens* (dill) on metabolic markers in patients with metabolic syndrome; a randomized double blind controlled trial. *DARU Journal of Pharmaceutical Sciences*, 4 ; 20 (1) : 47.
- Maouni A, Lamarti A, Douria A et Badoc A (2001). Effet de dérivés calciques sur le développement de moisissures lors de la conservation des poires. *Bull. Soc. Pharm. Bordeaux*, 2001, 140, p 79-88.
- Mbata T.I, Saikia A (2005). Antibacterial Activity of Essential oil from *Ocimum gratissimum* on *Listeria monocytogenes*, *Int. J. Food Saf.*, (7), 15-19.
- McEwan M.,1994. The antifungal effects of plant essential oils and their production by transformed shoot culture. Dr thesis, Strathclyde Institute of Biomedical Sciences, University of Strathclyde, Glasgow, Scotland.
- Mclafferty F.W, Turecek F (1993). Interpretation of Mass Spectra, Fourth edition, University Science Books, Sausalito, California.
- Mengel P, Beh D, Bellido G.M, Monpon B (1993). VHMD: extraction d'huile essentielle par micro-ondes. *Parfums Cosmétiques Arômes* 114, 66-67.
- Mirjalili M.H, Tabatabaei S.M.F, Hadian J, Nejad S.E, Sonboli A (2007). Phenological Variation of the essential oil of *Artemisia scoparia* from Iran. *J. Essent. Oil Res.* 19 : 326–329
- Monsefi M, Ghasemi M, Bahaoddini A (2006). The effects of *Anethum graveolens L* on female reproductive system. *Phytother Res.* 20 (10): 865-8.
- Monsefi M, Zahmati M, Masoudi M, Javidnia K (2011). *Effects of Anethum graveolens L* on fertility in male rats. *Eur J Contracept Reprod Health Care.* 16 (6): 488-97.
- Muckensturm B, Diyani F, Le Nouen D, Fkih-Tetouani S, Reduron J.P (1997). Ammolactone, a guaianolide from a medicinal plant, *Ammodaucus Leucotrichus*. Elsevier Science Ltd Amsterdam, *Phytochemistry*, 44(5): 907-910.
- Multon J.L (1982). Conservation et stockage des grains et graines et produits dérivés : Céréales, oléagineux, aliments pour animaux. Lavoisier Technique & Documentation, Paris, Apria. Volume 1, 576 p.

- Naghdi B.H, Yazdani D, Mohammad Ali S, Nazari F (2004). Effects of spacing and harvesting time on herbage yield and quality/quantity of oil in thyme, *Thymus vulgaris* L. Industrial Corps and Products; Vol. 19; pp 231-236.
- Nagy H. Aziz, Loutfy A.A. Moussa (2002). Influence of gamma-radiation on mycotoxin producing moulds and mycotoxins in fruits, Food Control.,13,281–288.
- Naili M.B, Alghazeer O.A, Saleh N.A, Al-Najjar A.Y (2010). Evaluation of antibacterial and antioxidant activities of *Artemisia campestris* (Astraceae) and *Ziziphus lotus* (Rhamnaceae). Arab. J. Chem. 3: 79–84.
- Nicklin J, Graeme-Cook K, Praget T, Killington R (2000). L'essentiel en microbiologie. Ed. Berti. p: 211-217.
- Omidbeygi M, Barzegar M, Hamidi Z, Nalhdibadi H (2007). Antifungal activity of thyme, summer savory and clove essential oils against *Aspergillus flavus* in liquid medium and tomato paste. Food Control 18, 1518-1523.
- Organisation Mondiale de la Santé (OMS) (1999). Monographs on selected medicinal plants. Geneva ,Switzerland: OMS.
- Orhan I, Kartal M, Kan Y, Sener B (2008). Activity of essential oils and individual components against acetyl- and butyrylcholinesterase. Z. Naturforsch. Sect. C 63, 547–553.
- Orhan I.E, Senol F.S, Ozturk N, Celik S.A, Pular A, Kan Y (2013). Phytochemical contents and enzyme inhibitory and antioxidant properties of *Anethum graveolens* L. (dill) samples cultivated under organic and conventional agricultural conditions. Food and chemical toxicology, vol. 59, pp. 96-103.
- Ould el hadj M.Didi, Hadj mhammed M, Zabeirou H (2003). Place des plantes spontanées dans la médecine traditionnelle de la région de Ouargla (Sahara septentrional est). Courrier du Savoir – N°03, Janvier, pp. 47-51.
- Ouraïni D, Agoumi A, Ismaïli-Alaoui M, et al. (2003). Activité antifongique de trois huiles essentielles sur les dermatophytes in vitro. Revue marocaine de biologie-infectiologie 9 (2): 20-30.
- Oussalah M, Caillet S, Saucier L, Lacroix M (2006). Antimicrobial effects of selected plant essential oils on the growth of a *Pseudomonas putida* strain isolated from meat- Meat Science; Vol. 73; pp 236-244.
- Oussalah M, Caillet S, Saucier L, Lacroix M (2007). Inhibitory effects of selected plant essential oils on four pathogen bacteria growth : *E.coli* O157H7, *Salmonella*

- Typhimurium*, *Staphylococcus Aureus* and *Listeria Monocytogenes*. s.l. : Food control, 18: 5, 414-420.
- Ozenda P (1983). Fflore du Sahara. France : éditions du CNRS, 441 p.
- Ozenda P (1991). Fflore et végétation du sahara. 3éme éditions. France : CNRS, 662 p.
- Ozenda P (2004). Fflore et végétation du sahara. Mise à jour de la 3éme éditions. France : CNRS, 680 p.
- Pattnaik S, Subramanyam V.R, Bapaji M, Kole C.R (1997). Microbios, Antibacterial and antifungal activity of aromatic constituents of essential oils, (89), 39-46.
- Paugam A, Baixench M.T, Lebuissou A, Dupouy-Camet J (2010). Diagnostic de l'aspergillose bronchopulmonaire invasive : valeur du dosage du galactomannane dans le lavage bronchoalvéolaire de patients immunodéprimés. Pathologie Biologie 58, 100-103.
- Pavela R (2009). Larvicidal effects of some Euro-Asiatic plants against *Culex quinquefasciatus* Say larvae (Diptera: Culicidae). J. Parasitol Res.105: 887-892.
- Pellecuer J, Allegrini J, Siméon De Buochberg M, et al. (1976). Huiles essentielles bactéricides et fongicides. Revue de l'Institut Pasteur de Lyon 9: 135-9.
- Pellerin P (1991). Supercritical fluid extraction of natural raw materials for the flavour and perfume industry. Perfum. Flavor. 16,4, 37-39.
- Pepeljnjak S, Kosalec I, Kalodera Z, Kustrak D (2003). Natural antimycotics from Croatian plants. In: Rai M.K&. Rai R., eds. Plant-derived antimycotics. Binghampton , NY, USA: The Haworth Press, 49-81.
- Pfohl-Leszkowicz A, (1999). Les mycotoxines dans l'alimentation, Évaluation et gestion du risque. Lavoisier, Paris, 478 p.
- Pitt J.I (1973). An appraisal of identification methods for *Penicillium* species. Novel taxonomic criteria based on temperature and water relations. Mycology 65, p, 1135-1157.
- Pitt J.I, Hoking A.D, Bhudhasamai K, Miscamble B.F, Wheeler K.A, Tanboon E.K.P (1994). The normal mycoflora of commodities from Thailand. 2: Beans, rice, small grains and other commodities. International Journal of Food Microbiology 23: 35-53.
- Polese J.M (2006). La culture des plantes aromatiques. Editions Artémis, 93 p.
- Radulescu V, Popescu M.L, Ilies D.C (2010). Chemical composition of the volatile oil from different plant parts of d'*Anethum graveolens* L umbelliferae cultivated in Romania. FARMACIA, Vol.58, 5, pp 594-600.

- Ramirez C (1982). Manual and Atlas of *Penicillia*. New York (USA): Elsevier biomedical psers.
- Rasooli I, Abyanch M.R (2004). Inhibitory effects oh thyme oils on growth and aflatoxin production by *Aspergillus parasiticus*. Food Control; Vol. 15; pp 479-483.
- Reboux G (2006). Mycotoxins: health effects and relationship to other organic compounds. Revue française d'allergologie et d'immunologie clinique, 46, 208–212
- Rhouati A (2013). Développement de méthodes bioanalytiques à base d'aptamères pour la détermination de l'ochratoxine A. Thèse de Doctorat de l'Université de Constantine, 159 p.
- Richard H (1992). Épices et aromates. Tec et Doc Lavoisier. Paris. 339 p.
- Richard J.L (2007). Some major mycotoxins and their mycotoxicoses-an overview. Int. J. Food Microbiol, 119, 3-10.
- Richter G (1993). Métabolisme des végétaux, Physiologie et biochimie. Edition PRESSES polytechnique et universitaires romandes. 526 pages.
- Robert G (2000). Les Sens du Parfum. Osman Eroylls Multimedia. Paris. 224 p.
- Roomiani L, Soltani M, Akhondzadeh Basti A, Mahmoodi A, Taheri Mirghaed A, Yadollahi F (2013). Evaluation of the chemical composition and in vitro antimicrobial activity of *Rosmarinus officinalis*, *Zataria multiflora*, *Anethum graveolens* and *Eucalyptus globulus* against *Streptococcus iniae*; the cause of zoonotic disease in farmed fish. Iranian Journal of Fisheries Sciences, 12 (3) 702-716.
- Sahin F (2004). The antimicrobial and antioxidant activities of the essential oils and methanol extracts of endemic *Thymus spathulifolius*; Food Control, Vol. 15; pp 627-634.
- Saoudi M, Allagui M.S, Abdelmouleh A, Jamoussi K, El Feki A (2010). Protective effects of aqueous extract of *Artemisia campestris* against puffer fish *Lagocephalus lagocephalus* extract-induced oxidative damage in rats. Exp.Tox.Pathol.62: 601–605.
- Sefi M, Fetoui H, Makni M, and Najiba Zeghal N (2010). Mitigating effects of antioxidant properties of *Artemisia campestris* leaf extract on hyperlipidemia, advanced glycation end products and oxidative stress in alloxan-induced diabetic rats. J. Food. Chem.Toxicol.48: 1986–1993.
- Seidemann J (2005). World Spice Plants: Economic Usage, Botany, Taxonomy. Sprinjer-Verlag Berlin Heidelberg, 593 p (pp34).
- Sell, C.S (2006). The Chemistry of Fragrance. From Perfumer to Consumer. 2 nd edition. The Royal Society of Chemistry. Cambridge. 329 p.

- Senhaji O, Faid M, Kalalou I (2006). Etude du pouvoir antifongique de l'huile essentielle de cannelle. *Phytothérapie* Numéro 1: 24–30. Springer 2006, DOI 10.1007/s10298-006-0147-9.
- Serghat S, Mouria A, Ouazzani touhami A, Badoc A, Douria A. (2004). Effet de quelques fongicides sur le développement in vitro de *Pyricularia Grisea* et *Helminthosporium oryzae*. *Bull. Soc. Pharm. Bordeaux*, 2004, p 143, 7-18.
- Shwab E.K, Keller N.P (2008). Regulation of secondary metabolite production in filamentous ascomycetes. *Mycological Research*, 112 (Pt 2): p. 225-30.
- Simpson A.G.B, Roger A.J (2002). Eukaryotic evolution: getting to the root of the problem. *Current Biology* 12, R691-R693.
- Simpson A.G.B, Roger A.J (2004). The real 'kingdoms' of eukaryotes. *Current Biology* 14, R693-696.
- Singh G, Maurya S, De Lampasona M.P, Catalan C (2005). Chemical Constituents, Antimicrobial Investigations, and Antioxidative Potentials of *Anethum graveolens L.* Essential Oil and Acetone Extract: Part 52. *Journal of Food Science* Volume 70, Issue 4, pages 208–215.
- Singh P, Kumar A, Dubey N.K, Gupta R (2009). Essential Oil of *Aegle marmelos* as a Safe Plant-Based Antimicrobial Against Postharvest Microbial Infestations and Aflatoxin Contamination of Food Commodities. *Journal of food science*. Vol. 74 (6).P.302-307.
- Small E. *Culinary Herbs* (2006). Canadian Science Publishing (NRC Research Press); Édition : 2nd Revised, 1036 p
- Smit L.A.M, Bouzigon E, Bousquet J, Le Moual N and al. (2001). Mold allergen sensitization in adult asthma according to integrin $\beta 3$ polymorphisms and Toll-like receptor 2/1596 genotype. *Journal of Allergy and Clinical immunology*. 128, 185-191.
- Smith-Palmer A, Stewart J and Fyfe L (1998). Antimicrobial properties of plant essential oils and essences against five important food-borne pathogens. *Letters in Applied Microbiology*. 26,118-122.
- Sokmen A, Gulluce M, Akpulat H.A, Daferera D, Tepe B, Polissiou M, Sokmen M, Svoboda K.P (2000). *Secretory structures of Aromatic and medicinal plant*. Microscopix Publications. Powys, UK. 2000.
- Soković M, Marin P.D, Brkić D, Van Griensven L. J. L. D (2007). *Chemical Composition and Antibacterial Activity of Essential Oils of Ten Aromatic Plants against Human Pathogenic Bacteria*. Food 1(1), x-y ©2007 Global Science Books.

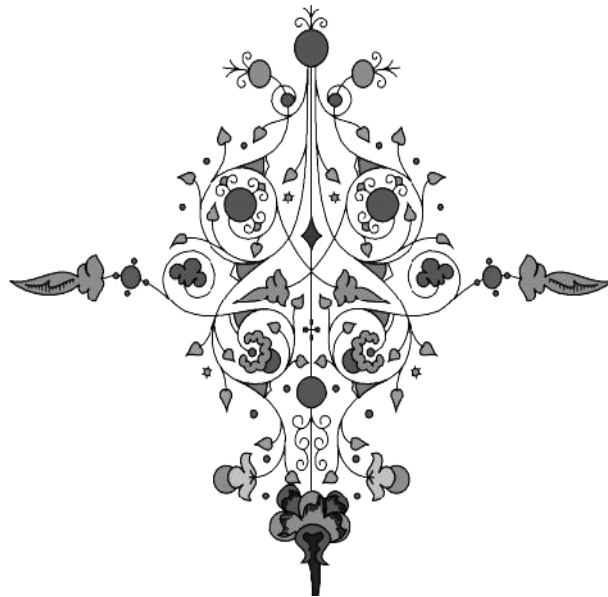
- Spichiger R.E, Savolainen V.V, Figeat M, Jeanmonod D (2004). Botanique systématique des plantes à fleur Une approche phylogénétique nouvelle des Angiospermes des régions tempérées et tropicales, PPUR 3^{ème} édition revue et corrigée, 413 p.
- Svoboda K.P, Greenaway R.I (2003). Int. Jour. Arom., Investigation of volatile oil gland of *Satureja hortensis* L. (Summer savory) and phytochemical comparison of different varieties, (13), 2003, 196-202.
- Tabuc C (2007). Flore fongique de différents substrats et conditions optimales de production des mycotoxines. Thèse de doctorat. École Nationale Vétérinaires de Toulouse Laboratoire Biologie Animale, IBNA Balotesti, Spécialité : Pathologie, Mycologie, Genetique et Nutrition, l'institut National Polytechnique de Toulouse (L'INP Toulouse) p.27-42, 71-74.
- Thanaboripat D, Nontabenjawan K, Leesin K , Teerapiannont D, Sukchareon O, Ruangrattanamatee V (1997). Inhibitory effects of garlic, clove and carrot on growth of *Aspergillus flavus* and aflatoxin production. Journal of Forestry Research 8, 39–42.
- Thompson J.D, Chalchat J.C, Michet A, Linhart Y.B (2003). Ehlers B-Qualitative and quantitative variation in monoterpene co-occurrence and composition in the essential oil of *Thymus vulgaris* chemotypes- Journal of Chemical Ecology; Vol. 29; N°4.
- Tian J, Ban X, Zeng H, Huang B, He J, Wang Y (2011). *In vitro* and *in vivo* activity of essential oil from dill (*Anethum graveolens* L.) against fungal spoilage of cherry tomatoes. Food Control, 22, pp 1992-1999.
- Tian J, Ban X, Zeng H, He J, Chen Y, Wang Y (2012). The Mechanism of Antifungal Action of Essential Oil from Dill (*Anethum graveolens* L.) on *Aspergillus flavus*. PLoS ONE, Volume 7, Issue 1, e30147, 10 p.
- Tiziana Baratta M, Doman H. J. D, Deans S.G, Figueiredo A. C, Barroso J. G et Roberto G (1998). Antimicrobial and antioxidant properties of some commercial essential oils. Flavor and Fragrans Journal. 13, (1998) 235-244.
- Tripathi R, Banerji R, Sharma M, Balasubrahmanyam V, Nigam S (1985). Essential oil from a new strain of *Ocimum gratissimum* against betelvine pathogenic fungi, Agric. Biol. Chem, 4 : 2277-2282.
- Trivedi A.B, Doi E, Kitabatake N (1992). Detoxification of Ochratoxin A on Heating under Acidic and Alkaline Conditions. Biosci. Biotech. Biochem. 56 (5), 741-745.
- Turner N.W, Subrahmanyam S, Piletsky S.A (2009). Analytical methods for determination of mycotoxins: a review. Analytica Chimica Acta, 632(2) : p. 168-80.

- Valant-Vetschera K.M, Fischer R, Wollenweber E (2003). Exudate flavonoids in species of *Artemisia* (Asteraceae-Anthemideae): new results and chemosystematic interpretation. *Biochem. Syst. Ecol.* 31: 487-498.
- Vera R.R. and Chane-Ming J (1998). Chemical Composition of Essential Oil of Dill (*Anethum graveolens* L.) Growing in Reunion Island. *J. Essent. Oil Res.*, 10, 539-542.
- Varga J, Kriswtina R, Téren J (2000). Degradation of ochratoxin A by *Aspergillus* species. *International Journal of Food Microbiology*, 59, 1-7.
- Velasco-Negueruela A, Pérez-Alonso M.J, Pérez de Paz P.L, Palà-Paul J, Sanz J (2006). Analysis by gas chromatography–mass spectrometry of the volatiles from the fruits of *Ammodaucus leucotrichus* subsp. *Leucotrichus* and subsp. *nanocarpus* grown in North Africa and the Canary Islands, respectively. Elsevier B.V. *Journal of Chromatography A*, 1108 (2006) 273–275.
- Velluti A, Marín S, Bettucci L, Ramos A.J, Sanchis V (2000). The effect of fungal competition on colonization of maize grain by *Fusarium moniliforme*, *F. proliferatum* and *F. graminearum* and on fumonisin B1 and zearalenone formation. *International Journal of Food Microbiology*, 59 (1–2): p. 59-66.
- Vera R.R, Chane-Ming J (1998). Chemical Composition of Essential Oil of Dill (*Anethum graveolens* L) Growing in Reunion Island. *Journal of Essential Oil Research*, 10, 539-542.
- Volpato G, Kourková P, Zelený V (2012). Healing war wounds and perfuming exile: the use of vegetal, animal, and mineral products for perfumes, cosmetics, and skin healing among Sahrawi refugees of Western Sahara. *Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine* 2012, 8:49.
- Wenqiang G, Shufen L, Ruixiang Y, Shaokun T, Can Q (2007). Comparison of essential oils of clove buds extracted with supercritical carbon dioxide and other three traditional extraction methods. *Food chem.* 1001, 1558-1564.
- Wyllie G, Markham J.L, Leach D.N (1999). The role of structure and molecular properties of terpenoids in determining their antimicrobial activity. *Talanta* .14, p: 322-332.
- Yrjonen T (2004). Extraction and planar chromatographic separation techniques in the analysis of natural product. Conference Room 513 at Viiki Infocentre (Viikinkaari 11), Faculty of Pharmacy of the University of Helsinki . p:64.
- Yiannikouris A, Jouany J.P (2002). Les mycotoxines dans les aliments des ruminants, leur devenir et leurs effets chez l’animal. *INRA Prod. Anim*, 15, 3-16.

- Yili A, Yimamu H, Maksimov V.V, Aisa H.A, Veshkurova O.N, Salikhov Sh. I (2006). Chemical composition of essential oil from seeds of *Anethum graveolens* cultivated in china. Chemistry of Natural Compounds, Vol. 42, No. 4, pp 491-492.
- Yili A, Aisa H.A, Maksimov V.V, Veshkurova O.N, Salikhov Sh. I (2009). Chemical composition and antimicrobial activity of essential oil from seeds of *Anethum graveolens* growing in Uzbekistan. Chemistry of Natural Compounds, Vol. 45, No. 2, pp 280-281.
- Zerroug M.M, Laouer H, Strange R.N, Nicklin J (2011). The Effect of Essential Oil of *Saccocalyx Satureioides* Coss. Et Dur. On the Growth of and the Production of Solanapyrone a by *Ascochyta Rabiei* (Pass.) Labr. ISSN 1995-0756. Advances in Environmental Biology, 5(2): 501-506, 2011.



Annexes



ANNEXE I

Milieux de culture et reactifs

Milieu PDA (Potatoes Dextrose agar)

Pomme de terre (macération 500ml de filtrat)	200 g
Sucrose	10 g
Agar	15 g
Eau distillée	1000 ml
pH = 6	
Stérilisation à 121°C/15min	

Milieu CDA (Czapek Dox Agar)

Sucrose	30 g
KH ₂ PO ₄	1 g
KCL	0.5 g
MgSO ₄	0.5 g
FeSO ₄	0.01 g
NaNO ₃	3 g
Agar	15 g
Eau distillée	1000 ml
pH = 7,3	
Stérilisation à 121°C/15min	

(Czapek Concentre)

NaNO ₃	30 g
KCL	5 g
MgSO ₄	5 g
FeSO ₄	0.1 g
Eau distillée	100 ml
pH = 7,4	
Stérilisation à 121°C/15min	

Milieu MEA (Malt Extract Agar)

Matière Sèche	50 g
Agar	5 g
Eau distillée	1000 ml
pH = 5,5	
Stérilisation à 121°C/15min	

Milieu YES (Yeast Extract Sucrose)

Sucrose	40 g
Extrait de Levure	20 g
Eau distillée	1000 ml
pH = 6,8	
Stérilisation à 121°C/15min	

Milieu CYA (Czapek Yeast Agar)

Czapek Concentre	10 ml
KH ₂ PO ₄	1 g
Extrait de levure	5 g
Sucrose	30 g
Agar	15 g
Eau distillée	1000 ml
pH = 5,5	
Stérilisation à 121°C/15min	

Milieu G25N (25 % Glycérol Nitrate Agar)

KH ₂ PO ₄	0.75 g
Czapek Concentre	7.5 ml
Extrait de levure	3.7 g
glycerol	250 g
Agar	12 g
Eau distillée	750 ml
pH = 7,2	
Stérilisation à 121°C/15min	

Milieu AFPA (Milieu Selectif pour A.flavus et A.parasiticus)

Extrait de levure	20 g
peptone	10 g
Citrate ferrique ammoniacal	0.5 g
chloramphenicol	0.1 g
Dichloran solution ethaolique à 0.2%	1 ml
Agar	15 g
Eau distillée	1000 ml
pH = 6,3	
Stérilisation à 121°C/15min	

Eau physiologique

NaCl	9 g
Eau distillée	1000 ml
pH = 7	
Stérilisation à 121°C/15min	

Lactophenol

Phénol pur cristallisé	20 g
Acide lactique	20 ml
Glycérol pur	20 ml
Eau distillée	40 ml
pH = 7	
bouillir à 40°C	

Solution d'agar (0,2%)

Agar	0,2 g
Eau distillée stérile	100 ml
pH = 7	

ANNEXE II

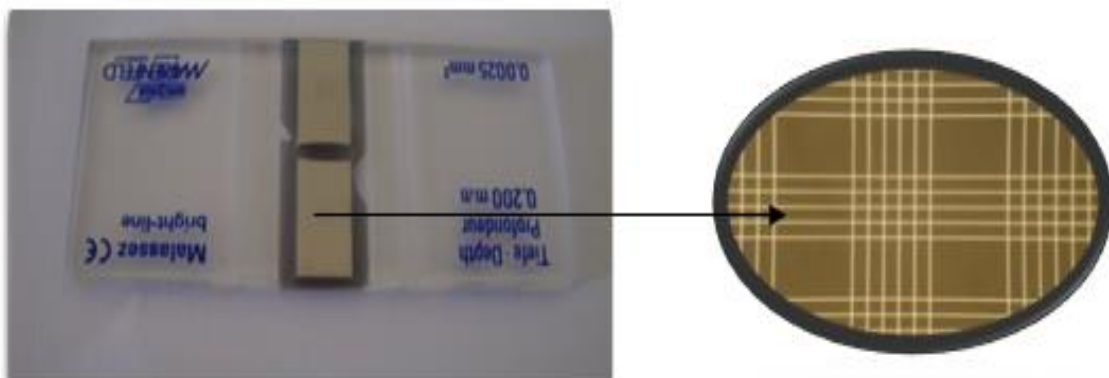
Appareillage et instruments utilisés



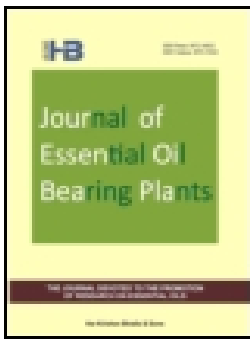
Dispositif d'extraction des HEs par hydrodistillation de type Clevenger



Chromatographe en phase gazeuse à régulation électronique de type Hewlett Packard (série HP 6890)



Cellule de Malassez



Anti-mycotoxin Effect and Antifungal Properties of Essential Oil from *Ammodaucus leucotrichus* Coss. & Dur. on *Aspergillus flavus* and *Aspergillus ochraceus*

Achraf Khaldi, Boumedién Meddah, Abdellah Moussaoui & Pascal Sonnet

To cite this article: Achraf Khaldi, Boumedién Meddah, Abdellah Moussaoui & Pascal Sonnet (2017): Anti-mycotoxin Effect and Antifungal Properties of Essential Oil from *Ammodaucus leucotrichus* Coss. & Dur. on *Aspergillus flavus* and *Aspergillus ochraceus*, *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, DOI: [10.1080/0972060X.2017.1282840](https://doi.org/10.1080/0972060X.2017.1282840)

To link to this article: <http://dx.doi.org/10.1080/0972060X.2017.1282840>



Published online: 09 Mar 2017.



Submit your article to this journal [↗](#)



View related articles [↗](#)



View Crossmark data [↗](#)

Anti-mycotoxin Effect and Antifungal Properties of Essential Oil from *Ammodaucus leucotrichus* Coss. & Dur. on *Aspergillus flavus* and *Aspergillus ochraceus*

Achraf Khaldi ^{1*}, Boumedién Meddah ^{1,2}, Abdellah Moussaoui ¹, Pascal Sonnet ³

¹Laboratory of Plant Resource Development and food Security in Semi-Arid Areas, South West of Algeria, BP 417, University of Tahri Mohamed Bechar, 08000, Bechar, Algeria

²Laboratory of Bioconversion, Microbiological Engineering and Safety Health, University of Mascara, 29000 Mascara, Algeria

³Laboratory Glycochemistry, of Antimicrobials and Agroressources (LG2A), University of Picardie, Amiens, France

Received 03 January 2016; accepted in revised form 17 May 2016

Abstract: The essential oil of *Ammodaucus leucotrichus* Coss. & Dur. seeds growing wild in South-West of Algeria were obtained by hydrodistillation and analysed by GC and GC-MS. Other parameters such as density, refractive index, optical rotation, freezing point, solubility in ethanol, acid value and ester index are also measured. The antifungal properties of the essential oil were conducted using biomass technique on liquid medium, mycotoxigenic test, mycelial growth, determination of minimum inhibitory concentration (MIC), sporulation and germination spores'. The essential oil was found to be active against *Aspergillus flavus* MTTC 2799 (Microbial Type Culture Collection and Gene Bank) and *Aspergillus ochraceus* CECT 2092 (Spanish Type Culture Collection). The GC and GC-MS data showed a total of 19 compounds were identified in the hydro-distilled oil. The oil was dominated by oxygenated monoterprenes represented by perilla aldehyde (81.62 %).

Key words: *Ammodaucus leucotrichus* Coss. & Dur., Essential oil, Anti-mycotoxin, Antifungal activities, GC-MS.

Introduction

Many secondary metabolites of plants, including a wide variety of phytochemicals, have been isolated and identified ¹. Among the different groups of plant products, essential oils (EO) are especially recommended as one of the most promising groups of natural products for the formulation of safer antifungal agents ². Generally, these EO have a terpenoid structure and their effects are mediated via a combination of constituents, which in some oils may number >100 different compounds ¹. *Ammodaucus leucotrichus* Coss. & Dur. (Apiaceae) is an annual that grows in wadis, on sandy-gravelly soils in arid conditions

where the annual rainfall does not exceed 100 mm, distributed throughout North and West Africa in the Saharan and sub-Saharan countries, where it is considered endemic ³. *A. leucotrichus* Coss. & Dur., commonly called in Algerian traditional medicine "Moudrayga or El massoufa", the leaves and seeds are collected by the nomads for their own use, usually in spring when the fruits are ripe. It is also sold to herbalists in local markets, particularly in the Southern Algerian Sahara: Bechar, Djanet and El Golea. It is used for the treatment of common cold and fever, stomach diseases, vomiting pains and allergies. Moreover, emmenagogue, abortive and aphrodisiac proper-

*Corresponding author (Achraf Khaldi)
E-mail: <achrafsystemdz@yahoo.fr >

ties are attributed to this species ^{3,4}.

The aims of this work are to evaluate the anti-mycotoxin effect and antifungal activities of EO from *A. leucotrichus* Coss. & Dur. Other physicochemical parameters and the chemical composition of the EO were also evaluated.

Experimental

Plant material

Seeds of *A. leucotrichus* Coss. & Dur. were collected on April 2013 from Abadla in Bechar Department (South-West of Algeria). A voucher specimen (LB/13/UB-003) was deposited at the herbarium of laboratory of botany at the biology Institute, University of Tahri Mohamed Bechar. Dry plant was stored in a dry place until analysis.

Essential oil extraction

The essential oil of each collective sample was isolated from seeds by hydrodistillation, for 4h, using a Clevenger-type apparatus. The essential oil obtained, were dried over anhydrous sodium sulphate and stored in hermetically sealed colored vials at 4°C before analysis.

Physicochemical analysis

In the essential oil some parameters: the density (NFT-75 111), refractive index (NFT-75 112), optical rotation (NFT-75 113) by polarimetry at 589 nm and 25°C as a solution in dichloromethane, freezing point (NFT-75 102), solubility in ethanol (NFT-75 101), acid value (NFT-75 103) and ester index (NFT-75 104) were determined by the methods in accordance with the standards codex ⁵.

GC and GC-MS spectrometry analysis

A Hewlett-Packard HP 6890 gas chromatograph equipped with a DB-5 fused silica capillary column (30 m x 0.25 mm i.d. x 0.25 µm film thickness, J&W Scientific), a FID detector regulated with 260°C, supplied with a mixture of gaz H₂/Air and a Split-splitless injector regulated with 240°C were used for the percentage determination of oil components. The mode of injection was Split (split ratio: 1/50, flow: 66 ml/min). The gas used was the nitrogen with a flow rate of 1.7 ml/min. The temperature of the column was programmed from 60 to 325°C at a rate of 4°C/min.

Retention indices were calculated using the retention time of n-alkanes that were injected after the oil at the same chromatographic conditions.

Identification of the oil components was based on their Kováts indice (KI) and by comparison of their mass spectral fragmentation patterns with those reported in the literature ⁶, and mass spectra, obtained from the GC-MS analysis on a Hewlett-Packard HP6890/HP5973 instrument equipped with a DB-5 fused silica capillary column (30 m x 0.25 mm i.d. x 0.25 µm film thickness, J&W Scientific); helium was used as carrier gas at a flow rate of 2 ml/min. The GC analytical parameters were the same as those listed above, and the mass spectrometry was run in the electron impact (EI) at 70 eV.

Fungal strains and preparation of inoculates

Two pathogens fungi produced mycotoxins, *Aspergillus flavus* MTTC 2799 (aflatoxin B1) and *Aspergillus ochraceus* CECT 2092 (ochratoxin A) were used to evaluate the anti-mycotoxin and antifungal properties of the EO. They belong to the fungus collection of biology laboratory of Tahri Mohamed Bechar University. These fungi were purified by single spore isolation using *Aspergillus flavus* and *Parasiticus* Agar (AFPA), this medium was used to select *A. flavus* including *A. ochraceus* because both fungi produced yellow orange color when viewed from the reverse side of the plate. The culture was transferred and cultivated on nutritive medium potato dextrose agar (PDA) acidified during seven days in the darkness and at room temperature 25°C. To prepare spore suspension, both fungi grown spores were suspended in 0.85 % (w/v) sodium chloride to prepare the homogeneous spore suspension ⁷, using Malassez hematimeter in order to obtain the concentration of 10⁵ spore/ml.

Anti-mycotoxin effect

Determination of percent mycelial inhibition by biomass technique on liquid medium

To test the minimum biomass inhibitory concentration (MIC^b) of EO, Selected dilutions of 1/10, 1/15, 1/37, 1/150 and 1/750 of EO were prepared in the agar solution (0.2 %). In flasks containing each one 45 ml of liquid medium Yeast Extract Sucrose (YES) rich on B vitamin complex, asepti-

cally added 5 ml of each dilution in order to obtain final concentrations 1/100, 1/150, 1/370, 1/1500 and 1/7500 (v/v). Controls containing liquid medium and 0.2 % agar solution but no EO are also prepared. These liquid cultures were sowed with 0.1 ml of the homogeneous spore suspension (10^5 spore/ml). The incubation was carried out at $25 \pm 2^\circ\text{C}$ for 14 days. After filtration, the filter paper was dried at 60°C during 24h ⁸. All treatments were carried out in triplicate. Biomass weight formed (P) was determined using the following formula of Intiaj and Lee ⁹:

$$P = P_1 - P_0$$

where P_0 is the filter paper weight and P_1 is the filter paper and fungal biomass weight after dryness. The percentage inhibition of biomass formed (Ib %) was determined by the following formula:

$$(\text{Ib } \%) = [(C - P) / C] \times 100$$

Where C is the biomass weight formed in control and P is the biomass weight formed in treated flasks with EO.

Mycotoxigenic test

After two weeks of incubation at $25 \pm 2^\circ\text{C}$, the biomass was removed by filtration of YES. The filtrate was added then to 180 ml of chloroform and stirred for 30 min. After decantation, the organic layer was concentrated to 2 ml. Mycotoxins were determined in each extract by spotting samples onto thin layer chromatography (TLC) silica gel G plate. Plate was developed with a toluene/Ethyl acetate/ Formic acid (50:40:10, v/v/v) solvent system. Aflatoxin and ochratoxin standard were spotted on the same plate as reference and mycotoxins spots were identified using 365 nm UV ¹⁰. The presence of mycotoxins were provided by appearance of blue fluorescence for aflatoxin B1 (AFB1) and green fluorescence for ochratoxin A (OTA) which has the same Rf as control.

Antifungal activities

Antifungal activity of EO on mycelial growth

The minimum mycelial growth inhibitory concentration (MIC ^m) of EO was measured according to the contact direct method. In the test tubes

containing each one 13.5 ml of solid medium PDA, autoclaved for 20 minutes at 121°C and cooled to 45°C , aseptically added 1.5 ml of each of dilution prepared before hand, in order to obtain final concentrations 1/100, 1/150, 1/370, 1/1500 and 1/7500 (v/v). Controls containing culture medium and 0.2 % agar solution but no EO are also prepared. After agitation, the selected solutions were transferred into a Petri plates which were inoculated with sporal solution, the incubation was carried out at 25°C for 7 days ¹¹. Antifungal index of mycelial growth in percent (Im %) was calculated in following formula:

$$(\text{Im } \%) = [(DT - D) / DT] \times 100$$

Where DT is the diameter of mycelial growth in control and D is the diameter of mycelial growth in treated petri dishes with EO ¹². Each test was performed in triplicate.

For determination of minimal fungicidal concentration (MFC), a fungal disk (5 mm diameter) from each inhibited fungal petri dishes of oil treated sets were re-inoculated on fresh medium after washing with distilled water and revival of their growth (fungistatic/fungicidal) was observed after 7 days. The lowest concentration preventing revival of fungal growth was taken as the MFC ¹³.

Antifungal activity of EO on spore sporulation

To test the minimum sporulation inhibitory concentration (MIC ^s) of EO, from the dishes used for the evaluation of the mycelial growth on solid medium, incubated at 25°C for 10 day for each strain at various concentrations were taken four washers 5 mm diameter and transposed into tubes containing 1 ml of sterile distilled water. Fungal suspension is then agitated using a vortex mixer to release the spores of the conidiophores. One counts the total number of spores using a Malassez cell at a rate of 10 counts per suspension. The values are expressed as number of spores per unit area (mm^2) ¹⁴. The percentage inhibition of sporulation (Is %) was determined by the following formula:

$$(\text{Is } \%) = [(N_0 - N_c) / N_0] \times 100$$

Where N_0 is the number of the spores estimated

in control and N_c is the number of the spores estimated in the presence of EO. Each test was performed in triplicate.

Antifungal activity of EO on spore germination

To test the minimum germination inhibitory concentration (MIC^s) of EO, the sporal suspension collected was adjusted to 10^5 spores/ml of distilled water using a Malassez cell. 0.1 ml of the suspension sporal was plated on petri dishes containing PDA medium to which oil are incorporated at the same concentrations as above with three repetitions performed simultaneously by concentration. Controls containing PDA medium but no EO are also prepared. Counting spores germinated or not was performed on a total of 200 spores after 18 hours of incubation at 25°C in the dark. Spore germination was determined when the germ tube was longer than the spore diameter.¹⁵ The percentage inhibition of germination (Ig %) was determined by the following formula:

$$(Ig \%) = (N_0 - N_c) / N_0 \times 100$$

Where N_0 is the number of germinated spores in control and N_c is the number of germinated spores in the presence of EO.

Statistical analysis

All experiments were performed in triplicate and data were expressed as mean \pm standard deviation. Statistical analysis was performed using SPSS 11.0 Bivariate Correlation Analysis (SPSS Inc., Chicago, IL, USA.). A significant difference was considered at the level of $P < 0.05$ and $P < 0.01$. The Pearson rank correlation test was used for comparisons between the broth dilution and biomass technique used to determine the anti-mycotoxin effect and contact direct method used for antifungal activities.

Results and discussion

The seeds of *A. leucotrichus* Coss. & Dur. gave blue-green oil with a strong penetrating odor. On a dry weight basis yielded oil 2.15 % (w/w) of volatile oil.

The physicochemical analysis was carried out to determine some parameters of EO. The results (Table 1) showed: density (0.902), refractive index (1.501), EO levorotatory with optical rotation (-12.5°), freezing temperature (-18°C), low miscibility in ethanol with solubility (v/v) 1:3, acidity (1.12 mg KOH/g) and ester index (22.23 mg KOH/g).

The composition of *A. leucotrichus* Coss. & Dur. EO obtained by GC and GC-MS analysis is shown in Table 2. Nineteen compounds representing 98.62 % of the total EO content were identified. Monoterpenoids (oxygenated and hydrocarbons) were the main constituents of the EO amounting to 93.05 % of the total oil content. However, oxygenated monoterpene derivatives had the highest contribution to this fraction with perilla aldehyde being the main component detected (81.62 %). Monoterpene hydrocarbons fraction was even less represented only by limonene (8.29 %) and α -pinene (3.14 %). This chemical composition is relatively similar to that of the fruits *A. leucotrichus* subsp. *Leucotrichus* EO, growing wild in Western Sahara of North Africa, where a total of 21 compounds were detected, most of them; however, in trace amounts and the major constituent was perilla aldehyde (63.6 %) followed by limonene (26.8 %) and α -pinene (4.7 %)¹⁶. According to Abu Zarga *et al.*,¹⁷ perilla aldehyde (84.43 %) contained in the EO from another chemotype of this species (Guerrara in south-east Algeria) was the major component that has been reported to exhibit antibacterial properties.

The anti-mycotoxin effect and antifungal ac-

Table 1. Physicochemical parameters of *A. leucotrichus* Coss. & Dur. essential oil

Density D	Physical indices			Chemical indices		
	Refractive index N_{20}	Optical rotation	Freezing point (°C)	Solubility in ethanol 90 %	Acidity (mg KOH/g)	Ester index (mg KOH/g)
0.902	1.501	-12.5°	-18°C	1v : 3v	1.12	22.23

Table 2. Chemical composition of *A. leucotrichus* Coss. & Dur. essential oil

No.	IK ^a	Compounds	% Area
1	939	α -Pinene	3.14
2	953	Camphene	0.24
3	980	β -Pinene	0.65
4	991	β -Myrcene	0.41
5	1011	3-Carene	0.63
6	1031	Limonene	8.29
7	1165	Borneol	0.20
8	1189	α -Terpinéol	0.15
9	1239	Cuminaldehyde	0.19
10	1271	Perilla aldehyde	81.62
11	1285	Bornyl acetate	0.22
12	1295	Perilla alcohol	0.67
13	1376	α -Copaene	0.77
14	1418	Caryophyllene	0.15
15	1486	α -Curcumene	0.21
16	1494	Bicyclogermacrene	0.14
17	1504	β -Dihydroagarofuran	0.34
18	1576	Spathulenol	0.47
19	1653	α -Cadinol	0.13
		Total	98,62

^a Kováts indices calculated on DB5 column with reference to n-alkanes injected after the oil at the same chromatographic conditions

tivities of the EO are summarized in Tables 3 and 4. The results show that *A. leucotrichus* Coss. & Dur. EO has significant antifungal properties against two pathogens fungi. The percent inhibition in each assay showed a significant correlation with the MIC values ($P < 0.05$ and $P < 0.01$). The controls did not show an inhibitory effect on any of the fungi tested. Because of none-miscibility of EO with water and thus the culture medium, emulsification was performed with a 0.2 % agar solution.

The EO was found to be active against fungal biomass produced. The biomass formed by *A. flavus* MTTC 2799 was inhibited with minimum biomass inhibitory concentration (MIC^b) at 1/2000 (v/v) and *A. ochraceus* CECT 2092 at 1/1000 (v/v).

The mycotoxinogenic test revealed that AFB1 and OTA were not produced (absence of blue and green fluorescence into TLC plate) by *A. flavus* and *A. ochraceus* at MIC^b of 1/2000 and

1/1000 (v/v), respectively. This could be due either to a reaction between the mycotoxin and the EO that would form a non-fluorescent complex under UV¹⁸, or EO suppressed AFB1 and OTA production in a dose-dependent rate. According to Bhatnagar and McCormic¹⁹ extracts obtained from the upper parts of plants can also fully block the biosynthesis of mycotoxins. Tian *et al.*,²⁰ reported that perilla aldehyde (major component in our EO) inhibited synthesis of AFB1 by *A. flavus* at 0.4 ml/L.

For fungal mycelial growth, *A. ochraceus* was inhibited at minimum mycelial growth inhibitory concentration (MIC^m) as from 1/4000 (v/v), *A. flavus* was most sensitive, being inhibited at MIC^m as weak as 1/5000 (v/v). The EO was found to be fungicidal at minimal fungicidal concentration (MFC) as from 1/1500 against *A. flavus* and 1/370 (v/v) against *A. ochraceus*.

On the other hand, the EO showed *in vitro*, important antifungal activities against germination

Table 3. Inhibition fungal biomass produced, antifungal activities and results of mycotoxinogenic test of *A. leucotrichus* Coss. & Dur. essential oil

		Inhibition effect (%)	
		<i>Aspergillus flavus</i>	<i>Aspergillus ochraceus</i>
Control	Ib	0	0
	Im	0	0
	Is	0	0
	Ig	0	0
1/7500 (v/v)	Ib	10.38±0.9 (f)	59.01±0.5 (f)
	Im	73.33±0.3	60.65±0.6
	Is	48.75±0.6	100 ***
	Ig	95.41 **	100 ***
1/1500 (v/v)	Ib	100 *** (nf)	90.86 * (f)
	Im	100 ***	100 ***
	Is	100 ***	100 ***
	Ig	100 ***	100 ***
1/370 (v/v)	Ib	100 *** (nf)	100 *** (nf)
	Im	100 ***	100 ***
	Is	100 ***	100 ***
	Ig	100 ***	100 ***
1/150 (v/v)	Ib	100 *** (nf)	100 *** (nf)
	Im	100 ***	100 ***
	Is	100 ***	100 ***
	Ig	100 ***	100 ***
1/100 (v/v)	Ib	100 *** (nf)	100 *** (nf)
	Im	100 ***	100 ***
	Is	100 ***	100 ***
	Ig	100 ***	100 ***

* Significant at $p < 0.05$; ** significant at $p < 0.01$; ***significant at $p < 0.001$ according to controls;
 Ib: percentage inhibition of biomass formed; Im: antifungal index of mycelial growth;
 Is: percentage inhibition of sporulation Ig: percentage inhibition of germination
 f: appearance of fluorescence into TLC plate (blue fluorescence for Aflatoxins B and green fluorescence for Ochratoxin A);
 nf: absence of fluorescence into TLC plate
 Each value in the table was obtained by calculating the average of three experiments \pm standard deviation

Table 4. The minimum inhibitory concentration (MIC) and minimal fungicidal concentration (MFC)

Microorganisms	MIC ^b (v/v)	MIC ^m (v/v)	MIC ^s (v/v)	MIC ^g (v/v)	MFC (v/v)
<i>Aspergillus flavus</i>	1/2000 (nf)	1/5000	1/4500	1/7000	1/1500
<i>Aspergillus ochraceus</i>	1/1000 (nf)	1/4000	1/8000	1/8000	1/370

b: biomass; m: mycelial growth; s: sporulation
 g: germination; nf: absence of blue and green fluorescence into TLC plate

and sporulation spores. *A. flavus* was inhibited at minimum sporulation inhibitory concentration (MIC^s) as from as 1/4500 (v/v), *A. ochraceus* was most sensitive, being inhibited at MIC^s as weak as 1/8000 (v/v). In fact, the degree of inhibition of the EO tested on germination was different from the one exerted on mycelial growth. With proportion of EO corresponding to minimum germination inhibitory concentration (MIC^g) on mycelial development, 1/7000 (v/v) was sufficient to inhibit germination of *A. flavus* and 1/8000 (v/v) for *A. ochraceus*.

The results reported by El-haci²¹ showed that remarkable antifungal activity against filamentous fungi: *A. flavus*, *A. fumigatus* and *Fusarium oxysporum*, with an MIC values ranging from 0.25 to 0.5 µl/ml for mycelial growth and 0.5 to 0.75 µl/ml for sporulation. Louail *et al.*,²² certifies that the strongest inhibitory activity of oil was against *A. flavus* and *Penicillium expansum* with MIC 0.92 and 0.55 mg/ml, respectively.

Furthermore, Manssouri *et al.*,²³ indicated that the EO displayed significant potential of antifungal activity against the tested phytopathogenic fungi ($p < 0.05$). In poisoned food (PF) technique, the MICs were 0.5 µl/ml for *Botrytis cinerea* and *P. expansum* and 1 µl/ml for *Rhizopus stolonifer*. Whereas, in volatile activity (VA) assay, the complete inhibition of the mycelial growth of *B. cinerea* and *P. expansum* was observed at MIC 0.125 µl/ml air, and that of *R. stolonifer* was observed at MIC 0.25 µl/ml air.

The mechanisms of action of EO with its antimicrobial properties could be due to the large number of different groups of chemical compounds present in EO²⁴. The strong antifungal activity of this EO may be due to high content of oxygenated monoterpene derivative as perilla aldehyde (81.62 %). The presence of oxygen function in the structure increase the fungistatic properties of terpenoids, they exhibit a high antifungal activity as compared hydrocarbon monoterpenes²⁵. According to Tian *et al.*,²⁰ perilla aldehyde showed notable antifungal activity against mycelial growth of *A. flavus* at 0.5 and 0.08 ml/L in the air at contact and vapor conditions, respectively, and significantly inhibited spore germination at 0.5 ml/L. The accumulation of mycelial biomass of

A. niger was also inhibited by perilla aldehyde in a dose-dependent manner, completely inhibiting mycelial growth at 1 µl/ml²⁶. Also, compound such as cuminaldehyde (0.19 %), known for its natural mycostatic properties. It was found be very effective in inhibiting mycelium growth and decreasing AFB accumulation by *A. flavus*²⁷.

However, presence of hydrocarbon monoterpenes such as limonene (8.29 %) and α -pinene (3.14 %) in EO, recognized for their low antimicrobial activity with relatively small amounts²⁸.

Against fungi, cytotoxicity of essential oils, cause several damage; such as morphological disruption of mycelial hyphae, the rupture of the plasma membrane and damage cellular enzyme system¹⁸. Also, the antimicrobial mechanism of terpenes may be attributed to the mitochondrial dysfunction-induced the reactive oxygen species accumulation in fungal cell which eventually leads to fungal cell death²⁰. Further experiments indicated that perilla aldehyde activated a membrane-active mechanism that inhibits ergosterol synthesis, increases membrane permeability (as evidenced by extracellular pH and conductivity measurements), and disrupts membrane integrity, leading to cell death²⁶.

Finally, Oussalah *et al.*,²⁹ have shown that the essential oils inhibit spore germination, fungal growth, sporulation and mycotoxins production.

Conclusion

The results of this *in vitro* study showed that the EO of *A. leucotrichus* Coss. & Dur. exhibited very important antifungal properties against pathogenic fungi. EO caused the inhibition of AFB1 and OTA synthesis, mycelial growth, germination and sporulation spores. This oil can be used as antifungal and anti-mycotoxin therapeutic agent, as a food supplement, against selected food-borne pathogen fungi, or in the cosmetic and pharmaceutical industries.

Acknowledgements

The authors wish to thank the pedagogical Biology laboratory of Tahri Mohamed Bechar University for their help in obtaining the fungal strains used in this investigation and for providing all facilities to carry out this study.

References

1. **Ebru, S.Y., Mahir, T., Belma, A. (2013).** Antimicrobial, Antioxidant Activity of the Essential Oil of Bay Laurel from Hatay, Turkey. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*. 16: 108-116.
2. **Tian, J., Ban, X., Zeng, H., He, J., Chen, Y., Wang, Y. (2012).** The Mechanism of Antifungal Action of Essential Oil from Dill (*Anethum graveolens* L.) on *Aspergillus flavus*. *PLoS ONE*., 7(1): e30147, 10 p.
3. **IUCN: International Union for Conservation of Nature and Natural Resources. (2005).** A guide to medicinal plants in North Africa. IUCN The World Conservation Union, 1st edition, Centre for Mediterranean Cooperation, Malaga, Spain., pp. 27-28.
4. **Abu-Zarga, M.H., Al-Jaber, H.I., Baba-Amer, Z.Y., Sakhrif, L., Al-Qudah, M.A., Al-humaidi, J.Y.G., Abaza, I.F., Afifi, F.U. (2013).** Chemical Composition, Antimicrobial and Antitumor Activities of Essential Oil of *Ammodaucus leucotrichus* Growing in Algeria. *Journal of Biologically Active Products from Nature*. 3(3): 224-231.
5. **AFNOR (1992).** Recueil des Normes Françaises ; Détermination des caractéristiques physiques et chimiques des huiles essentielles. Association Française de normalisation.
6. **Adams, R.P. (2007).** Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry, 4th Ed. Allured Publishing Co. Carol Stream, Illinois.
7. **Danmek, K., Intawicha, P., Thana, S., Sorachakula, C., Meijer, M., Samson, R.A. (2014).** Characterization of cellulase producing from *Aspergillus melleus* by solid state fermentation using maize crop residues. *African Journal of Microbiology Research*. 8(24): 2397-2404.
8. **Dhandhukia, P.C., Thakkar, V.R. (2007).** Standardization of growth and fermentation criteria of *Lasiodiplodia theobromae* for production of jasmonic Acid. *African Journal of Biotechnology*. 6(6): 707-712.
9. **Imtiaj, A., Lee, T.S. (2007).** Screening of antibacterial and antifungal activities from Korean wild mushrooms. *World Journal of Agricultural Sciences*. 3(3): 316-321.
10. **Amrouche, A., Benmehdi, H., Moussaoui, A., Mebarki, K., Chaoufi, A., Saneba, A., Lazouni, A.H., Chabane Sari, D. (2011).** Evaluation of antifungal activity of some oils from Algerian medicinal plants against *Aspergillus flavus* strain produced aflatoxins. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*. 01(08): 48-53.
11. **Amarti, F., Satrani, B., Aafi, A., Ghanmi, M., Farah, A., Aberchane, M., El Ajjouri, M., El Antry, S., Chaouch, A. (2008).** Composition chimique et activité antimicrobienne des huiles essentielles de *Thymus capitatus* et de *Thymus bleicherianus* du Maroc. *Phytothérapie, Springer*. 6: 342-347.
12. **Singh, P., Kumar, A., Dubey, N.K., Gupta, R. (2009).** Essential Oil of *Aegle marmelos* as a Safe Plant-Based Antimicrobial Against Postharvest Microbial Infestations and Aflatoxin Contamination of Food Commodities. *Journal of Food Science*. 74 (6): 302-307.
13. **Kumar, A., Shukla, R., Singh, P., Prasad, C.S., Dubey, N.K. (2008).** Assessment of *Thymus vulgaris* L. essential oil as a safe botanical preservative against post harvest fungal infestation of food commodities. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol*. 9: 575-580.
14. **Serghat, S., Mouria, A., Ouazzani touhami, A., Badoc, A., Douria, A. (2004).** Effet de quelques fongicides sur le développement in vitro de *Pyricularia grisea* et *Helminthosporium oryzae*. *Bull. Soc. Pharm. Bordeaux*. 143: 7-18.
15. **Maouni, A., Lamarti, A., Douria, A., Badoc, A. (2001).** Effet de dérivés calciques sur le développement de moisissures lors de la conservation des poires. *Bull. Soc. Pharm. Bordeaux*. 140: 79-88.
16. **Velasco-Negueruela, A., Pérez-Alonso, M.J., Pérez de Paz, P.L., Palà-Paul, J., Sanz, J. (2006).** Analysis by gas chromatography-mass spectrometry of the volatiles from the fruits of *Ammodaucus leucotrichus* subsp. *Leucotrichus* and subsp. *nanocarpus* grown in North Africa

- and the Canary Islands, respectively. Elsevier B.V. Journal of Chromatography A. 1108: 273-275.
17. **Abu Zarga, M.H., Al-Jaber, H.I., Baba Amer, Z.Y., Sakhrif, L., Al-Qudah, M.A., Al-humaidi, J.Y.G., Abaza, I.F., Afifi, F.U. (2013).** Chemical Composition, Antimicrobial and Antitumor Activities of Essential Oil of *Ammodaucus leucotrichus* Growing in Algeria. Journal of Biologically Active Products from Nature. 3(3): 224-231.
 18. **Adjou, E.S., Soumanou, M.M. (2013).** Efficacité des extraits de plantes dans la lutte contre les moisissures toxigènes isolées de l'arachide en post-récolte au Bénin. Journal of Applied Biosciences. 70: 5555-5566.
 19. **Bhatnagar, D., McCormick, S.P. (1988).** The inhibitory effect of neem (*Azadirachta indica*) leaf extracts on aflatoxin synthesis in *Aspergillus parasiticus*. Journal of the American Oil Chemical Society. 65: 1166-1168.
 20. **Tian, J., Zeng, X., Lü, A., Zhu, A., Peng, X., Wang, Y. (2015).** Perillaldehyde, a potential preservative agent in foods: Assessment of antifungal activity against microbial spoilage of cherry tomatoes. LWT-Food Science and Technology. 60: 63-70.
 21. **El-Haci, I.A., Bekhechi, C., Atik-Bekkara, F., Mazari, W., Gherib, M., Bighelli, A., Casanova, J., Tomi, F. (2014).** Antimicrobial activity of *Ammodaucus leucotrichus* fruit oil from Algerian Sahara., Nat. Prod. Commun. 9(5):711-2.
 22. **Louail, Z., Kameli, A., Benabdelkader, T., Bouti, K., Hamza, K., Krinat, S. (2016).** Antimicrobial and antioxidant activity of essential oil of *Ammodaucus leucotrichus* Coss. & Dur. seeds. J. Mater. Environ. Sci. 7(7): 2328-2334.
 23. **Manssouri, M., Znini, M., El Harrak, A., Majid, L. (2016).** Antifungal activity of essential oil from the fruits of *Ammodaucus leucotrichus* Coss. & Dur., in liquid and vapour phase against postharvest phytopathogenic fungi in apples. J. App. Pharm. Sci. 6(5): 131-136.
 24. **Susanti, D., Awang, N.A, Qaralleh, H., Sheikh Mohamed, H.I., Attoumani, N. (2013).** Antimicrobial Activity and Chemical Composition of Essential Oil of Malaysian *Etilingera elatior* (Jack) R.M. Smith Flowers. Journal of Essential Oil Bearing Plants. 16(2): 294-299.
 25. **Akrout, A., El Jani, H., Amouri, S., Neffati, M. (2010).** Screening of Antiradical and Antibacterial Activities of Essential Oils of *Artemisia campestris* L., *Artemisia herba alba* Asso, & *Thymus capitatus* Hoff. Et Link. Growing Wild in the Southern of Tunisia. Recent Research in Science and Technology. 2: 1, 29-39.
 26. **Tian, J., Wang, Y., Zeng, H., Li, Z., Zhang, P., Tessema, A., Peng, X. (2015).** Efficacy and possible mechanisms of perillaldehyde in control of *Aspergillus niger* causing grape decay. Int. J. Food Microbiol. 202, 27-34.
 27. **Degola, F., Morcia, C., Bisceglie, F., Mussi, F., Tumino, G., Ghizzoni, R., Pelosi, G., Terzi, V., Buschini, A., Restivo, F.M., Lodi, T. (2015).** *In vitro* evaluation of the activity of thiosemicarbazone derivatives against mycotoxigenic fungi affecting cereals. International Journal of Food Microbiology. 200: 104-111.
 28. **Amarti, F., Satrani, B., Ghanmi, M., Abdellah, F., Abderrahman, A., Lotfi, A., Mustapha, E., Abdelaziz, C. (2010).** Composition chimique et activité antimicrobienne des huiles essentielles de *Thymus algeriensis* Boiss. Reut. et *Thymus ciliates* (Desf.) Benth. du Maroc. Biotechnol. Agron. Soc. Environ., 14(1): 141-148.
 29. **Oussalah, M., Caillet, S., Saucier, L., Lacroix, M. (2007).** Inhibitory effects of selected plant essential oils on four pathogen bacteria growth : *E.coli* O157H7, *Salmonella Typhimurium*, *Staphylococcus Aureus* and *Listeria Monocytogenes*. s.l. : Food control., 18(5): 414-420.



Chemical composition and antifungal activity of essential oil of *Anethum graveolens* L. from South-western Algeria (Bechar)

Achraf Khaldi^{a*}, Boumedién Meddah^{a,b}, Abdellah Moussaoui^a, Pascal Sonnet^c and Moulay M'hammed Akermey^d

^aLaboratory of Plant Resource Development and food Security in Semi-Arid Areas, South West of Algeria, University of Tahri Mohamed, Bechar, Algeria

^bLaboratory of Bioconversion, Microbiology Engineering and Sanitary Security, University of Mascara, Algeria

^cLaboratory Glycochemistry, of antimicrobials and Agroressources (LG2A), University of Picardie, Amiens France

^dDepartment of Biology, University of Tahri Mohamed, Bechar, Algeria

ABSTRACT

The essential oil of *Anethum graveolens* L. seeds growing wild in South-western Algeria (Bechar) was obtained by hydrodistillation and investigated by GC and GC/MS. Fifteen compounds were identified, which comprised 98.93% of the total constituents. The main compounds were apiol (32.78%) and carvone (31.04%), followed by limonene (21.26%); piperitone (6.11%) and α -phellandrene (3.28%) amounted to 94.47% of the oil. The antifungal properties of the selected oil were tested against seven fungi. The results of direct contact method showed that the oil was active against mycelial growth of fungal. All strains were inhibited at minimum inhibitory concentrations (MICs) as from 1/500 v/v, except *Aspergillus niger* at MIC (1/180 v/v). *Alternaria alternata* was most sensitive, being inhibited at MIC as weak as 1/6500 v/v. In the other hand, a concentration of 1/370 v/v was sufficient to inhibit the sporulation and spores' germination.

Keywords: *Anethum graveolens* L., GC-MS, Essential oil, Antifungal activity.

INTRODUCTION

Plant used for traditional medicine contains a wide range of substances that can be used to treat chronic as well as infectious diseases[1]. In recent years there has been an increasing interest in the use of natural substances, and some questions concerning the safety of synthetic compounds have encouraged more detailed studies of plant resources. Essential oils, odors and volatile products of plant secondary metabolism, have a wide application in folk medicine as well as in fragrance industries[2], they have been used by several workers for controlling fungi, bacteria, viruses and insect pests. The main reasons for using essential oils as antifungal agents is their natural origin and low chance of pathogens developing resistance[3]. The plant used in this study, *Anethum graveolens* L. or dill, belonging to Apiaceae (Umbelliferae) family, was selected based on its traditional use in Algerian medicine. It is an annual aromatic herb known for culinary and medicinal use since ancient times, growing in the Mediterranean region, but it is native to southwest Asia or southeast Europe, is widely used for flavoring foods and beverages due to its pleasant spicy aroma, and for the treatment of many pathological conditions such as disease of the uterus and cervical ectropio[4]. Its pharmacological properties, such as its antibacterial activity, as well as antihyperlipidemic and antihypercholesterolemic effects[5], antimycobacterial, antioxidant, cancer

chemopreventive, antidiabetic, and anti-inflammatory[6] have been reported. Dill has been also used traditionally in Algeria for gastrointestinal ailments such as flatulence, indigestion, stomachache colic and to tract intestinal gas.

In the course of a study aimed at phytochemical screening of the South-western Algeria flora, we wish to report here the study of the antifungal activity and chemical composition of essential oil of *A. graveolens* L. Seeds.

EXPERIMENTAL SECTION

Plant material

The seed parts of *A. graveolens* L. plant were harvested from the Igli Region of Bechar Department (South-West of Algeria), distanced from Algiers of 999 km. A voucher specimen (LB/13/UB-005) of the plant was deposited at the herbarium of laboratory of botany at the biology Institute, University Tahri Mohamed Bechar.

Essential oil isolation

The seeds of *A. graveolens* L. were submitted for 4 h to hydrodistillation using a Clevenger-type apparatus according to the European Pharmacopoeia method [7]. The essential oils were dried over anhydrous sodium sulphate and then stored in sealed glass vials at 4 to 5°C prior to analysis.

Gas chromatography and Mass spectroscopy analysis

A Hewlett-Packard HP6890 gas chromatograph equipped with a DB-5 fused silica capillary column (30 m x 0.25 mm i.d. x 0.25 µm film thickness, J&W Scientific) and a FID detector regulated with 260°C and supplied with a mixture of gas H₂/Air and a Split-splitless injector regulated with 240°C were used for the percentage determination of oil components. The mode of injection is Split (split ratio: 1/50, flow: 66 ml/minutes). The gas used is the nitrogen with a flow rate of 1.7 ml/minutes. The temperature of the column is programmed from 60 to 325°C at a rate of 4°C/minutes. The apparatus is controlled by a computing system of the type « HP ChemStation », managing the operation of the apparatus and allowing following the evolution of the chromatographic analysis. The Volume injected is 1 µl. Retention indices were calculated using the retention time of n-alkanes that were injected after the oil at the same chromatographic conditions. Identification of the oil components was based on their indices of Kováts (IK) and by comparison of their mass spectral fragmentation patterns with those reported in the literature [8], and mass spectra, obtained from the GC-MS analysis on a Hewlett-Packard HP6890/HP5973 instrument equipped with a DB-5 fused silica capillary column (30 m x 0.25 mm i.d. x 0.25 µm film thickness, J&W Scientific) was used with helium as carrier gas at a flow rate of 2 ml/minutes. The GC analytical parameters were the same as those listed above, and the mass spectrometry was run in the electron impact (EI) at 70 eV.

Antifungal activity

Fungal strains

Seven fungal (*Aspergillus niger* MTTC2425, *Aspergillus flavus* MTTC 2799, *Aspergillus ochraceus* CECT 2092, *Penicillium expansum* MTTC 1344, *Fusarium oxysporum f.sp. albedinis*, *Alternaria alternata* MTCC 2724 and *Cladosporium species* MTCC 1003) were used to evaluate the Antifungal properties of the essential oil. They belong to the fungus collection of biology laboratory of Bechar University. They are cultivated on nutritive medium PDA (*potato dextrose agar*) during seven days in the darkness and at room temperature 25°C. To prepare spore suspension, the fungi grown spores were suspended in 0.85% (w/v) sodium chloride to prepare the homogeneous spore suspension [9], using Malassez hematimeter in order to obtain the concentration of 10⁵ spore/ml.

Evaluation of the radial growth on solid medium

The minimum inhibitory concentrations (MIC) of essential oil were measured according to the contact direct method. Because of none-miscibility of essential oil with water and thus the culture medium, emulsification was performed with a 0.2% agar solution [10]. Dilutions of 1/10, 1/15, 1/37, 1/150 and 1/750 were prepared in the agar solution. In the test tubes containing each one 13,5 ml of solid medium PDA, autoclaved for 20 minutes at 121°C and cooled to 45°C, aseptically added 1.5 ml of each dilution in order to obtain final concentrations 1/100, 1/150, 1/370, 1/1500 and 1/7500 (V/V). Controls containing culture medium and 0.2% agar solution alone are also prepared. After agitation, the selected solutions were transferred into a Petri plates which were inoculated with spore solution, the incubation was carried out at 25°C for 7 days [11]. The antifungal index is calculated by the following formula: PI = [(DT - D) / DT] × 100 %. D is mean diameter of mycelial growth of the test and DT is mean diameter of mycelial growth in control [12].

Evaluation of the sporulation

From the dishes used for the evaluation of the mycelial growth on solid medium, incubated at 25°C for 10 day for each strain at various concentrations were taken four washers 5mm diameter and transposed into tubes containing 1ml of sterile distilled water. Fungal suspension is then agitated using a vortex mixer to release the spores of the conidiophores. One counts the total number of spores using a Malassez cell at a rate of 10 counts per suspension. The values are expressed as number of spores per unit area (mm²) [13]. The percentage inhibition of sporulation is determined by the following formula: $I_s = [(N_0 - N_c) / N_0] \times 100 \%$. N_0 is mean number of the spores estimated in control and N_c is mean number of the spores estimated in the presence of essential oil.

Evaluation of germination

The sporal suspension collected was adjusted to 10⁵ spores/ml of distilled water using a Malassez cell. 0.1 ml of the suspension sporal was plated on petri dishes containing PDA medium to which oils are incorporated at the same concentrations as above with three repetitions performed simultaneously by concentration. Counting spores germinated or not was performed on a total of 200 spores after 18 hours of incubation at 25°C in the dark. A spore was considered germinated if length of the germ tube is higher than its smaller diameter [14]. The percentage inhibition of germination is determined by the following formula: $I_g = (N_0 - N_c) / N_0 \times 100\%$. N_0 is mean number of germinated spores in control and N_c is mean number of germinated spores in the presence of essential oil.

RESULTS AND DISCUSSION

The physicochemical analysis showed an essence light yellow with a spicy smell (aniseed). Oil yield of the plant was determined as 2.10% (w/w), is low compared with that most usually obtained from dill seeds of china (3.5%) [5] and Uzbekistan (4.2%) [15]; however, it is superior with those reported in the literature for the oil dill seeds of Turkey (0.23%) [6].

The essential oil of *A. graveolens* L. was analysed by chromatography (GC) and gas chromatography-mass spectral (GC-MS). 15 compounds, representing 98.93% of the total essential oil content of *A. graveolens* L., were identified (Table 1). The most prominent components were apiol (32.78%) and carvone (31.04%), followed by limonene (21.26%), piperitone (6.11%) and α -phellandrene (3.28%). They constituted 94.47% of total oil. According to Small [16], the essential oil of dill consists of over 10 different aromatic compounds; carvone, limonene and α -phellandrene constitute approximately 90% of total compounds. Attokaran [17] reported that, the main compound of essential oil from seeds of dill is the carvone with a rate of 30 to 60%. Although highly heterogeneous, qualitatively the data appear to be in agreement with those reported for the essential oil composition of *A. graveolens* L. from China, Iran and India are rich in carvone, limonene and dill apiol [5, 17, 18]. Other chemotypes such as oils from the Uzbekistan and Romania are characterized by a high quantity of carvone, limonene and trans-dihydrocarvone [19, 20]. However, our essential oil differs from those reported by Vera and Chane-Ming [21] for the Icelandic oil and Orhan and al., [6] for the oil of Turkey, they are rich in α -phellandrene.

Table 1. Chemical composition of volatile oil of *A. graveolens* L.

N°	IK	Composés	SsAire %	N°	IK*	Composés	SsAire %
1	937	1R- α -pinène	0.54	9	1139	L-camphor	0.53
2	976	sabinene	0.20	10	1184	Dill ether	0.67
3	991	myrcene	0.19	11	1193	dihydrocarvone	0.30
4	1001	2-carene	0.22	12	1200	E-dihydrocarvone	1.18
5	1005	α -phellandrene	3.28	13	1242	carvone	31.04
6	1026	p-cymène	0.51	14	1252	piperitone	6.11
7	1031	limonene	21.26	15	1680	apiol	32.78
8	1076	o-Isopropenyltoluene	0.12	Total identified			98,93 %

Note: * Kováts indices calculated on DB5 column with reference to n-alkanes injected after the oil at the same chromatographic conditions.

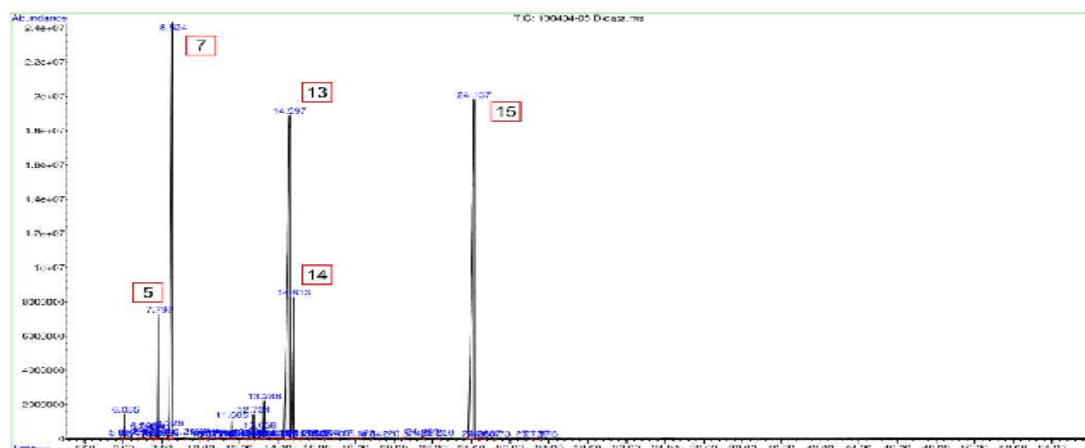


Figure 1. GC-MS analysis of *A. graveolens* L. essential oil (the numbers of the peaks can be identified in table 1)

The essential oil of *A. graveolens* L. pronounced antifungal efficacy against all tested fungi (Table 2). For fungal mycelial growth, all strains were inhibited at MICs as from 1/500 v/v, except *A. niger* at MIC 1/180 v/v. *Alternaria alternata* was most sensitive, being inhibited at MIC as weak as 1/6500 v/v. However, concentration of 1/370 v/v was found fungicide for all tested strains, except *A. niger* at 1/150 v/v. On the other hand, the essential oil showed, *in vitro*, an important antifungal activity against germination and sporulation spores'. All fungal strains were inhibited at concentrations as weak as 1/370 v/v. *F. oxysporum f.sp. albedinis* and *Alternaria alternata* were most sensitive, being inhibited as from 1/1500 v/v, *A. flavus* also was inhibited to sporulate at this concentration.

Table 2. Antifungal activity of essential oil from *A. graveolens* L. expressed in (%) with MIC (v/v)

		<i>Aspergillus flavus</i> MTTC 2799	<i>Aspergillus ochraceus</i> CECT 2092	<i>Aspergillus niger</i> MTTC 2425	<i>Fusarium oxysporum f.sp. albedinis</i>	<i>Penicillium expansum</i> MTTC 1344	<i>Alternaria alternata</i> MTCC 2724	<i>Cladosporium species</i> MTCC 1003
Control	a	0	0	0	0	0	0	0
	b	0	0	0	0	0	0	0
	c	0	0	0	0	0	0	0
1/7500 (v/v)	a	8.39	11.62	11.94	36.36	36.53	58.82	23.80
	b	50	22.07	31.57	44.44	20	29.16	51.25
	c	73.91	77	70.30	88.50	81.05	92.85	89.09
1/1500 (v/v)	a	51.56	23.25	30.91	45.45	42.30	100	50.33
	b	100	42.85	78.97	100	42	100	61.25
	c	91.30	92	87.28	100	94.73	100	94.44
1/370 (v/v)	a	100 (f)	100 (f)	77.61	100 (f)	100 (f)	100 (f)	100 (f)
	b	100	100	100	100	100	100	100
	c	100	100	100	100	100	100	100
1/150 (v/v)	a	100	100	100 (f)	100	100	100	100
	b	100	100	100	100	100	100	100
	c	100	100	100	100	100	100	100
1/100 (v/v)	a	100	100	100	100	100	100	100
	b	100	100	100	100	100	100	100
	c	100	100	100	100	100	100	100
MIC (v/v)	1/550	1/550	1/180	1/750	1/500	1/6500	1/600	

Notes: a, radial growth; b, sporulation; c, germination; f, fungicidal effect.

A previous study reported that dill seed oil is found to be highly effective for controlling the growth of *P. citrinum* and *A. niger* by poison food techniques. Moreover, the volatile oil completely inhibited the growth of *Fusarium graminearum* at 6 μ l dose [22]. In others studies, the MICs of this oil for four tested fungi (*A. flavus*, *A. oryzae*, *A. niger* and *Alternaria alternata*) was found to be 2 μ l/ml [5].

The antifungal activity of this essential oil might be due to their major's contents of esters (apiol) and terpene ketone (carvone) compounds, because the hydrocarbon monoterpenes such as limonene (21.26%) recognized for their low antimicrobial activity [11]. According Akono and al., [23], the biological activity of an essential oil is related to its

chemical composition, structure and functional groups of their constituents (alcohols, phenols, ethers, aldehydes and terpene ketone compounds), knowing that the proportions of the major compounds play a key role [24]. Also, Soković and al., [25], have shown that ketones, aldehydes and alcohols are active, exhibit strong antimicrobial activity, but with differing specificity and levels of activity, which is related to the present functional group, but also associated with hydrogen-bonding parameters in all cases. The presence of an oxygen function (such as carvone) in the framework increases the antimicrobial properties of terpenoids. The active antimicrobial compounds of essential oils are generally terpenes. The mechanism of this class of compounds is not fully understood but is speculated to involve membrane disruption by lipophilic compounds [5]. Indeed, dill oil was previously found to have a strong acetylcholinesterase-butrylcholinesterase inhibiting property [6]. Tian and al., [4] reported that the plasma membrane and the mitochondria are the antifungal targets of dill oil.

Finally, previous studies confirm that essential oils have multiple functions, inhibit spore germination, elongation of the mycelium and sporulation [26].

CONCLUSION

From these results, it appeared that the essential oil of *A. graveolens* L. seed exhibited high antifungal activity according to the amount of esters and terpene ketone compounds. This oil can be used as an antifungal therapeutic agent and may be suggested as an alternative fungicide.

Acknowledgements

The authors thank the pedagogical Biology laboratories of Tahri Mohamed Bechar University for their help in obtaining the fungal strains used in this study.

REFERENCES

- [1] S Suganya; R Bharathidasan; G Senthilkumar; P Madhanraj; A Panneerselvam. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research.*, 2012, 4(3), 1846-1850.
- [2] M Vimal; PP Vijaya; P Mumtaj; MS Seema Farhath. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research.*, 2013, 5(1), 248-253.
- [3] MM Zerroug; H Laouer; RN Strange; J Nicklin. *Advances in Environmental Biology.*, 2011, 5(2), 501-506.
- [4] J Tian; X Ban; H Zeng; J He; Y Chen; Y Wang. *PLoS ONE.*, 2012, 7(1), e30147, 10 p.
- [5] J Tian; X Ban; H Zeng; B Huang; J He; Y Wang. *Food Control.*, 2011, 22, 1992-1999.
- [6] IE Orhan; FS Senol; N Ozturk; SA Celik; A Pulur; Y Kan. *Food and chemical toxicology.*, 2013, 59, 96-103.
- [7] Council of Europe. European directorate for quality of medicines In: *European Pharmacopeia*, 6th edn, Council of Europe, Strasbourg, France, 2007.
- [8] RP Adams. *Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry*, 4th Ed, Allured Publishing Co, Carol Stream, Illinois, 2007, 31-43.
- [9] K Danmek; P Intawicha; S Thana; C Sorachakula; M Meijer; RA Samson. *African Journal of Microbiology Research.*, 2014, 8(24), 2397-2404.
- [10] F Amarti; B Satrani; M Ghanmi; F Abdellah; A Abderrahman; A Lotfi; E Mustapha; C Abdelaziz. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.*, 2010, 14(1), 141-148.
- [11] F Amarti; B Satrani; A Aafi; M Ghanmi; A Farah; M Aberchane; M El Ajjouri; S El Antry; A Chaouch. *Phytother.*, 2008, 6, 342-347.
- [12] P Singh; A Kumar; NK Dubey; R Gupta. *J. food sci.*, 2009, 74(6), 302-307.
- [13] S Serghat; A Mouria; A Ouazzani touhami; A Badoc; A Douria. *Bull. Soc. Pharm. Bordeaux.*, 2004, 143, 7-18.
- [14] A Maouni; A Lamarti; A Douria; A Badoc. *Bull. Soc. Pharm. Bordeaux.*, 2001, 140, 79-88.
- [15] A Yili; HA Aisa; VV Maksimov; ON Veshkurova; ShI Salikhov. *Chemistry of Natural Compounds.*, 2009, 45(2), 280-281.
- [16] E Small. *Culinary Herbs*, Edition 2nd Revised, Canadian Science Publishing (NRC Research Press), Canada, 2006, 151-159.
- [17] M Attokaran. *Natural Food Flavors and Colorants*, 1st ed, Wiley-Blackwell, Oxford, 2011, 49-50.
- [18] L Roomiani; M Soltani; A Akhondzadeh Basti; A Mahmoodi; A Taheri Mirghaed; F Yadollahi. *Iranian Journal of Fisheries Sciences.*, 2013, 12(3) 702-716.
- [19] A Yili; HA Aisa; VV Maksimov; ON Veshkurova; ShI Salikhov. *Chemistry of Natural Compounds.*, 2009, 45(2), 280-281.

- [20] V Radulescu; ML Popescu; DC Ilies. *FARMACIA.*,**2010**, 58(5), 594-600.
[21] RR Vera; J Chane-Ming.*j. Essent. Oil Res.*,**1998**,10(5), 539-542.
[22] G Singh;S Maurya;MP De Lampasona; C Catalan.*Journal of Food Science.*, **2005**,70(4), 208-215.
[23] PN Akono ; P Belong ;F Tchoumboungang ;EM Bakwo Fils ; H Fankem. *J. Appl. Biosci.*, **2012**, 59, 4340-4348.
[24] M Lahlou. *Phytotherapy research.*, **2004**, 18, 435-448.
[25] M Soković;PD Marin;D Brkić; LJLD Van Griensven. *Food.*, **2007**, 1(1), 1-7.
[26] M Oussalah;S Caillet;L Saucier; M Lacroix. *Food control.*,**2007**, 18(15), 414-420.