

République Algérienne Démocratique et Populaire

Université Abdelhamid Ibn Badis-Mostaganem
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie



جامعة عبد الحميد ابن باديس - مستغانم
كلية علوم الطبيعة و الحياة

DÉPARTEMENT DE BIOLOGIE

MÉMOIRE DE FIN D'ÉTUDES

Présenté par

BOURAS Nouria
HACHEMI Aicha

Pour l'obtention du diplôme de

Master en Biologie

Spécialité: Biotechnologie et Valorisation des Plantes

THÈME

Etude préliminaire des activités biologiques
(insecticide et antifongique) des huiles essentielles de
deux plantes aromatiques *Thymus* sp. et *Origanum* sp.

Soutenu publiquement le : Juillet 2019

DEVANT LE JURY :

Présidente M^{me} BERGHEUL S.

M.C.B Univ. Mostaganem

Examinatrice M^{me} SAIAH F.

M.C.B Univ. Mostaganem

Encadreur M^{me} BADAOUI M.I

M.C.B Univ. Mostaganem

Thème réalisé au Laboratoire de Protection des Végétaux

Année Universitaire: 2018/2019

Remerciement

Tout d'abord, merci à DIEU tout puissant ALLAH *de nous avoir donné la force, la volonté et la patience pour achever ce modeste travail.*

Nous tenons à exprimer notre profonde gratitude et sincères remerciements à notre promotrice **Mme BADAOUI M.I.** d'avoir proposé et dirigé ce travail; on la remercie infiniment pour ses importantes remarques, ses orientations, ses conseils, sa patience et sa confiance tout au long de ce travail.

Nous remercions sincèrement les membres du jury : **M^{me} BERGHEUL S.** pour nous avoir fait l'honneur de présider le jury : **M^{me} SAIAH F.** pour nous avoir fait l'honneur d'examiner ce mémoire.

Nous remercions vont également au personnel des laboratoires pédagogiques de protection des cultures, de phytopathologie et de biochimie de l'Université Abdelhamid Ibn Badis, pour leur accueil et leur sympathie. Nos sincères remerciements s'adressent également à tous les collègues des promotions BIOTECHNOLOGIE ET VALORISATION DES PLANTES au département de biologie et PROTECTION DES CULTURES au département d'agronomie.

Dédicaces

*je dédie ce travail : A mon dieu l'unique maitre de terre et des
cieux Ames parents ; Ma mère qui m'a donné la vie et cette
éducation que j'avais tant besoin qui est toujours présent pour
moi. Mon père qui m'a tout donné, qui s'est battu pour que je
puisse étudies dans très bonne condition.*

A me très cher frère : Miloud

*A mes très chers sœurs Nour El houda Qui m'ont encouragé à
finir mes études et aller jusqu'au bout a qui je souhait tout les
bonheurs de monde « Que dieu les protègent »*

A tout la famille Hachemi et kharratte



Dédicaces

C'est grâce à dieu, tout puissant qui m'a donné le courage et la volonté pour achever ce modeste travail que je dédie :

A mon très cher papa et ma très chère maman pour leurs sacrifices, leurs soutiens moral, de leur tendresse, de leurs encouragements tout au long de mes études et durant ce mémoire, ils m'ont offert tout pour que je réussisse, je ne les remercierai jamais assez pour tout ce qu'ils m'ont fait, j'espère qu'ils sont fiers de moi.

Ame très cher frère : Mohamed Abdallah



Résumé

Dans le cadre d'une valorisation des ressources naturelles, il nous a paru intéressant d'étudier l'action insecticide et antifongique des huiles essentielles de deux plantes aromatiques *Thymus* sp. et *Origanum* sp. poussant à l'état spontané en l'Algérie. La présente étude a pour objectif de proposer des solutions alternatives basées sur l'utilisation des produits naturels pour lutter contre le ver blanc.

L'objectif principal de notre travail est de vérifier l'efficacité « *in vitro* » des huiles essentielles de *Thymus* sp. et d'*Origanum* sp. sur les larves de ver blanc et de tester en même temps leur effet sur les champignons entomopathogènes *Beauveria* sp. et *Fusarium* sp..

Les résultats de la première partie montrent que les larves du ver blanc sont fortement sensibles à l'effet de l'HE de *Thymus* sp. en comparaison avec celui de l'*Origanum* sp.. L'utilisation du thym pour contrôler ce ravageur a permis d'observer des taux de mortalité supérieure à 92% au 5^{ème} jour à la dose de 0.031% ; tandis que pour les individus exposés à l'effet de l'HE de l'origan moins de 61% de la population larvaire a été éliminée au même jour et à la même dose.

L'analyse des résultats de l'activité antifongique des HEs des deux plantes aromatiques vis-à-vis les entomopathogènes *Beauveria* sp. et *Fusarium* sp. montrent que l'HE de *Thymus* sp. a une capacité inhibitrice de la croissance mycélienne inférieure à celle d'*Origanum* pour les deux souches d'entomopathogènes testées.

Mots clés : *Thymus* sp., *Origanum* sp., huile essentielle (HE), effet larvicide, ver blanc, activité antifongique, *Beauveria* sp. et *Fusarium* sp..

Abstract

As part of a natural resources development, it seemed interesting to study the insecticidal and antifungal action of the essential oils of two aromatic plants *Thymus* sp. and *Origanum* sp. pushing to the spontaneous state in Algeria. The present study aims to propose alternative solutions based on the use of natural products to fight against the white grub.

The main objective of our work is to verify the effectiveness "*in vitro*" of the essential oils of *Thymus* sp. and *Origanum* sp. on whiteworm larvae and at the same time test their effect on entomopathogenic fungi *Beauveria* sp. and *Fusarium* sp ..

The results of the first part show that whiteworm larvae are highly sensitive to the effect of *Thymus* sp. in comparison with that of *Origanum* sp..The use of thyme to control this pest allowed to observe mortality rates greater than 92% at the 5th day at a dose of 0.031%; while for individuals exposed to the effect of oregano HE less than 61% of the larval population was eliminated on the same day and at the same dose.

The analysis of the results of the antifungal activity of the HEs of the two aromatic plants with respect to the entomopathogens *Beauveria* sp.et *Fusarium* sp. show that the HE of *Thymus* sp. has a lower inhibitory capacity for mycelial growth than *Origanum* for both strains of entomopathogens tested.

Key words: *Thymus* sp., *Origanum* sp., Essential oil (HE), larvicidal effect, White worm, antifungal activity, *Beauveria* sp. and *Fusarium* sp.

ملخص

كجزء من تنمية الموارد الطبيعية ، بدأ من المثير للاهتمام دراسة المبيدات الحشرية والفطريات للزيوت الأساسية لنبتتين عطريتين *Thymus sp.* و *Origanum sp.* دفع إلى الدولة العفوية في الجزائر. تهدف هذه الدراسة إلى اقتراح حلول بديلة تعتمد على استخدام المنتجات الطبيعية لمحاربة اليرقة البيضاء.

الهدف الرئيسي من عملنا هو التحقق من فعالية "في المختبر" للزيوت الأساسية من *Thymus sp.* و *Origanum sp.* على يرقات الدودة البيضاء وفي الوقت نفسه اختبار تأثيرها على الفطريات المسببة للأمراض *Beauveria sp.* و *Fusarium sp.*

تظهر نتائج الجزء الأول أن يرقات الدودة البيضاء حساسة للغاية لتأثير الزيت الاساسي ل *Thymus sp.* بالمقارنة مع *Origanum sp.* استخدام الزعر للسيطرة على هذه الآفة سمح لمراقبة معدلات الوفيات أكبر من 92 ٪ في اليوم الخامس بجرعة 0.031 ٪ ؛ بينما بالنسبة للأفراد الذين تعرضوا لتأثير *Origanum sp.*، تم التخلص من أقل من 61 ٪ من السكان اليرقات في نفس اليوم وبنفس الجرعة.

تحليل نتائج النشاط المضاد للفطريات من سلالات النباتات العطرية فيما يتعلق بمبيدات الحشرات *Beauveria sp.* و *Fusarium sp.* تبين أن الزيت الاساسي ل *Thymus sp.* لديه قدرة مثبطة أقل على النمو الفطر أقل من *Origanum sp.* لكلا سلالات التي تم اختبارها.

الكلمات المفتاحية: *Thymus sp.* ، *Origanum sp.* ، الزيوت العطرية (HE) ، تأثير مبيد اليرقات ، الدودة البيضاء ، نشاط مضاد للفطريات ، *Beauveria sp.* و *Fusarium sp.*

Résumé	
Remerciement	
Liste des figures et	
Liste des planches	
Liste des abréviations.	
Introduction général	01

Synthèse bibliographique

Chapitre I : Plantes aromatiques étudiées

I. Généralités.....	02
II. <i>Origanum vulgare</i> L.....	02
II.1 Description botanique.....	03
II.2 Position systématique.....	03
II.3 Distribution géographique dans le monde.....	03
II.4 Composition chimique.....	03
II.5 Propriétés de l'origan.....	03
III <i>Thymus vulgaris</i>	05
III.1 Description botanique.....	05
III.2 Position systématique.....	06
III.3 Distribution géographique dans le monde.....	06
III.4 Composition chimique.....	07
III.5 Propriétés du thym.....	07

Chapitre II : Les huiles essentielles

I. Généralités.....	08
II. Huiles essentielles	08
II.1 Définition.....	08
II.2 Répartition systématique.....	08
II.3 Rôle.....	09
II.4 Composition chimique.....	10
II.4.1 Les composés terpéniques	10
II.4.2 Les phénylpropanoïdes	10
II.5 Variabilité de la composition.....	11
II.5.1 Facteurs intrinsèques	11
II.5.2 Facteurs extrinsèques.....	11
III. Méthodes d'extraction des huiles essentielles	12
III.1 Distillation et entraînement à la vapeur	12
III.2 Hydrodistillation.....	12
III.3 Extraction par solvants volatils	12
III.4 Extraction par le CO ₂ supercritique.....	12
III.5 Extraction par enfleurage.....	12
IV Activité biologique des huiles essentielles.....	13
IV.1 Activité insecticide des huiles essentielles	13
IV.2 Activité antifongique des huiles essentielles	13
IV.2.1 Principes actifs et mécanisme d'action antifongique des HEs.....	14

Partie Expérimentale

Chapitre I : Evaluation de l'effet insecticide des HE de *Thymus* sp. et d'*Origanum* sp. sur les larves du ver blanc

I. Introduction.....	15
II. Matériel et méthodes	15
II.1 Matériel biologique	15
II.1.1 Matériel végétal.....	15
II.1.2 Matériel animal	16
II.2 Extraction des huiles essentielles	16
II.2.1 Matériel d'extraction (Extracteur d'huile essentielle)	16
II.2.2 Méthode d'extraction	17
II. 2.3 Détermination du rendement.....	18
II.3 Evaluation <i>in vitro</i> de l'effet insecticide des HES de <i>Thymus</i> sp. et d' <i>Origanum</i> sp. sur les larves du ver blanc	18
II.3.1 Conduite de l'essai.....	18
III. Résultats et discussion.....	21
III.1 Détermination du rendement	21
III.2 Evaluation de l'effet insecticide de l'HE d' <i>Origanum</i> sp. sur le ver blanc	22
III.2 Evaluation de l'efficacité de l'HE de <i>Thymus</i> sp. sur les larves du ver blanc.....	22

Chapitre II :Etude du pouvoir antifongique des HES de *Thymus* sp. et d'*Origanum* sp. vis-à-vis les entomopathogènes *Beauveria* sp. et *Fusarium* sp.

I. Introduction.....	26
II. Matériel et méthodes.....	26
II.1 Matériel fongique.....	26
II.2 Préparation des milieux de cultures contenant les différentes dosesde l'HE.....	27
II.3 Essais de l'activité antifongique.....	28
II.4 Evaluation de la croissance mycélienne.....	30
II.4.2 Détermination des concentrations minimale inhibitrices (CMI)	31
II.4.1 Taux d'inhibition de la croissance mycélienne (TI%).....	31
III Résultats et discussion	32
III.1 Evaluation de l'activité antifongique "in vitro" des HES de de <i>Thymus</i> sp. et d' <i>Origanum</i> sp. sur <i>Fusarium</i> sp.....	32
III.1.1 Evaluation de la croissance mycélienne de <i>Fusarium</i> sp.....	33
II.1.2 Evaluation du taux d'inhibition (TI%).....	34
III.1.3 Détermination de la vitesse de la croissance mycélienne (VCM)	35
III. 2 Evaluation de l'activité antifongique "in vitro" des HES de de <i>Thymus</i> sp. et d' <i>Origanum</i> sp. sur <i>Beauveria</i> sp.....	36
III.2.1 Evaluation de la croissance mycélienne de <i>Beauveria</i> sp.....	37
II.2.2 Evaluation du taux d'inhibition (TI%)	38
II.2.3 Détermination de la vitesse de la croissance mycélienne (VCM)	38
Conclusion.....	40
Références bibliographiques	41
Annexes	

Figure 01 : Partie florale d' <i>Origanum vulgare</i>	02
Figure 02 : Caractéristiques botaniques d' <i>Origanum vulgare</i>	03
Figure 03 : Distribution du genre <i>Origanum</i> dans le monde.....	04
Figure 04 : Partie florale de <i>Thymus vulgaris</i>	05
Figure 05 : Aspects morphologiques de <i>Thymus vulgaris</i>	05
Figure 06 : Distribution du genre <i>Thymus</i> dans le monde.....	06
Figure 07 : Exemples d'huiles essentielles issues de différentes parties de plantes.....	09
Figure 08 : Enfleurage manuel à froid utilisé au début du siècle	13
Figure 09 : Mode d'action antifongique des huiles essentielles.....	14
Figure 10 : Plantes aromatiques utilisées pour l'extraction des huiles essentielles ..	15
Figure 11 : Larves de ver blanc vivantes.....	16
Figure 12 : Montage d'entraînement à la vapeur d'eau.....	16
Figure 13 : Démarche de l'extraction des HEs par entraînement à la vapeur d'eau.....	17
Figure 14 : Dispositif expérimental du test de toxicité de l'HE sur les larves du ver blanc.....	18
Figure 15 : Huiles essentielles extraites, A : HE d' <i>Origanum</i> sp. et B : HE de <i>Thymus</i> sp.....	21
Figure 16 : Histogramme comparatif des rendements des HEs	21
Figure 17 :Effet de différentes doses de l'huile essentielle d' <i>Origanum</i> sp. sur la mortalité des larves du ver blanc.....	22
Figure 18 : Effet de différentes doses de l'HE de <i>Thymus</i> sp. sur le taux de mortalité des larves du ver blanc.....	23
Figure 19 : Mortalité corrigée des larves du ver blanc traitées par l'HE de <i>Thymus</i> sp.....	24
Figure 20 : Larves mortes après traitement par les HEs de <i>Thymus</i> sp. et d' <i>Origanum</i> sp.....	25
Figure 21 : Aspect macroscopique et microscopique de l'isolat <i>Beauveria</i> sp.	27
Figure 22 : Aspect macroscopique et microscopique de l'isolat <i>Fusarium</i> sp	27
Figure 23 : Effet « <i>in vitro</i> » des différentes concentrations de l'HE d' <i>Origanum</i> sp. sur l'isolat de <i>Fusarium</i> sp	32
Figure 24 : Effet « <i>in vitro</i> » des différentes concentrations de l'HE de <i>Thymus</i> sp. sur l'isolat de <i>Fusarium</i> sp.	32
Figure 25 : Effet de l'HE d' <i>Origanum</i> sp. sur la croissance mycélienne de <i>Fusarium</i> sp.....	33
Figure 26 : Effet de l'HE de <i>Thymus</i> sp. sur la croissance mycélienne de <i>Fusarium</i> sp.....	34

Figure 27: Taux d'inhibition de la croissance mycélienne de <i>Fusarium</i> sp. sous l'effet des HEs d' <i>Origanum</i> sp. et de <i>Thymus</i> sp.....	34
Figure 28: Vitesse de la croissance mycélienne de <i>Fusarium</i> sp. sous l'effet des HEs d' <i>Origanum</i> sp. et de <i>Thymus</i> sp.....	35
Figure 29 : Effet « <i>in vitro</i> » des différentes concentrations de l'HE d' <i>Origanum</i> sp. sur l'isolat de <i>Beauveria</i> sp.	36
Figure 30 : Effet « <i>in vitro</i> » des différentes concentrations de l'HE de <i>Thymus</i> sp. sur l'isolat de <i>Beauveria</i> sp.	36
Figure 31: Effet de l'HE d' <i>Origanum</i> sp. sur la croissance mycélienne de <i>Beauveria</i> sp.....	37
Figure 32: Effet de l'HE de <i>Thymus</i> sp. sur la croissance mycélienne de <i>Beauveria</i> sp.....	37
Figure 33 : Taux d'inhibition de la croissance mycélienne de <i>Beauveria</i> sp. sous l'effet des HEs d' <i>Origanum</i> sp. et de <i>Thymus</i> sp.....	38
Figure 34: Vitesse de la croissance mycélienne de <i>Beauveria</i> sp. sous l'effet des HEs. d' <i>Origanum</i> sp. et de <i>Thymus</i> sp.....	39

Planche 01 : Etapes du test biologique *in vitro* (Originale 2019).....19

Planche 02: Dispositif expérimental de la technique de repiquage utilisée pour l'évaluation de l'activité antifongique des HEs de *Thymus* sp. et d'*Origanum* sp.....28

Planche 03: Protocole expérimentale des bio-essais de l'activité antifongique des HEs de *Thymus* sp. et d'*Origanum* sp. vis-à-vis *Beauveria* sp. et *Fusarium* sp29

µm : micromètre

ml : millilitre Mm : millimètre

cm : centimètre

CMI : concentrations minimale inhibitrices

d: diamètre de l'explant

D : diamètre de la colonie

DL50 : Dose létale médiane

L : croissance mycélienne

MC : Mortalité corrigé

PDA : Potato Dextrose Agar

h : heure HE : huile essentielle

R : rendement en huile essentielle

Sotravit : Société de Transformation des Produits Viticoles

T1 : témoin négatif

T2 : témoin positif

Te: temps d'incubation

TI : Taux d'inhibition de la croissance mycélienne

M1 : est le pourcentage de la mortalité dans le lot traité

Mt : est le pourcentage de la mortalité dans le lot témoin

VCM : Détermination de la vitesse de croissance mycélienne

et al. : et collaborateurs

Introduction générale

Les plantes ont toujours fait partie de la vie quotidienne de l'homme puisqu'il s'en sert pour se nourrir, se soigner et par fois dans ses rites religieux (Chouitah, 2012). Dans le monde, un grand nombre de plantes aromatiques possèdent des propriétés biologiques très intéressantes, qui trouvent application dans divers domaines à savoir en médecine, pharmacie, cosmétologie et l'agriculture. Cependant, l'homme a longtemps employé des remèdes traditionnels à base de plantes sans savoir à quoi étaient dues leurs actions bénéfiques, il reste difficile de définir les molécules responsables bien que certains effets pharmacologiques prouvés sur l'animal ont été attribués à des composés tels que les alcaloïdes et leurs dérivés, des terpènes, stéroïdes et des composés polyphénoliques (Bahorun, 1997; Mohammedi, 2006).

Il existe un grand nombre d'huiles essentielles connues dans le monde et plusieurs milliers d'entre elles ont été caractérisées. Cependant, de ce nombre, une faible proportion seulement présente un intérêt commercial. Cela s'explique par la composition chimique des huiles et les différentes utilisations possibles (Tabti et Sali, 2016). Les HEs représentent un groupe très intéressant de ces métabolites qui sont dotés de propriétés antifongiques et insecticides les rendant intéressants comme nouveau produits qui peuvent remplacer les molécules synthétiques douées des mêmes propriétés.

Les produits biodégradables provenant de plantes constituent une bonne alternative qui permet aux producteurs de pouvoir assurer la protection de leurs cultures à un coût relativement faible. La réduction de l'emploi des pesticides chimiques due à l'utilisation des extraits de plantes contribue énormément à la réduction de la pollution de l'environnement et cela permet également d'améliorer la santé publique des populations (Weaver et *al.*, 2000 in Bonzi, 2007).

La lutte intégrée est une stratégie multidisciplinaire de contrôle des bio-agresseurs qui associe différentes formes de lutte. L'objectif principal de cette étude ; est de vérifier la possibilité d'utiliser les huiles essentielles de deux plantes aromatiques locales *Thymus sp.* et *Origanum sp.* réputées pour leur potentiel biopesticide en combinaison avec deux entomopathogènes autochtones *Beauveria sp.* et *Fusarium sp.* pour contrôler les populations larvaires du ver blanc. C'est dans cette perspective, que notre travail s'insère en se focalisant sur :

1. L'évaluation de l'activité insecticide des HEs de *Thymus sp.* et d'*Origanum sp.* sur les larves du ver blanc afin d'envisager leur utilisation comme moyen de lutte alternatif préservant l'environnement.
2. L'étude du pouvoir antifongique des HEs de ces plantes aromatiques sur les champignons entomopathogènes *Beauveria sp.* et *Fusarium sp.*

Synthèse bibliographique

Chapitre I:

Plantes aromatiques étudiées

I. Généralités

Les plantes médicinales Algériennes méritent une attention particulière. Il existerait en effet 3139 espèces décrites par Quézel et Santa (1962), dans la nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales (Zeraia, 1983).

La famille des Lamiacées connue également sous le nom des Labiées, comprend environ 258 genres pour 6900 espèces plus ou moins cosmopolites, mais dont la plupart se concentre dans le bassin méditerranéen tel que le thym, l'origan, la lavande et le romarin (Botineau, 2010). La plupart des genres ont une importance économique due à leur richesse en huiles essentielles et leur utilisation en tant que condiments ainsi que infusions très prisées. Ainsi, ils ont fait l'objet de plusieurs études scientifiques dans le but d'évaluer la présence de certains métabolites secondaires typiques (Wink, 2003).

II. *Origanum vulgare L.*

Le terme origan provient du latin *Origanum*, lui-même issu de grec origanon. En le décomposant étymologiquement, on trouve oros, la montagne et ganos, éclat, aspect riant, d'où la signification « qui se plaît sur la montagne ». En effet, l'origan ornait les montagnes méditerranéennes en abondance et assurait leur beauté (Dubois et *al.*, 2005 in Bouhaddouda, 2016). Le genre *Origanum* comprend environ 70 espèces, sous-espèces, variétés et hybrides, caractérisés par une extrême variabilité dans leurs caractères morphologiques (longueur de la tige, arrangement, nombre et longueur des branches, formes des feuilles,...) (Kintzios, 2002).

L'espèce *Origanum vulgare L.* (figure 01) la plus répandue et la plus connue de la famille des Lamiacées (Spada et Perrino, 1996),



Figure 01 : Partie florale d'*Origanum vulgare* (Bigou, 2013)

II.1 Description botanique

L'origan est une herbacée vivace de 30 à 60 cm de hauteur, au feuillage et aux fleurs très odorants quand on les froisse. Elle est ainsi reconnaissable à son odeur et à sa saveur phénolée, épicée et chaude (Arvy et Gallouin, 2003; Teuscher et *al.*, 2004).

Les tiges dressées, souvent rougeâtres et velues, portent les feuilles ovales opposées et espacées. Celles-ci possèdent des glandes sécrétrices non apparentes. Les fleurs blanches ou rose sont groupées en inflorescences (figure 02). Chaque fleur est située à l'aisselle d'une bractée ovale, et dépassant le calice. Ce calice est lui-même en tube gamosépale et persistant. Le fruit est constitué d'akènes. La floraison se prolonge de mai à octobre (Baba, 1990; Teuscher et *al.*, 2004; Figueredo, 2007).



Figure 02 : Caractéristiques botaniques d'*Origanum vulgare* (Bouhaddouda ,2016)

II.2 Position systématique

D'après Guignard (1996), la systématique d'*Origanum vulgare* est la suivante :

EmbranchementPhanérogames ou Spermaphytes
Sous-embranchement..... Angiospermes
Classe Dicotylédones
Sous-classeGamopétales
OrdreTubiflorales
Famille.....Lamiaceae
Genre*Origanum*
Espèce.....*Origanum vulgare*

II.3 Distribution géographique dans le monde

Le genre *Origanum* est principalement réparti autour du bassin Méditerranéen (figure 03) dont 81% des espèces se distribuent exclusivement dans l'Est Méditerranéen, essentiellement en Turquie, en Grèce et au Moyen Orient (Taylor et Francis, 2002). L'espèce d'*Origanum vulgare* est largement distribuée en Euro-asie et en Afrique du Nord. L'aire géographique s'étend jusqu'aux Açores, îles Canaries, Bretagne, Scandinavie et Chine et Taiwan (Taylor et Francis, 2002).

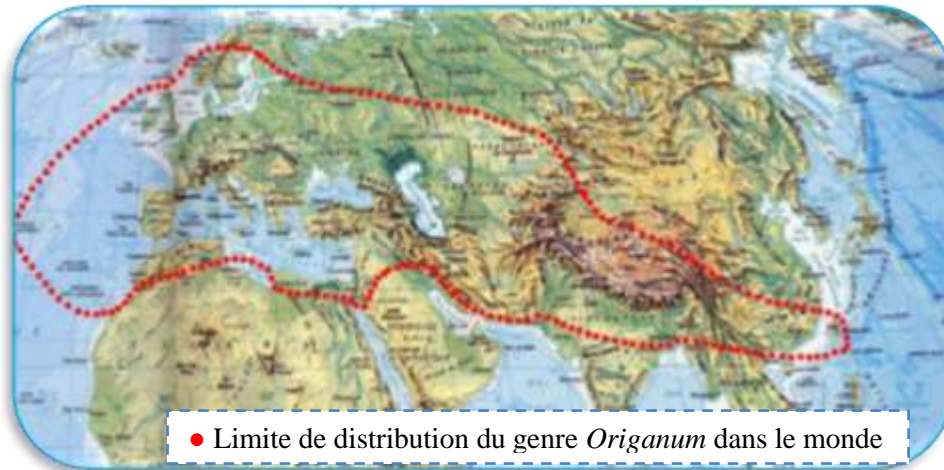


Figure 03: Distribution du genre *Origanum* dans le monde (Ietswaar, 1980)

II.4 Composition chimique

L'origan renferme une essence de couleur jaune à brun foncé, d'odeur phénolique agreste, très aromatique et de saveur amère, chaude et épicée. L'HE de l'origan est particulièrement pourvue en phénols : le carvacrol et son isomère, le thymol (Bardeau, 2009)

II.5 Propriétés de l'origan

En Algérie, communément appelé « zaâter », l'origan est une plante essentiellement médicinale qui jouit d'une grande ferveur populaire (Baba 1990). Elle est utilisée comme tisane par la population locale pour guérir plusieurs maladies telles que : rhumatismes, toux, rhume et troubles digestifs (Erdogan et Belhattab, 2010). Cette plante possède plusieurs activités tel que :

- Activité antibactérienne et antifongique (Kintzios ,2002)
- Activité antioxydante (Kintzios ,2002)
- Activité antispasmodique et urolithique (Kintzios, 2002)
- Activité anti-glycémique
- Activité anti-inflammatoire (Ocana-Fuentes et *al.* ,2010)
- Activité antiparasitaire (Kintzios, 2002)
- Activité nematicide (Oka et *al.*, 2000)

III *Thymus vulgaris*

Le genre *Thymus* comme beaucoup de labiées il est connu par sa richesse en huiles essentielles aromatiques. L'espèce la plus connue est sans conteste *Thymus vulgaris* L. (Amiot, 2005). Le nom "*Thymus*" dérive du mot grec «thymos» qui signifie parfumer à cause de l'odeur agréable que la plante dégage (Pariante, 2001). L'espèce *T. vulgaris* (figure 04) est un élément caractéristique de la flore méditerranéenne, connue surtout pour ses qualités aromatiques, elle a aussi de très nombreuses propriétés médicinales.



Figure 04 : Partie florale de *Thymus vulgaris* (Roubaudi 2006)

III.1 Description botanique

T. vulgaris est un arbuste aromatique à tiges ramifiées (figure 05), pouvant atteindre 40 cm de hauteur. Il possède de petites feuilles recourbées sur les bords de couleur vert foncé, et qui sont recouvertes de poils et de glandes (appelés trichomes).



Figure 05: Aspects morphologiques de *Thymus vulgaris* (Iserin, 2001)

Les trichomes contiennent l'huile essentielle majoritairement composée de monoterpènes. Ses petites fleurs zygomorphes sont regroupées en glomérules et leur couleur varie du blanc au violet en passant par le rose. *T. vulgaris* est d'ailleurs caractérisé par un polymorphisme floral qui a été au moins aussi étudié que son polymorphisme chimique (Morales, 2002)

III.2 Position systématique

Selon Quézel (1963), la classification botanique de *Thymus vulgaris* est la suivante :

EmbranchementMagnoliophyta
Sous-embranchementMagnoliophytina
Classe Magnoliopsida
Sous-classe Asteridae
Ordre Lamiales
Famille Lamiaceae
Genre.....*Thymus*
Espèce *Thymus vulgaris*

III.3 Distribution géographique dans le monde

Le genre *Thymus* est largement retrouvé dans le monde tels que l'Europe, l'Afrique, l'Asie, le Groenland, le Canada, le Chili et la nouvelle Zélande, mais ce genre est principalement répandu dans la méditerranée (Morales, 2002). *T. vulgaris* est indigène de l'Europe du sud, on le rencontre depuis la moitié orientale de la péninsule ibérique jusqu'au Sud-Est de l'Italie, en passant par la façade méditerranéenne française (figure 06) (Amiot, 2005).

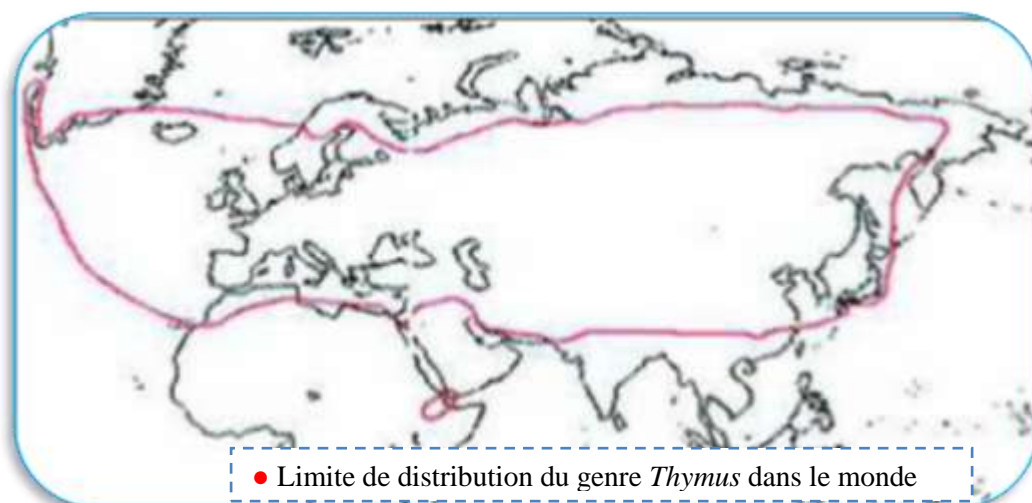


Figure 06: Distribution du genre *Thymus* dans le monde (Morales, 2002).

III.4 Composition chimique

De nombreuses études ont révélé que les parties aériennes de *T. vulgaris* sont très riches en plusieurs constituants dont la teneur varie selon la variabilité des conditions géographiques, climatiques, de séchage, de stockage et des méthodes d'extraction. L'hybridation facile de l'espèce mène à une grande variabilité intra-spécifique, qui affecte l'homogénéité du rendement d'extrait et sa composition en produits chimiques et (Balladin Headley, 1999 ; Amiot, 2005). La teneur en huile essentielle de la plante varie de 5 à 25 ml/Kg et sa composition fluctue selon le chémotype considéré (Bruneton, 1999) ; l'huile essentielle de *T. vulgaris* a été analysée en utilisant la chromatographie en phase gazeuse (CPG) couplée à une spectrométrie de masse (SM), 30 composés ont été identifiés et caractérisés, les plus abondants sont respectivement : thymol (44,4 - 58,1%), p-cymène (9,1 - 18,5%), terpinène (6,9 - 18%), carvacrol (2,4 - 4,2%), linalol (4,0 - 6,2%). La caractéristique d'huile essentielle de *Thymus vulgaris* était sa teneur élevée du thymol. Une étude menée par Dob et ses collaborateurs en 2006, sur les *Thymus* d'Afrique du nord a démontré que le composé majoritaire était le thymol chez les espèces d'Algérie et du Maroc et le carvacrol chez les espèces de Tunisie. (Bessedik et Khenfer, 2015).

III.5 Propriétés du thym

Le thym communément appelé « zâitra » est une des plus populaires plantes aromatiques utilisées dans le monde entier, ces applications sont très vastes et touchent le domaine alimentaire et celui de la médecine traditionnelle (Adwan et al., 2009). De plus son huile essentielle est utilisée dans les industries alimentaire, pharmaceutique et cosmétique (Jordán et al., 2006). L'épice *Thymus vulgaris* est cultivé en Europe et aux Etats-Unis pour l'usage culinaire dans l'assaisonnement des poissons, volailles, des potages et des légumes (Özcan et Chalchat, 2004). L'huile essentielle de *T. vulgaris* entre dans les formulations de diverses spécialités : pommades antiseptiques et cicatrisantes, sirops pour traitement des affections des voies respiratoires, préparation pour inhalation (Bruneton, 1999). Cette plante possède plusieurs propriétés tel que :

- Propriété antiseptique, désinfectant dermique et un spasmolytique bronchique
- Propriétés antivirales, antifongiques, anti inflammatoires, et antibactériennes (Jiminez-Arellanes et al., 2006)
- Propriétés antioxydants en raison de ces propriétés, le thym est utilisé comme un conservateur afin de prolonger la durée de conservation des poissons durant leur stockage (Zeghad, 2012).
- Propriétés vermifuges et vermicides.

Chapitre II

Les huiles essentielles

I. Généralités

Les métabolites secondaires sont des molécules organiques complexes synthétisés et accumulés en petites quantités par les plantes autotrophes. Ils sont divisés principalement en trois grandes familles: les polyphénols, les terpènes et les alcaloïdes (Lutge et *al.*, 2002 ; Abderrazak et Joël, 2007) :

- Les substances phénoliques comme les flavonoïdes, les tanins, la lignine, les coumarines.
- Les terpènes, c'est la plus grande catégorie de métabolites secondaires. Cette catégorie contient les hormones végétales, les pigments, les stérols, les hétérosides et une grande partie d'huiles essentielles
- Les alcaloïdes, par exemple la morphine, la caféine, la nicotine, la cocaïne et l'atropine.

II. Huiles essentielles

II.1 Définition

Les huiles essentielles (HE) sont définies comme étant des liquides concentrés, très complexes et hydrophobes. Leur densité est <1 sauf pour les H.Es de clou de girofle (*Syzygium aromaticum*), Cannelle (*Cinnamomum zeylanicum*) et Sassafras (*Sassafras albidum*) (Charpentier et *al.*, 2008). Le terme huile s'explique par la propriété de solubilité dans les graisses et par leur caractère hydrophobe. Le terme « essentielle » fait référence au parfum, à l'odeur plus au moins forte dégagée par la plante (Teusher et *al.*, 2005).

Les huiles essentielles sont des extraits volatils et odorants qu'on obtient par extraction mécanique, distillation à la vapeur d'eau ou distillation à sec des plantes aromatiques. Elles se forment dans un grand nombre de plantes comme sous-produits du métabolisme secondaire. Elles ont des propriétés et des modes d'utilisation particuliers et donnent naissance à une branche nouvelle de la phytothérapie : l'aromathérapie (Möller, 2008). A ce jour, 3000 huiles essentielles sont connues, seulement 300 d'entre elles sont commercialisées (Burt, 2004).

II.2 Répartition systématique

Selon Bruneton (1999), les huiles essentielles n'existent quasiment que chez les végétaux supérieurs, et les plantes capables d'élaborer les constituants qui composent ces huiles essentielles sont connues sous le nom de plantes aromatiques. Il y aurait environ 17 500 espèces aromatiques réparties dans une cinquantaine de familles, comme les Lamiacées (thym, menthe, lavande, origan), les Apiacées (anis, fenouil, angélique, cumin, coriandre), les Myrtacées (myrthe, eucalyptus) et les Lauracées (camphrier, laurier-sauce, cannelle). Ces espèces sont

caractérisées par la présence d'organes spécifiques responsables de la synthèse et du stockage des huiles essentielles (Werker et *al.*, 1993) .

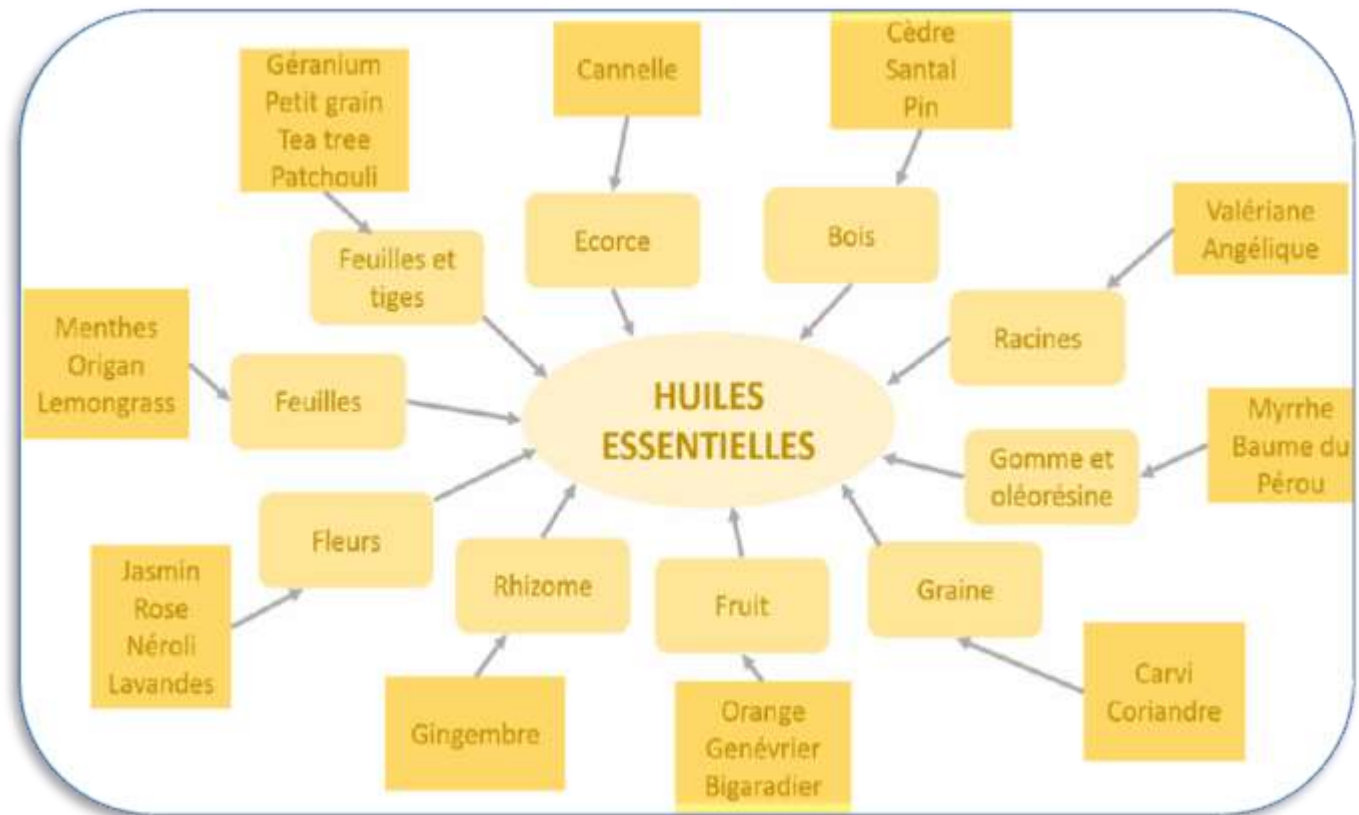


Figure 07 : Exemples d'huiles essentielles issues de différentes parties de plantes
(Deschepper, 1990)

II.3 Rôle

Les végétaux, ont besoin pour vivre de l'énergie qu'ils tirent de substances organiques issues de leur métabolisme. On distingue deux types de métabolismes (Faucon, 2012) :

- Le métabolisme primaire, qui conduit à la formation de molécules largement répandues (et indispensables à la vie de la plante lipides, protides et glucides).
- Le métabolisme secondaire, qui mène à des molécules plus spécifiques et qui correspond à l'adaptation de la plante à son environnement (et qui mène donc à la formation des essences). Ce sont souvent ces familles de molécules qui possèdent des activités biologiques particulières et qui, par conséquent, nous intéressent ici.

La fonction exacte de l'essence pour la plante est encore mal connue mais elle semble jouer un rôle important dans son adaptation à l'environnement (Desousa, 2012). Certains composés volatiles produits par la plantes et que l'on retrouve dans les essences vont moduler le comportement des microorganismes, champignons, insectes et herbivores. Ainsi, les essences

pourraient être des outils de défense contre les prédateurs, de répulsion des insectes et herbivores ou encore de protection contre les pathogènes. Elles permettraient également d'attirer des insectes pollinisateurs ou des disséminateurs de graines. Les essences pourraient être des sources d'énergie lorsque l'activité de photosynthèse n'est plus suffisante (Flavour et Fagnace, journal, 2009).

II.4 Composition chimique

Du point de vue chimique, les constituants des huiles essentielles peuvent être répartis en deux classes en fonction de leur voie de biosynthèse : les terpénoïdes (composés terpéniques) et les phénylpropanoïdes (Buchanan et al., 2000). Elles peuvent également renfermer divers produits issus du processus de dégradation mettant en jeu des constituants non volatils (Bruneton, 1999).

II.4.1 Les composés terpéniques

Les terpènes constituent une famille de composés largement répandue dans le règne végétal. Leur particularité structurale la plus importante est la présence dans leur squelette d'une unité isoprénique à 5 atomes de carbone à la formule générale $(C_5H_8)_n$ reconnue par Wallach dès 1887 (Lamarti et al., 1994).

Le terme « terpénoïde » définit l'ensemble des terpènes oxygénés et non oxygénés, alors que le terme « terpène » ne tient pas compte de la présence d'oxygène (Baser et Buchbauer, 2010).

Ainsi, on distingue selon le nombre de carbone: les monoterpènes (C 10), les sesquiterpène (C 15), et moins fréquemment les diterpènes (C 20), les triterpènes (C 30) et les tétraterpènes (C 40). Seuls les terpènes dont la masse moléculaire est relativement faible (mono et sesquiterpènes) sont rencontrés dans les huiles essentielles (Bruneton, 1999) et leurs confèrent un caractère volatil et des propriétés olfactives (Pibiri, 2006).

II.4.2 Les phénylpropanoïdes

Les huiles essentielles renferment aussi des composés aromatiques dérivés du phénylpropane (C6-C3), mais qui sont beaucoup moins fréquents que les terpènes et dont la biogenèse est totalement différente (Paris et Hurabielle, 1981).

Les phénylpropanoïdes ou composés phénoliques, sont biosynthétisés à partir des acides aminés aromatiques que sont la phénylalanine et la tyrosine. Ils sont généralement caractérisés par la présence d'un groupement hydroxyle fixé à un cycle phényle (Buchanan et al., 2000). Bruneton (1999) considère que ces composés sont très souvent des allyl- et propenyl phénols, parfois des aldéhydes, caractéristiques de certaines huiles essentielles d'Apiacées (anis, fenouil: anéthole,

anisaldehyde, estragole. persil : apiol) mais aussi de celles du girofle (eugénol), de la muscade (safrol, eugénol), de l'estragon (eugénol), du basilic (eugénol), de l'acore (asarone) ou de la cannelle (cinnamaldéhyde, eugénol, safrol).

L'étude de la composition chimique est généralement effectuée par chromatographie en phase gazeuse (CPG). C'est la technique la plus utilisée, car elle permet de réaliser une analyse complète de plus d'une centaine de molécules chimiques que contient l'huile. Le spectromètre de masse (SM), que l'on associe souvent à la chromatographie (CPG-SM), permet lui d'obtenir la composition précise de l'huile essentielle (Salzer, 1977). La résonance magnétique nucléaire (RMN) peut également être utilisée pour identifier les constituants des huiles essentielles (Tomi et *al.*, 1995; Platzer, 2002).

II.5 Variabilité de la composition

La composition chimique et le rendement en huiles essentielles varient suivant diverses conditions telles que l'environnement, le génotype et l'origine géographique. D'autres facteurs interviennent également tels que la période de récolte, le séchage, lieu de séchage, la contamination par des parasites, des virus et des mauvaises herbes et le choix de la méthode d'extraction. C'est ainsi que l'action des huiles essentielles est le résultat de l'effet combiné de leurs composés actifs et inactifs, ces composés inactifs pourraient influencer la disponibilité biologique des composés actifs et plusieurs composants actifs pourraient avoir un effet synergique (Burt, 2004; Bozin et *al.*, 2006; Möller, 2008)

II.5.1 Facteurs intrinsèques

Une huile essentielle doit avant tout autre chose être rapportée au matériel botanique d'où elle est issue pour éviter toutes dénominations trompeuses du matériel végétal (Bruneton, 1999). L'influence du stade végétatif, l'organe de la plante, les hybridations, les facteurs de mutation (Garnero., 1991) et le polymorphisme chimique «formes physiologiques» (Anton et Lobstein, 2005) sont les principaux facteurs intrinsèques qui influencent la composition et le rendement des HE.

II.5.2 Facteurs extrinsèques

Les conditions environnementales influencent aussi la composition des huiles essentielles. La température, la quantité de lumière, la pluviométrie et les conditions édaphiques représentent autant de causes potentielles de variations de la composition chimique d'une plante aromatique donnée (Olle et Bender., 2010). Il n'y a pas eu mal des travaux ayant mis en évidence l'influence de l'origine géographique de la matière première (Barry, 2001), les

conditions culturelles telles que la date de semis, la date de récolte, les traitements phytosanitaires, l'emploi d'engrais, ainsi que les techniques de récolte influencent aussi la composition et le rendement des huiles essentielles.

III. Méthodes d'extraction des huiles essentielles

III.1 Distillation et entraînement à la vapeur

C'est le procédé le mieux adapté à l'extraction des EH. Le matériel végétal n'est pas en contact avec l'eau, son principe réside dans l'utilisation de la pesanteur pour dégager et condenser le mélange «Vapeur d'eau- HE » dispersé dans la matière végétale (Lucchesi, 2005).

III.2 Hydrodistillation

L'hydrodistillation est la méthode nommée pour l'extraction des HEs (Lucchesi, 2005). Selon Bruneton (1999), l'hydrodistillation consiste à immerger directement le matériel végétale à traiter dans un alambic rempli d'eau qui est ensuite porté à l'ébullition, les vapeurs hétérogènes condensées sur une surface froide se transforme à l'état liquide, le mélange l'huile- eau se sépare par différence de densité.

III.3 Extraction par solvants volatils

C'est une méthode qui est utilisée pour les organes végétaux présentant une concentration en essence relativement faible ou pour les essences que l'on ne peut extraire par distillation. Elle est basée sur le pouvoir qu'ont certains solvants organiques à dissoudre les composants des huiles essentielles. (Belaiche, 1979 ; Duraffourd et *al.* , 1990).

III.4 Extraction par le CO2 supercritique

Le principe général de la méthode : Le CO₂, porté aux conditions de température et de pression souhaitées, chemine au travers de la matière première végétale dont elle tire et volatilise les molécules aromatiques. Le mélange passe ensuite dans un séparateur, où le CO₂ est détendu et se vaporise. Il est soit éliminé, soit recyclé. L'extrait se condense et est récupéré (Feranchomme et Roger,2001).

III. 5 Extraction par enfleurage

Ce procédé met à profit la liposolubilité des composants odorants des végétaux dans les corps gras, elle consiste à déposer des plantes en particulier les organes fragiles (pétale des roses) sur une couche mince de graisse (figure 08). Selon les espèces, l'absorption des huiles essentielles des pétales par le gras peut prendre de 24 heures à 72 heures. Les pétales sont éliminés et remplacés par des pétales frais jusqu'à saturation du corps gras. Ce dernier est épuisé par un solvant qui sera évaporé ensuite sous vide (Belaiche, 1979 ; France-Ida, 1996).



Figure 08 : Enfleurage manuel à froid utilisé au début du siècle (Anonyme, 1998)

IV Activité biologique des huiles essentielles

IV.1 Activité insecticide des huiles essentielles

Les plantes aromatiques produisent les HEs en tant que métabolites secondaires, mais leur rôle exact dans les processus de la vie de la plante reste inconnu (Rai et *al.*, 2003). Certains auteurs pensent que la plante utilise l'huile pour repousser ou attirer les insectes, dans ce dernier cas, pour favoriser la pollinisation. D'autres considèrent l'huile comme source énergétique, facilitant certaines réactions chimiques et conservant l'humidité des plantes dans les climats désertiques (Belaiche, 1979). Certaines huiles essentielles servent à la défense des plantes contre les herbivores, insectes et micro-organismes (Capon et *al.*, 1990).

L'effet insecticide des huiles essentielles par contact, ingestion et par fumigation a été bien démontré contre les déprédateurs des denrées entreposées, de nombreux travaux ont porté sur l'amélioration des formes d'utilisation des plantes qui permettent de renforcer et de rentabiliser leur activité insecticide (Isman, 2005). Certaines observations ont montré que les HEs extraites de plantes odorantes ont une activité insecticide indéniable vis-à-vis des ravageurs de stocks (Gakuru et Foua-bi, 1996). Ces huiles essentielles agissent par diffusion ; c'est ce qui leur permet d'atteindre toutes les interstices dans la masse de graines stockées. Elles peuvent donc être utilisées en fumigation et leur emploi est facile.

IV.2 Activité antifongique des huiles essentielles

Les HE ont un grand pouvoir antifongique aérien et cutané. 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: *Aspergillus* (*A. niger*, *A. flavus*, *A. fumigatus*),

Penicillium chrysogenum et bien d'autres La mise en évidence de leurs activités biologiques a fait l'objet de nombreuses études.

IV.2.1 Principes actifs et mécanisme d'action antifongique des HEs

L'étude de l'effet fongicide et fongistatique des huiles essentielles vis-à-vis de champignons pathogènes a fait l'objet de plusieurs travaux (Rasooli et Abyaneh, 2004). L'action antifongique des huiles essentielles (figure 09) est due à une augmentation de la perméabilité de la membrane plasmique suivie d'une rupture de celle-ci entraînant une fuite du contenu cytoplasmique et donc la mort de la cellule. En effet, les composés terpéniques des huiles essentielles et plus précisément leurs groupements fonctionnels tels que Les phénols et les aldéhydes réagissent avec les enzymes membranaires et dégradent la membrane plasmique des cellules. D'autre part, Viollon et Chaumont (1994) ont décrit l'effet fongitoxique du thymol et du carvacrol sur *Cryptococcus neoformans*, champignon opportuniste rencontré au cours du SIDA.

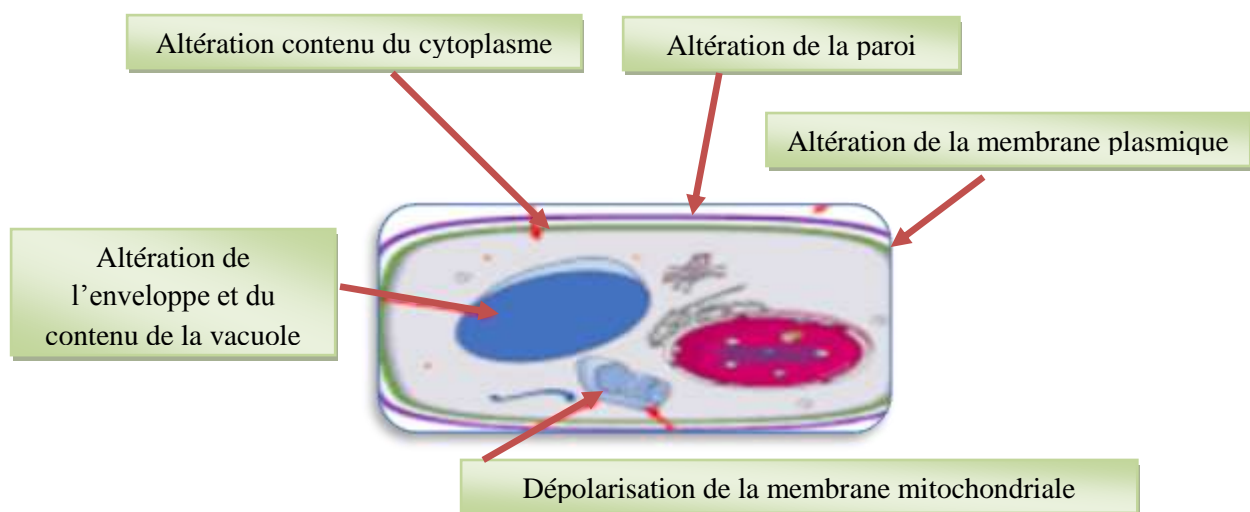


Figure 09: Mode d'action antifongique des huiles essentielles (Anonyme, 2018)

Partie Expérimentale

Chapitre I

Evaluation de l'effet insecticide des
HE de *Thymus* sp. et d'*Origanum* sp.
sur les larves du ver blanc

I. Introduction

Les pullulations incontrôlables des vers blancs font d'eux des ravageurs fortement nuisibles aux cultures (Yahiaoui et Bekri, 2014). La lutte chimique reste le moyen le plus fréquent pour contrôler les populations de ce déprédateur. Cependant, il a été démontré que les pesticides avaient des effets néfastes sur la santé humaine et sur l'environnement (Lee et al., 2004).

Les substances d'origines naturelles et plus particulièrement les huiles essentielles représentent actuellement une solution alternative de lutte pour la protection des cultures contre les bio-agresseurs, leur utilisation a fait l'objet de plusieurs travaux de recherche qui démontrent l'efficacité de ces huiles dans la protection des cultures en réduisant les pertes occasionnées par les insectes ravageurs par leur effet insecticides (Aiboud, 2012).

C'est pour cette raison que des tests biologiques ont été réalisés dans ce chapitre à fin d'évaluer « *in vitro* » l'activité insecticide des huiles essentielles de deux plantes aromatiques *Thymus* sp. et d'*Origanum* sp. sur les larves du ver blanc.

II. Matériel et méthodes

II.1 Matériel biologique

II.1.1 Matériel végétal

Ce travail a porté sur l'étude de deux plantes aromatiques (Figure 10), le thym (*Thymus* sp.) et l'origan (*Origanum* sp.), achetées du marché local de la ville de Mostaganem. La biomasse utilisée pour l'extraction de l'huile essentielle était à l'état sec, constituée des feuilles, fleurs et tiges.

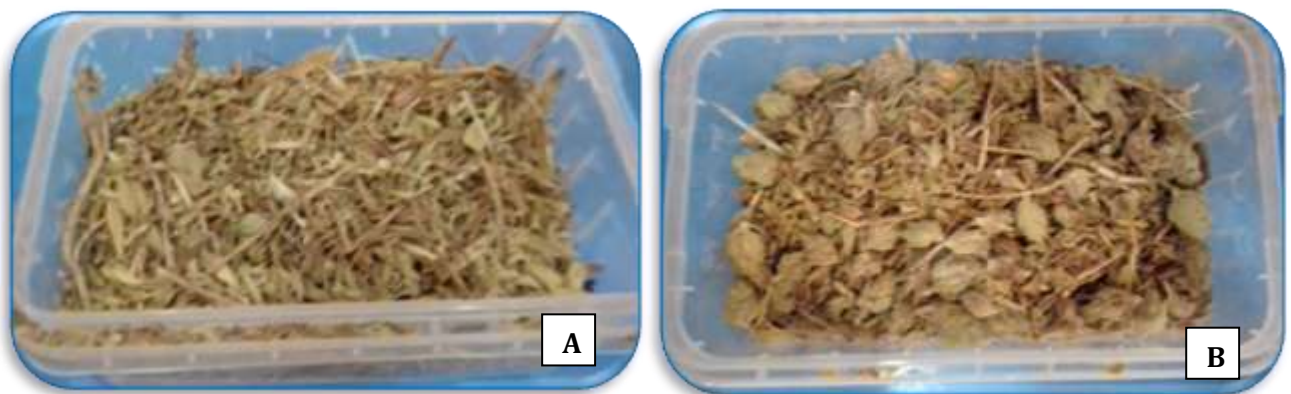


Figure 10 : Plantes aromatiques utilisées pour l'extraction des huiles essentielles, **A**: *Thymus* sp. et **B**: *Origanum* sp. (Originale, 2019)

II.1.2 Matériel animal

L'insecte étudié dans cette expérimentation est le ver blanc (Figure 11), qui est considérée comme l'un des ravageurs nuisibles des cultures. La récolte des vers blancs a été réalisé par nos collègues du département d'agronomie (Bakelli M. et Habibi A. Master 02 en Protection des Cultures); au niveau d'une parcelle située à côté de la ferme expérimentale de Sotravitis, localisé à la commune de Stidia à 15 km de la wilaya Mostaganem. Les sorties sur terrain ont été déroulées pendant la période comprise entre les mois de Mars et Avril 2019.



Figure 11: Larves de ver blanc vivantes (Originale 2019)

II.2 Extraction des huiles essentielles

II.2.1 Matériel d'extraction (Extracteur d'huile essentielle)

La matière végétale sèche a été déposée dans une cocotte-minute (Figure 12) communiquant avec un réfrigérant par un tuyau ça veut dire une extraction par l'entraînement à la vapeur d'eau réalisée dans un système d'alambic (Kéita et *al.*, 2001).



Figure 12: Montage d'entraînement à la vapeur d'eau, 1: plaque chauffante, 2: cocotte minute 3: condensateur, 4: sortie de l'eau, 5: réfrigérant, 6: entrée de l'eau et 7: tube gradué (Originale, 2019).

II.2.2 Méthode d'extraction

L'extraction des huiles essentielles a été réalisée dans le laboratoire de biochimie de l'université de Mostaganem à l'aide d'un dispositif d'entraînement à la vapeur d'eau en adoptant la démarche illustrée dans la figure 13.

Les huiles ont été obtenues par l'entraînement à la vapeur en mettant une quantité de 500 g de la plante sèche dans la cuve sur une grille qui sépare entre la matière végétal et l'eau distillée. L'appareil est porté à ébullition sur une plaque chauffante électrique (02 heures). La vapeur d'eau et les molécules aromatiques condensées ont été récupérées dans un tube gradué dans lequel la décantation a été effectuée. La séparation entre eau et huile essentielle se fait par différence de densité, ce qui permet de le récupérer facilement.

Les huiles essentielles de *Thymus sp.* et *Origanum sp.* ont été préservées aseptiquement dans des tubes protégés avec papier aluminium afin éviter toute dégradation des molécules par la lumière, puis conservés au réfrigérateur pour une utilisation ultérieure.

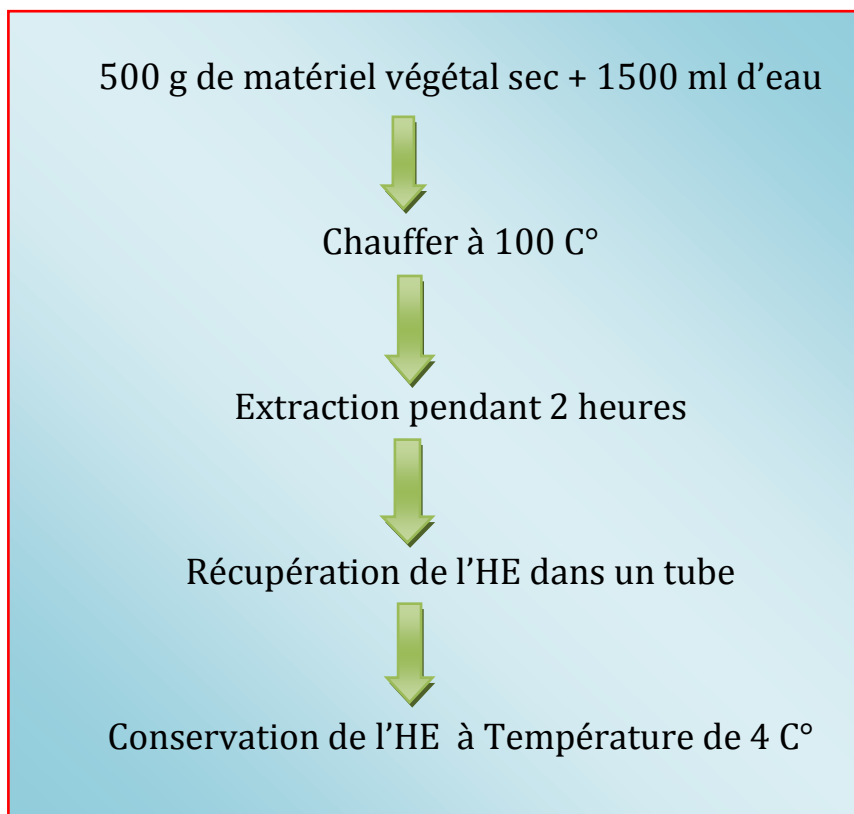


Figure 13 : Démarche de l'extraction des HEs par entraînement à la vapeur d'eau

II. 2.3 Détermination du rendement

Selon la norme Afnor (1986), le rendement en huile essentielle, est défini comme étant le rapport entre la masse de l'huile essentielle obtenue après extraction et la masse de la matière végétale utilisée. Il est donné par la formule suivante :

$$R = (P_h / P_p) \times 100$$

R : Rendement en HE exprimé en pourcentage (%)

P_h : Poids de l'HE en gramme

P_p : Poids de la masse végétative en gramme

II.3 Evaluation « *in vitro* » de l'effet insecticide des HEs de *Thymus sp.* et d'*Origanum sp.* sur les larves du ver blanc

Deux tests biologiques ont été réalisés pour évaluer l'activité insecticide des huiles essentielles de *Thymus sp.* et d'*Origanum sp.* vis-à-vis les larves du ver blanc.

II.3.1 Conduite de l'essai

Les bio-essais ont été effectués au laboratoire pédagogique de la Protection des Végétaux, en déposant délicatement cinq larves de ver blanc dans une boîte en plastique stérilisée. Le traitement des larves a été effectué par pulvérisation de la solution additionnée d'une goutte de tween 20 sur des lots de 15 individus. De même, trois boîtes pour le témoin contenant 05 larves sont maintenues. Pour chacune des concentrations de l'HE ainsi que pour le témoin, trois répétitions ont été réalisées (figure 14).

Les doses utilisées ont été obtenus à partir de l'huile essentielle diluée avec l'acétone à 60%. Cinq concentrations ont été préparées soit : 0.5%, 0.25%, 0.125% et 0,062 % 0.031%. Le témoin est constitué des larves traitées par l'acétone 6 %.



Figure 14: Dispositif expérimental du test de toxicité de l'HE sur les larves du ver blanc (Originale 2019)

Chaque lot reçoit une pulvérisation de chaque concentration de telle sorte que les larves soient bien imbibes. Après traitement, les larves ont été recouvertes par du sol provenant de la parcelle d'où les larves ont été ramassées.

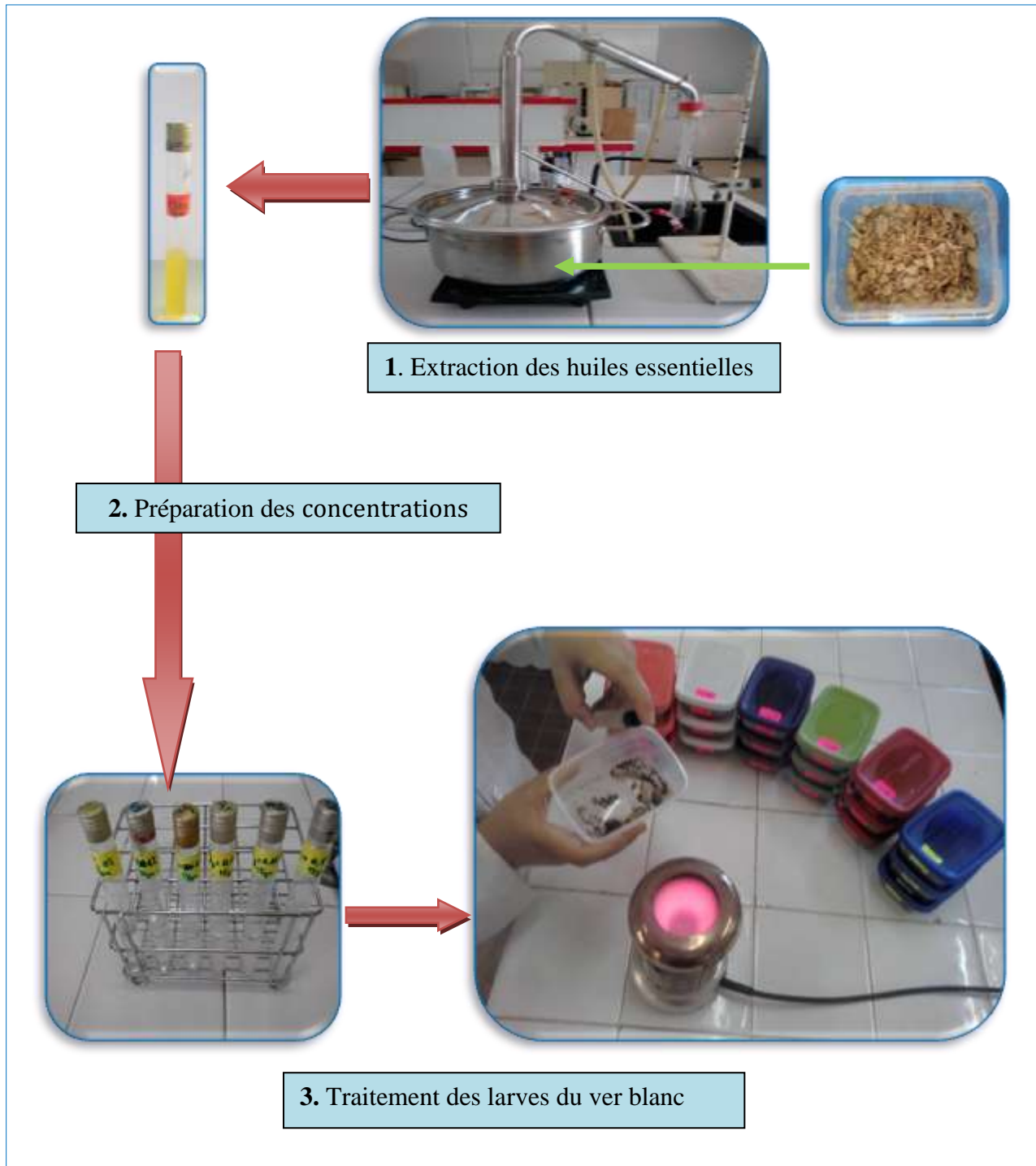


Planche 01 : Etapes du test biologique *in vitro* (Originale 2019)

Les observations ont été effectuées quotidiennement afin de déterminer l'effet larvicide des HEs de *Thymus sp.* et d'*Origanum sp.* sur les larves du ver blanc. Les comptages des insectes morts sont effectués après 24 heures des traitements pour les deux testes jusqu'à la mort des larves ou leur transformation en nymphes. Les bio-essais réalisés dans ce chapitre ont été conduits pendant 15 jours.

Le test est considéré valide si le pourcentage de mortalité chez les témoins est inférieur à 20%. Si le pourcentage de mortalité chez les témoins est compris entre 5% et 20%, la mortalité après exposition doit être corrigée (OMS, 2004 in Alaoui-Boukhris, 2009).

Pour éliminer tous les risques de mortalité naturelle, Les mortalités dans les boîtes traitées (M1) ont été exprimées selon la formule d'Abbott (1925) en mortalités corrigées (MC), tenant compte des mortalités observées dans les boîtes témoins (Mt) selon la formule suivante :

$$\text{Mortalité corrigée (MC \%)} = [(M1 - Mt) / (100 - Mt)] * 100$$

M1 : est le pourcentage de la mortalité dans le lot traité

Mt : est le pourcentage de la mortalité dans le lot témoin

Si la mortalité chez les témoins excède 20 %, le test est invalide et doit être recommencé.

Pour estimer l'efficacité des HEs testées sur les larves du ver blanc, des droites de régression doivent être réalisées en dressant le pourcentage de mortalité corrigé en fonction des doses de traitement. Cela permet la détermination de la dose létale pour 50% de la population d'insecte (DL50).

III. Résultats et discussion

III.1 Détermination du rendement

Les rendements moyens en HE ont été calculés en fonction de la matière végétale sèche de la partie aérienne des deux plantes aromatiques *Thymus sp.* et *Origanum sp.*.

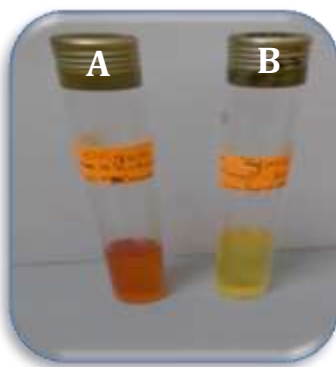


Figure 15 : Huiles essentielles extraites, **A**: HE d'*Origanum sp.* et **B**: HE de *Thymus sp.*
(Originale, 2019)

Le rendement de l'huile essentielle obtenu par l'entraînement à la vapeur de la plante aromatique *Origanum sp.* est de l'ordre de 2.34% (Figure 16). Cette huile a une couleur jaune foncé à brun clair (Figure 15 (A)), d'odeur phénolique agreste, très aromatique et de saveur amère, chaude et épicée (Bardeau, 2009). Il est à noter que, la plus grande quantité d'HE extraite est obtenue à la première heure d'extraction.

Thymus sp. a fournis un rendement d'environ 1.26% (Figure 16). L'huile de cette plante a une couleur jaune claire (Figure 15 (B)), très odorante, chaude et âcre.

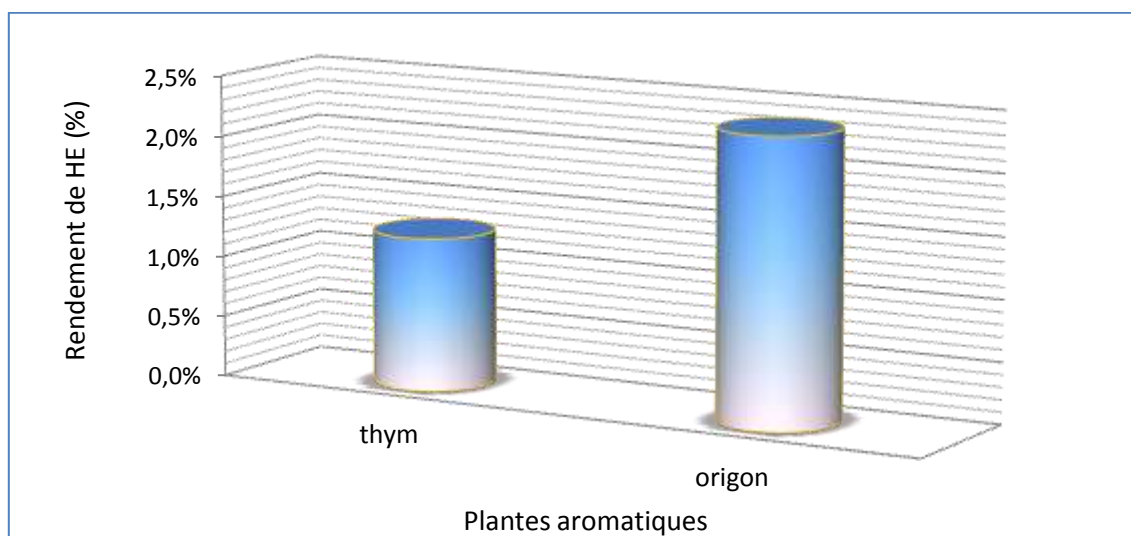


Figure 16 : Histogramme comparatif des rendements des HEs de *Thymus sp.* et d'*Origanum sp.*

On observe un écart entre le rendement en huile essentielle extraite de *Thymus* sp. et celle extraite d'*Origanum* sp. Donc la teneur en HE est convergente pour ces deux plantes aromatiques qui font partie de la même famille botanique (Lamiacées). La différence est due à plusieurs facteurs : l'origine géographique, les facteurs écologiques notamment climatiques, l'espèce végétale elle-même, l'organe végétal, le stade de la croissance, la période de cueillette et la conservation du matériel végétal.

Chapitre II

Etude du pouvoir antifongique des
HEs de *Thymus* sp. et d'*Origanum* sp.
vis-à-vis deux entomopathogènes
(*Beauveria* sp. et *Fusarium* sp.)

I. Introduction

Les huiles essentielles les plus étudiées dans la littérature pour leurs propriétés antifongiques et insecticide appartiennent à la famille des lamiacées dont *Thymus* sp. et *Origanum* sp. font parti. Pendant longtemps, la lutte contre les ravageurs des cultures a reposé sur l'utilisation abusive de pesticides présentant des conséquences néfastes sur la santé humaine et animale, ainsi que sur l'environnement. Il est donc indispensable de s'orienter vers des solutions alternatives basées sur l'exploitation des ressources naturelles, particulièrement les plantes locales à propriétés insecticides et les entomopathogènes autochtones.

Le présent chapitre a comme objectif d'étudier le pouvoir antifongique des HEs de *Thymus* sp. et d'*Origanum* sp. sur deux entomopathogènes autochtones *Beauveria* sp. et *Fusarium* sp. pour vérifier la possibilité de mener une lutte intégrée sur les larves du ver blanc.

II. Matériel et méthodes

Les méthodes du laboratoire qui permettent d'estimer les propriétés d'un produit *in vitro* sont nombreuses, mais reposent toutes sur le même principe, celui de confronter la substance antimicrobienne (fongicide, bactéricide, insecticide,...) et l'agent pathogène (champignons, bactéries, insectes,...) sur un support artificiel (Bessedik et khenfer, 2015). La méthodologie adoptée dans chapitre a permis d'évaluer l'effet antifongique des huiles essentielles de deux plantes aromatiques *Thymus* sp. et *Origanum* sp. vis-à-vis deux entomopathogènes *Beauveria* sp. et *Fusarium* sp..

II.1 Matériel fongique

Au cours de ces bio-essais deux isolats nous ont été fournis par notre encadreur. Il s'agit de deux entomopathogènes autochtones *Beauveria* sp. et *Fusarium* sp. qui ont prouvé leur efficacité sur les larves de deux bio-agresseur; le ver blanc et la mineuse de tomate *Tuta absoluta*.

L'isolat *Beauveria* sp. produit des colonies cotonneuses de couleur blanchâtre (Figure 21(A)) à jaunâtre et forme des hyphes transparents et septaux. Le genre est caractérisé par un conidiophore à base renflée et à extrémité terminale en zigzag formant de façon sympodiale de petites spores unicellulaires (Ziani ,2008).

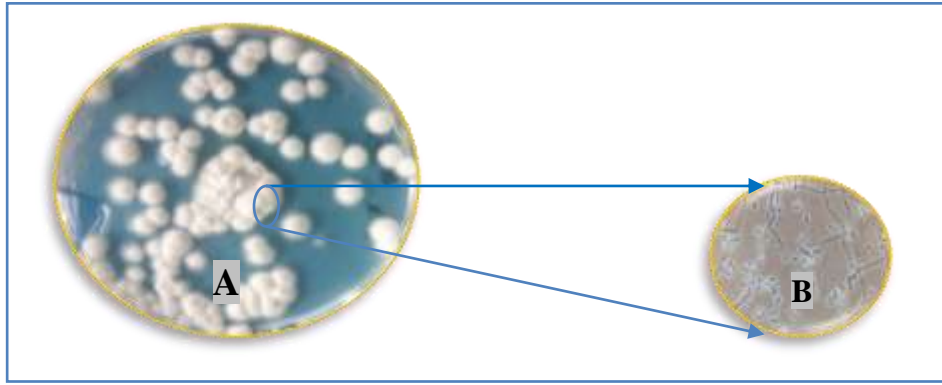


Figure 21 : Aspect macroscopique (A)(Originale) et microscopique (B) de l'isolat *Beauveria* sp.

L'isolat *Fusarium* sp. a des colonies cotonneuses de couleur blanche au départ, puis devenant rosées à pourpres (Figure 22(A)); le verso est foncé. Ce champignon diffuse un pigment rose lorsqu'il pousse sur milieu PDA. La première description du genre *Fusarium* sp. a été réalisée par Link en 1809, ce dernier a créé le genre pour des espèces présentant des macroconidies fusiformes et cloisonnées.

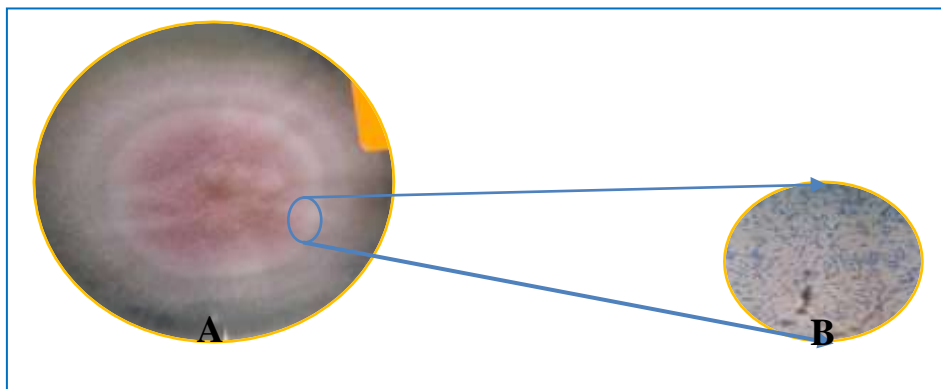


Figure 22: Aspect macroscopique (A) (Originale) et microscopique (B) de l'isolat *Fusarium* sp.

II.2 Préparation des milieux de cultures contenant les différentes concentrations de l'HE

Compte tenu de la non miscibilité des huiles à l'eau et par conséquent au milieu de culture, une mise en émulsion de ce huile a été réalisée par le tween 20 afin d'obtenir dans le milieu une répartition homogène des composés à l'état dispersé (Satrani et *al.*, 2001).

Les solutions de différentes concentrations en HE avec le tween 20 sont incorporées dans 100 ml du milieu de culture PDA pour obtenir cinq doses différentes (0,05%, 0,025%, 0,0125%, 0,0062% et 0,0031%). Le mélange de chacun des milieux, est coulé dans des boites de Pétri étiqueté. Après solidification, le milieu est ensemencé et incubé.

II.3 Essais de l'activité antifongique

Les huiles essentielles à tester sont incorporées à des concentrations variables dans le milieu de culture gélosé. Il s'agit de la méthode de contact direct qui permet la mise en évidence de l'activité antifongique (Fandohan, 2004).

A l'aide d'une pipette pasteur stérile, un fragment de culture fongique de 6mm de diamètre a été découpé à partir d'un tapis mycélien âgé de 8 et 21 jours respectivement pour *Fusarium sp.* et *Beauveria sp.*, puis a été déposé au centre de la boîte de Pétri. Pour chaque concentration, trois répétitions sont préparées de la même façon (Planche 02). Deux témoins (sans HE) avec trois répétitions ont été retenus, le PDA avec tween a servi comme témoin positif (T1) et un témoin sans tween a servi de témoin négatif (T2).

Les boîtes de Pétri sont ensuite fermées hermétiquement et incubées à 25°C, Des mesures quotidiennes de diamètre des colonies ont été effectuées pour chaque concentration afin d'évaluation de la croissance mycélienne, le taux d'inhibition et la vitesse de croissance des souches étudiées. Les mesures ont été prélevées jusqu'au remplissage des boîtes des témoins pour le champignon *Fusarium sp.* tandis que pour *Beauveria sp.* les observations ont été conduites pendant 24 jours.

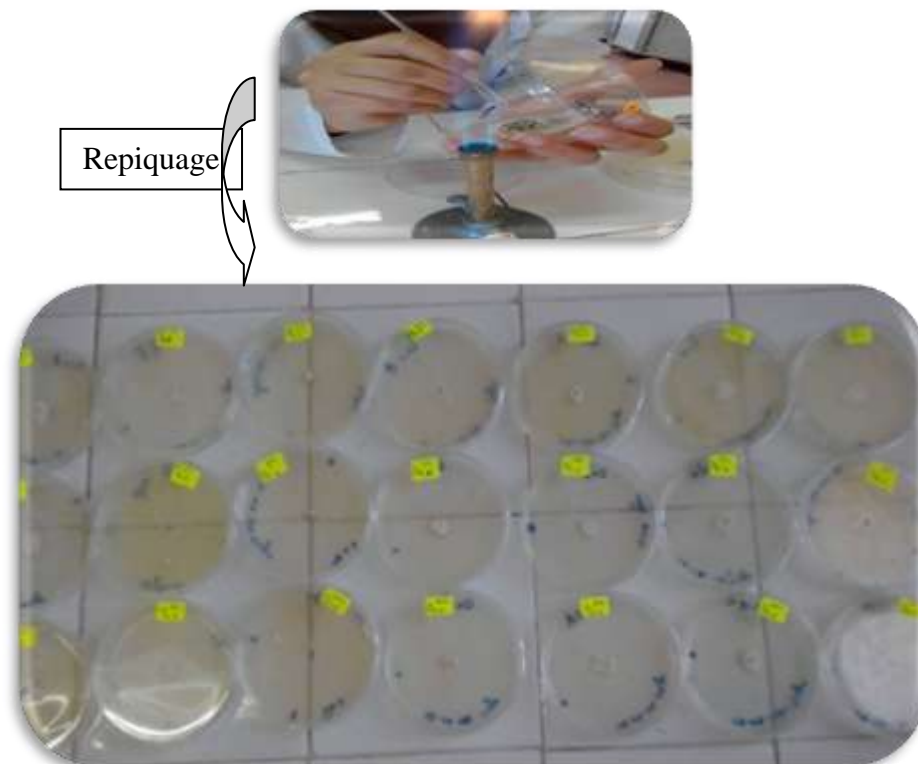


Planche 02: Dispositif expérimental de la technique de repiquage utilisée pour l'évaluation de l'activité antifongique des HES de *Thymus sp.* et d'*Origanum sp.*

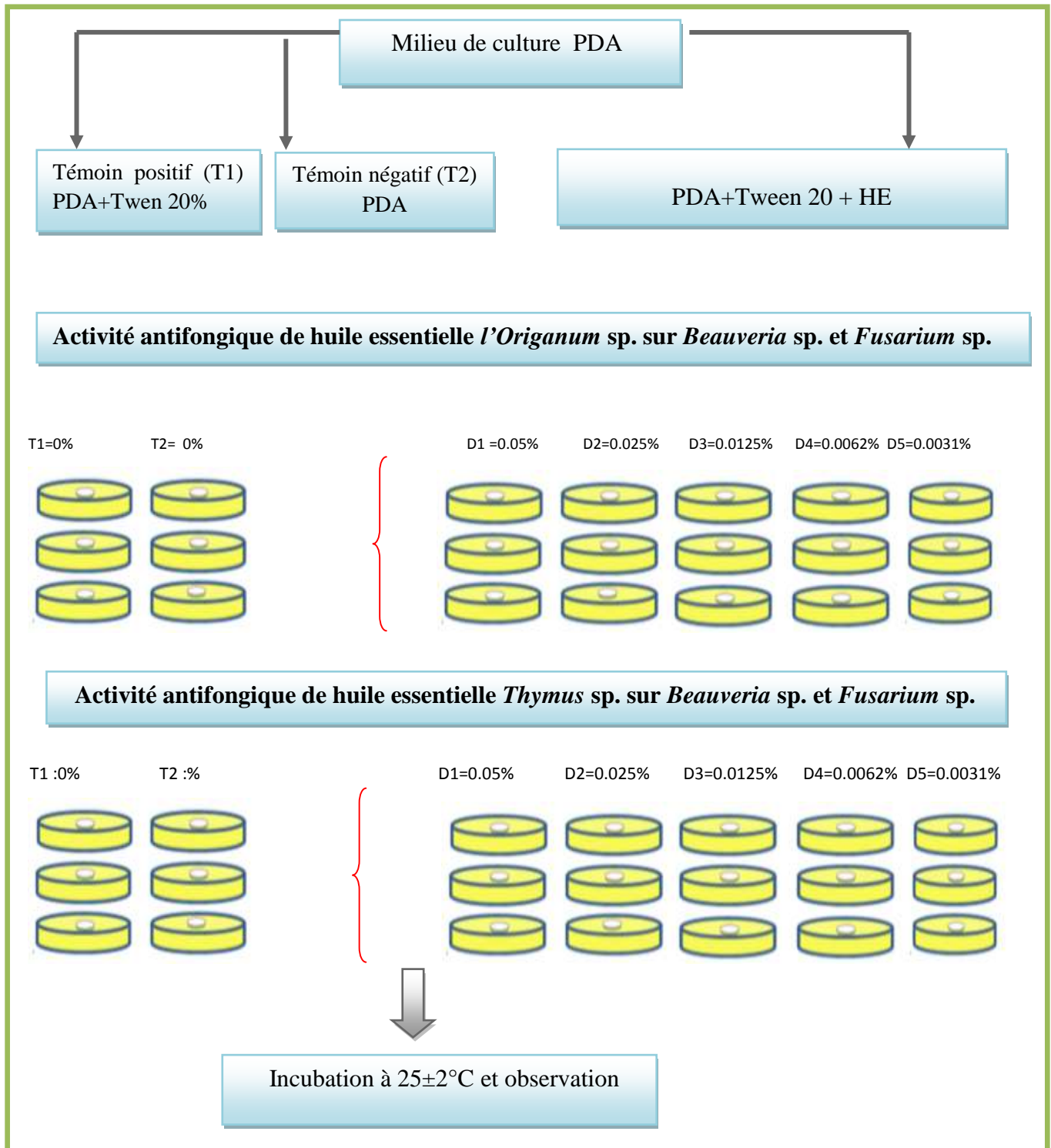


Planche 03: Protocole expérimentale des bio-essais de l'activité antifongique des HEs de *Thymus sp.* et d'*Origanum sp.* vis-à-vis les entomopathogènes *Beauveria sp.* et *Fusarium sp.*

II.4 Evaluation de la croissance mycélienne

La croissance mycélienne a été évaluée toutes les 24 heures en mesurant la moyenne de deux diamètres perpendiculaires passant par le milieu de l'explant mycéliens. Trois répétitions ont été effectuées pour chaque concentration. La lecture est réalisée en comparaison avec les cultures témoins qu'ils ont démarrés le même jour et dans les mêmes conditions. La technique employée pour le calcul de la croissance mycélienne est celle décrit par Brewer (1960), qui consiste à mesurer la croissance linéaire et diamétrale des colonies en les appliquant à la formule suivante :

$$L = (D - d) / 2$$

L : croissance mycélienne

D : diamètre de la colonie

d : diamètre de l'explant (6mm)

II.4.1 Taux d'inhibition de la croissance mycélienne (TI%)

Les résultats obtenus à partir de l'estimation de la croissance mycélienne sont aussi exprimés en taux d'inhibition par rapport à la croissance mycélienne du témoin. La technique consiste à mesurer les diamètres des différentes colonies de champignons après le temps d'incubation requis puis résoudre l'équation.

$$TI (\%) = 100 \times (dC - dE) / dC$$

TI (%) : Taux d'inhibition exprimé en pourcentage

dC : Diamètre de colonies dans les boîtes

dE : Diamètre de colonies dans les boîtes contenant l'extrait de plante

L'huile essentielle est dite :

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

II.4.2 Détermination des concentrations minimale inhibitrices (CMI)

La CMI représente la plus faible concentration d'huile essentielle inhibant toute croissance visible à l'œil nu après l'incubation (Bassole et *al.*, 2001). Les boîtes de Pétri dont les concentrations ayant montré une absence totale de la croissance mycélienne ont été sélectionnées pour déterminer les concentrations minimales inhibitrice. Il s'agit d'évaluer la plus petite concentration pour laquelle aucun développement n'est visible à l'œil nu.

II.4.3 Détermination de la vitesse de croissance mycélienne (VCM)

Selon (Cahagnier et Molard 1998), la vitesse de la croissance mycélienne de chaque concentration est déterminée par la formule

$$\text{VCM} = [D1/Te1] + [(D2-D1)/Te2] + [(D3-D2)/Te3] + \dots + [(Dn-Dn-1)/Ten]$$

Di: diamètre de la zone de croissance chaque jour (mm).

Te: temps d'incubation

Conclusion

Les dégâts provoqués en agriculture par le ver blanc sont importants dans le monde. Il est admis maintenant par tous que la lutte chimique a des conséquences néfastes sur l'environnement ainsi que sur la santé humaine. Il est donc indispensable de s'orienter vers des solutions alternatives basées sur l'exploitation des ressources naturelles, particulièrement les plantes locales à propriétés insecticides et les entomopathogènes autochtones.

Notre travail consistait à évaluer *in vitro* les potentialités des huiles essentielles de *Thymus* sp. et *Origanum* sp., comme larvicide botanique pour le contrôle de ce ravageur et de tester en même temps leur effet sur les entomopathogène *Beauveria* sp. et *Fusarium* sp.

Les résultats des tests de l'activité insecticide, montrent que la plus petite dose (0.031%) de l'huile essentielle de *Thymus* sp. appliquées, a présenté une toxicité intéressante qui dépasse les 90% à partir du 5^{ème} jour. Tandis que l'huile essentielle d'*Origanum* sp. s'est montrée moins toxique vis-vis des larves du ravageur, son utilisation a permis d'observer des taux de mortalité qui ne dépassent pas 60% au même jour.

L'étude du pouvoir antifongique des HEs de ces deux plantes aromatiques sur *Beauveria* sp. et *Fusarium* sp. montre que le degré d'activité antifongique est proportionnel à la concentration de l'huile. Les résultats obtenus indiquent que l'HE de *Thymus* sp. a une capacité inhibitrice de la croissance mycélienne inférieure à celle d'*Origanum* sp. pour les deux champignons testés.

Ces résultats bien que préliminaires, témoignent que l'huile essentielle de *Thymus* sp. présente une efficacité importante vis-à-vis les larves du ver blanc et peut être considérés comme bio-pesticide intéressant susceptible d'être préconisés dans le cadre de la lutte biologique. En plus de son effet larvicide, cette huile a une faible activité inhibitrice sur la croissance mycélienne des entomopathogène *Beauveria* sp. et *Fusarium* sp.. Il est donc possible de mener une lutte intégrée en combinant l'action des deux agents de bio-contrôle pour réguler les populations larvaire du ver blanc.

Comme perspectives, il serait préconisable de relancer ces tests sur le ravageur et ses auxiliaires indigènes, afin de choisir la dose optimale qui contrôle le phytophage et en même temps protège ses ennemis naturels.

Références bibliographiques

- Abbott, W.S , 1925.** A method of computing the effectiveness of an insecticide. J. Econ. Entomol. 18: 265-267
- Abderrazak M. et Joël R. 2007.** La botanique de A à Z. Ed. Dunod. Paris. 177p.
- Adwan G., Abu-Shanab B., Adwan K., Abu-Shanab F., 2009.** Antibacterial effects of Nutraceutical Plants Growing in Palestine on *Pseudomonas aeruginosa* Turk. J. Biol. 30 : 239- 242.
- Afnor 1986.** Recueil des Normes Française « huiles essentielles », AFNOR. Paris. 57
- Aiboud. K , 2012.** Etude de l'efficacité de quelques huiles essentielles à l'égard de la bruche de niébé *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera : Bruchidae) et impacts des traitements sur la germination des graines de *Vigna unguiculata* (L.) Walps . Thèse de doctorat, UMMTO . Tizi Ouzou.
- Alaoui-Boukhris M., 2009-** Activités larvicides des extraits de plantes sur les larves de moustiques vecteurs de maladies parasitaires Faculté des sciences et techniques Fès - Master sciences et techniques, 59 p.
- Amiot J. 2005.** *Thymus vulgaris*, un cas de polymorphisme chimique pour comprendre l'écologie évolutive des composés secondaire. Thèse de doctorat-Ecole nationale supérieure d'Agronomie de Montpellier.
- Anonyme, 1998** <http://tpe-huile-essentielle.e-monsite.com/pages/i-les-differents-procedes-d-extraction-d-une-huile-essentielle/3-extraction-par-enfleurage.htm>
- Anonyme, 2018** <https://laboratoireumani.fr/comment-traiter-efficacement-vos-mycoses-avec-les-huiles-essentielles/>
- Arvy M.P. & Gallouin F., 2003.** Epices, aromates et condiments. Ed. Belin, Paris. 412 p.
- Association Française de Normalisation, 1986.** "Huiles essentielles", AFNOR, Paris. NF T 75-006.
- Baba Aissa F., 1991.** Les plantes médicinales d'Algérie: identification, description, principes actifs, propriétés et usage traditionnel des plantes communes en Algérie. Ed. Bouchène et Ad. Diwan, Alger. p: 121.
- Bahorun T. 1997.** Substances naturelles actives, la flore mauricienne, une source d'approvisionnement potentielle. Food and Agricultural Research. Conseil Mauritius, Amas.
- Balladin D.A; Headley, O. 1999.** Evaluation of solar dried thyme (*Thymus vulgaris* Linné) herlos. Renewable Energy. 17: 523-531.
- Bardeau F., 2009.** La médecine aromatique. Robert Laffont, Paris. 335p.
- Barry N., 2001.** Art d'extraire les huiles essentielles. De parfum à faire soi même, pp. 125-128.
- Baser K.H.C. & Buchbauer G., 2010.** Handbook of essential oil: Science, Technology, and Applications. Ed. Taylor and Francis Group, LLC, Boca Raton, Forid, USA.
- Bassole I. H. N., Ouattara A. S., Nebie R ., Ouattara, C. A. T. Kabore, Z. et Traore, S.A. 2001.** Composition chimique et actlvites antibacteriennes des huiles essentielles des feuilles et des fleurs de *cymbopogon proximus* (stapf.) et d'*ocimum canum* (sims). Pharm. Méd.Trad. AF , Vol.II, pp.37-51
- Belaiche .P 1979.** Traité de phytothérapie et d'aromathérapie. Ed. Maloine Tome 1 pp 123.

- Bessedik. M et Khenfer. B., 2015.** Etude de l'activité antifongique des huiles essentielles d'Eucalyptus globulus et Thymus algeriensis contre quelques champignons phytopathogènes des palmes du palmier dattier (Phoenix dactylifera L). Mémoire Master Université Kasdi Merbah OUARGLA .P 51
- Bonzi,S. , 2007.** Efficacité des extraits aqueux de quatre plantes dans la lutte contre les champignons transmis par les semences de sorgho (Sorghum bicolor (L.) Moench) : cas particulier de Colletotricum graminicola (Ces.) Wilson et Phoma sorghina (Sacc.) Boerema, Dorenbosch et Van Kesteren, Mémoire de diplôme d'études approfondies en gestion intégrée des ressources naturelles. Burkina faso.
- Botineau M., 2010.** Botanique systématique et appliquée des plantes à fleurs. Ed. Tec & Doc, Lavoisier, Paris. pp: 1021-1043.
- Bouhaddouda N., 2016.** Activités antioxydante et antimicrobienne de deux plantes du sol local : *Origanum vulgare* et *Mentha pulegium*. Thèse de doctorat. Université Badji Mokhtar –Annaba, 205p.
- Bousnane N. et Ghani A., 2017.** Évaluation préliminaire de l'activité larvicide des huiles essentielles de deux plantes aromatiques Thymus vulgaris et Origanum vulgare sur le ver blanc de la vigne. Mémoire présenté en vue de l'obtention du Diplôme de Master ; université de Mostaganem, 37 p.
- Brewer. D., 1960.** Studies in Asochyta pisi .canadian journal de la végétale philosophie mathématique .Classique Hachette
- Bruneton J. 1999.** Pharmacognosie et phytochimie des plantes médicinales. 3ème Ed Tec&Doc. Paris.
- Buchanan B., Gruissem W., Jones R., 2000.** Biochemistry & Molecular Biologiy of Plants, Eds. American Society of Plant Physiologists, p. 1253-1258, 1304-1308.
- Burt S., 2004.** Essential oils: Their antibacterial properties and potential application in Foods. A review intern : J. Food. Microbiol. 94: 223-253.
- Cahagnier B. & Richard-Molard D., 1998.** Moisissures des aliments peu-hydratés, les moisissures. Collection sciences et techniques agroalimentaires. Ed. : Lavoisier. p :39-41.
- Capon M., Courilleau-Haverlant V. & Valette C., 1990.** Chimie des couleurs et des odeurs. Culture et techniques, Nantes. 204 p.
- Charpentier B ., Hamon-Loreleac F., Halay A., Huard A & Ridoux L., 2008.** Guide du préparateur en pharmacie, 3 ème édition, Elsevier Masson, 1358.
- Chouitah O., (2012).** Composition chimique et activité antibactérienne des huiles essentielles des feuilles de *Glycyrrhiza glabra*. Thèse de doctorat. Université d'Oran 143p.
- Deschepper, (1990)** Variabilité de la composition des huiles essentielles et intérêt de la notion de chémotype en aromathérapie. En vue d'obtenir le diplôme d'état de doctur en pharmacie
- Duraffourd C., D'Hervicourt L. et Lapraz J. C. 1990.** Cahiers de phytothérapie clinique. 1. Examens de laboratoires galénique. Eléments thérapeutiques synergiques. 2ème éd. Masson, Paris.
- Erdogan O.I, Belhattab R., 2010.** Profiling of cholinesterase inhibitory and antioxidant activities of Artemisia absinthium, A. herba-alba, A. fragrans, Marrubium vulgare, M. astranicum, Origanum

- vulgare subsp. glandulosum and essential oil analysis of two Artemisia species. *Ind. Crop. Prod.* 32: 566–71.
- Fandohan, P. : Gbenou, J.D et Gnonlofin, B. 2004.** Effect of Essential Oils on the Growth of *Fusarium verticilloides* and Fumonisin Contamination in Corn *J Agric Food Chem* 52 pp .6824-6829.
- Figueredo G., 2007.** Etude chimique et statistique de la composition d'huiles essentielles d'origans (Lamiaceae) cultivés issus de graines d'origine méditerranéenne. Thèse de Doctorat, Université Clermont-Ferrand, France.
- France-Ida J. 1996.** Bref survol de diverses méthodes d'extraction d'huiles essentielles. *Info-essence.* 3 : 5-6.
- Gakuru S. el Foua-Bi K., 1996 -** *Effet d'extraits de plantes sur la bruche du niébé Coltosobructius maculatus Fab. et le charançon du riz Sitophilus orizae L. Cahiers Agriculture; vol. 5. T 1, pp.39-42.*
- Garnero., 1991** Les huiles essentielles, leur obtention, leur composition, leur analyse et leur normalisation. Ed. Encyclopédie des médecines naturelles, Paris, France: PP 2-20.
- Guignard J.L., 1996.** Abrégés en botanique. 10^{ème} éd. Ed. Masson, Paris. 278 p.
- Iserin. P., 2001.** Encyclopédie des plantes médicinales. 2^{ème} Ed. Larousse. Londres Pp : 143 et 225-226
- Isman, M.B., 2005 -** *Botanical insecticides, deterrents and repellents in modem agriculture and an increasingly regulated world. Annu. Rev. Entomol., N° 51, pp. 45-66.*
- Jiménez-Arellanes A., Martínez R., Garcia R., León-Díaz R., Aluna–Herrera J., Molina –Salinas G. et Said-Fernández S. 2006.** *Pharmacologyonline.*, 3 : 569-574.
- Jordán M.J. , Martínez R.M. , K.L. Goodner , Baldwin E.A. , Stomayor J.A. (2006).** Seasonl Variation of *Origanum vulgare* L. essential oils composition. *Industrial Crops and products* 24: 253-263.
- Kéita SM1, Vincent. C, Schmit. J, Arnason. JT, Bélanger. A., 2001.** Efficacy of essential oil of *Ocimum basilicum* L. and *O. gratissimum* L. applied as an insecticidal fumigant and powder to control *Callosobruchus maculatus* (Fab). and powder to control *Callosobruchus maculatus* (Fab.) [Coleoptera: Bruchidae] . rticle (PDF Available) in *Journal of Stored Products Research* 37(4):339-349 · November 2001 with 881 Reads.
- Kintzios S.E., 2002.** Profile of the multifaceted prince of the herbs. In: Kintzios S.E. *Oregano – The Genera Origanum and Lippia.* Ed. Taylor & Francis, London. pp: 3–8.
- Lamarti A., Badoc A., Deffieux G., et Carde J.P. 1994.** Biogénèse des monoterpènes I-localisation et sécrétion. *Bull. Soc. Pharm. Bordeaux*, 133: 69-78.
- Lee, J.C., Heimpel, G.E., Leibe, G.L. 2004.** Comparing floral nectar and aphid honeydew diets on the longevity and nutrient levels of a parasitoid wasp. *Entomologia Experimentalis and Applicata* pp 111 .
- Lucchesi M.E. 2005.** Extraction Sans Solvant Assistée par Micro-ondes : Conception et Application à l'extraction des huiles essentielles. Thèse de Doctorat en Sciences, discipline : Chimie, Université de la Réunion, Faculté des Sciences et Technologies.

- Lutge U., Kluge M. & Bauer G., 2002.** Botanique 3 ème Ed : Technique et documentation. Lavoisier, Paris. 211p.
- Lutge U., Kluge M. & Bauer G., 2002.** Botanique 3 ème Ed : Technique et documentation. Lavoisier, Paris. 211p.
- Mohammedi Z. (2006).** Etude du pouvoir antimicrobien et antioxydant des huiles essentielles et flavonoïdes de quelques plantes de la région de Tlemcen. Mémoire de magister. Université de Tlemcen.
- Möller K., 2008.** La distillation à l'alambic, un art à la portée de tous. Ed. UNICO, Paris.
- Morales, R. 2002.** The history, botany and taxonomy of the genus Thymus. In : Thyme : the genus Thymus. Ed. Taylor & Francis, London. pp. 1-43.
- Ocaña-Fuentes, A.; Arranz-Gutiérrez, E.; Señorans, F.J.; Reglero, G. . 2010.** Supercritical fluid extraction of oregano (*Origanum vulgare*) essentials oils: Anti-inflammatory properties based on cytokine response on THP-1 macrophages. *Food Chem. Toxicol*, 48, 1568–1575.
- Oka Y, Nacar S, Putievsky E, Ravid U, Yaniv Z, Spiegel Y. . 2000.** Nematicidal activity of essential oils and their components against the root-knot nematode. *Phytopathology*; 90:710–715.
- Olle M .et Bender I., 2010.** The content of oil in umbelliferous crops and its formation *Agronomy reserch* 8(3).PP687-696.
- Özcan M., J.-C. Chalchat 2004.** Aroma profile of *Thymus vulgaris* L. Growing Wild in Turkey. *Bulg. J. Plant Physiol.* 30 (4): 68-73.
- Pariente L. 2001.** Dictionnaire des sciences pharmaceutique et biologique. 2ème Ed. Académie nationale de pharmacie. Paris 1643 p.
- Paris M., Hurabielle M., 1981.** Abrégé de matière médicale (pharmacognosie) Tome 1: généralités, monographies. Ed. Masson, Paris.
- Pibiri M.C., 2006.** Assainissement microbiologique de l'air et des systèmes de ventilation au moyen d'huiles essentielles. Thèse de Doctorat ès science. EPFL, Lausanne, Suisse.
- Platzer N. 2002.** Application de la RMN à la détermination des structures. Base Documentaire, Techniques d'analyse, Dossier : P1092, vol. TA1.
- Quézel P. & Santa S., 1962.** Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales. Tome 1. CNRS. Ed. Paul Le chevalier, Paris.
- Quézel P., Santa S., 1962.** Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales. Tome 1. CNRS. Ed. Paul Le chevalier, Paris.
- Rai M. K., Acharya D. & Wadegaonkar P., 2003.** Plant derived-antimycotics: Potential of Asteraceous plants, in: Plant-derived antimycotics: Current Trends and Future prospects. Haworth press , New York. p: 51.
- Rasooli. I ; Abyaneh M.R., 2004.** Inhibitory effects of thyme oils on growth and aflatoxin production by *aspergillus parasiticus*. *food control* 15,

- Salzer U.J., 1977.** The analysis of essential oils and extracts (oleoresins) from seasonings- a critical review. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 9: 345-373
- Satrani B; Farah A; Fechtal M; Blaghen M et Chaouch A . 2001.** Composition chimique et activité antimicrobienne des huiles essentielles de *Satureja calamintha* et *Satureja alpina* du maroc. *ann. fais. exp. chim.* 94(956) :241-250.
- Spada P. & Perrino P., 1996.** Conservation of Oregano species in national and international collections: an assessment. In: *Oregano: proceedings of the IPGRI International workshop on Oregano, 8–12 May.* Valenzano, Italy. pp: 14–23.
- Tabti M., Sali F.Z, 2016.** Contribution à l'étude de l'activité antimicrobienne des huiles essentielles d'*Erica multiflora* d'Algérie. En vue de l'obtention d'un diplôme de Master en Biologie, Université de Mostaganem, 71p.
- Teusher E., Anton R. & Lobstein A. 2005.** Plantes aromatiques. Epices, aromates, condiments et huiles essentielles. Tec & Doc, Paris, 522.
- Teusher E., Anton R. & Lobstein A. 2005.** Plantes aromatiques. Epices, aromates, condiments et huiles essentielles. Tec & Doc, Paris, 522.
- Tomi F., Bradesi P., Bighelli A. & Casanova J., 1995.** Computer-aided identification of individual components of essential oils using Carbon-13 NMR spectroscopy. *J. Magn. Reson. Anal.* 1: 25-34
- Werker E., Putievsky E., Ravid U., Dudai N. & Katzir I., 1993.** Glandular hairs and essential oil in developing leaves of *Ocimum basilicum* L. (Lamiaceae). *Ann. bot.* 71 (1): 43- 50.
- Wink M., 2003.** Evolution of secondary metabolites from an ecological and molecular phylogenetic perspective. *Phytochemistry.* **64:** 3–19.
- Yahiaoui .D et Bekri ,N , 2014.** Etude des méthodes de lutte contre le ver blanc des céréales (*Geotrogus deserticola* blanc) dans la région d'Oran . A PP –Dixième référence internationale sur les ravageurs en agricultures. MONTPELLIER – 22 et 23 octobre .
- Zeghad N., 2012.** Etude du contenu polyphénolique de deux plantes médicinales d'intérêt économique (*Thymus vulgaris*, *Rosmarinus officinalis*) et évaluation de leur activité antibactérienne. En vue de l'obtention du diplôme de magister (Ecole doctorale). Université frères Mentouri Constantine, 130p.
- Zeraia L., 1983.** Liste et localisation des espèces assez rares, rares et rarissimes. I.N.F. Alger.
- ZIANI. J., 2008.** Application de *beauveria bassiana* contre la punaise terne *lygus lineolaris* (palisot de beauvois) (hémiptères: miridés) dans les vignobles. Mémoire présenté comme exigence partielle de la maîtrise en biologie. Université du Québec à Montréal.

