



République Algérienne Démocratique et Populaire

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

Université Djilali Bounaama- khemis Miliana

جامعة الجيلالي بونعاما - خميس مليانة

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

Département des Sciences Agronomiques

Filière: Sciences Agronomique

Option : Production végétale

Mémoire

En vue de l'obtention du diplôme de **Master**

Thème :

*Potentialités fongicides des huiles essentielles de
Géranium rosat (Famille des Géraniacée) contre
Aspergillus niger (Famille des Trichocomaceae)
agent de la moisissure noire*

Présenté par :

Melle Madian Nadjet

Melle MEHARZI Naima

Soutenu le : 15 /10/2020.

Devant le jury composé de :

Rapporteur : Mme MOHAMED BOUZIANE R.

Président : Mme KACI Z.

Examineur : Mr BOUZAR ESSAID K.

Année universitaire : 2019/2020

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

سبحانك لا علم
لنا
إلا ما علمتنا
إنك أنت العليم
الحكيم

صَلِّ عَلَى اللَّهِ الْعَظِيمِ

Remerciements

La fameuse page des remerciements, on y pense beaucoup pendant la rédaction, mais il y a beaucoup de travail avant d'y arriver. C'est enfin le moment d'exprimer notre gratitude envers toutes celles et tous ceux qui ont contribué à la réalisation de ce travail.

Nous exprimons notre profonde gratitude à « DIEU » tout puissant qui nous a donné le courage d'effectuer ce travail et nous a éclairé le chemin du savoir.

On tient à remercier sincèrement Madame **MOHAMED BOUZIANE R.** en tant qu'encadreur de mémoire. Elle s'est toujours montrée à l'écoute et très disponible tout au long de la réalisation de ce mémoire, ainsi pour l'inspiration, l'aide et le temps qu'elle a bien voulu nous consacrer et sans elle ce mémoire n'aurait jamais vu le jour.

Nos remerciements vont aux membres du jury qui ont bien voulu accepter de valoriser ce travail.

On remercie le chef de département de l'agronomie et tout le personnel de laboratoire pédagogique de la Faculté des Sciences de la nature et de la vie.

Nos remerciements s'adressent aussi à Madame **Djabroune**.

Nos profonds remerciements à Monsieur **BRADA Kamel**, responsable des laboratoires pédagogiques de la faculté des sciences de la nature et de la vie. Egalement, on remercie Messieurs **Karahacane, BOUZAR** et **MEROUCHE** pour leur aide, leur soutien moral et ses encouragements.

Enfin, On adresse nos plus sincères remerciements à tous nos proches et amis, qui nous ont toujours soutenu et encouragé au cours de la réalisation de ce mémoire.

Naima et Nadjet

Dédicace

Je dédie ce mémoire :

A mes très chers parents, les prunelles de mes yeux.

A ma mère **Zina** qui n'a jamais cessé de ménager ses efforts pour que j'atteigne ce niveau. Ni sacrifices, ni privatisations ne l'ont empêché d'accomplir son devoir de mère soucieuse de l'avenir de ces enfants.

A mon cher papa **Abdallah** qui a su se montrer patient, compréhensif, sa chaleur paternelle a été et sera toujours pour moi d'un grand réconfort.

Que « Dieu » vous procure santé, prospérité et bonheur...

A mes sœurs **Shaima, Khawla, Samira** et leurs époux, à **Mohamed** et **Sirine**, la petite **Meriem** et à mes frères **Mohamed, Ahmed** et **Abed** que « Dieu » vous garde et vous protège et que votre chemin soit plein de succès.

A toute ma famille

A mon binôme **Naima**

A mes chers : **Amina, Samia, Ghania**, que « Dieu » vous protège et vous préserve

A toutes les personnes qui m'ont aidé à réaliser ce travail.

Nadjet

Dédicace

Ce mémoire est dédié :

A ma chère mère :

Aucun mot, aussi expressif qu'il soit, ne saurait remercier à sa juste valeur l'être qui a consacré sa vie à parfaire notre éducation avec un dévouement inégal associé à beaucoup de sacrifices.

Votre calme, votre patience dont j'ai hérité une modeste partie ont été pour moi le phare pour l'aboutissement à ce travail.

Puisse « Dieu » m'aider pour rendre un peu soit-il de ce que vous m'avez donné !

Puisse « Dieu » vous garde longtemps auprès de nous et vous bénit infiniment !

A mon cher père :

Aucune dédicace ne saurait exprimer l'estime, le respect et l'amour que je vous porte. Vous vous êtes investi à me transmettre le sens de la responsabilité, de la persévérance et de la droiture. Vous nous avez inculqué le sens du sacrifice afin de construire notre réussite. Que ce travail soit le gage de ma reconnaissance et de ma gratitude.

Que « Dieu », le tout puissant, vous couvre de Sa Sainte miséricorde et vous accueille dans son éternel paradis « Amine ».

A mes sœurs: Halima, Razika, Laila et Yosra.

En témoignage de mon affection fraternelle, de ma profonde tendresse et reconnaissance, je vous souhaite une vie pleine de bonheur et de succès et que « Dieu », le tout puissant, vous protège et vous garde.

A mon binôme **Nadjet**, je suis très chanceuse de la connaître et de travailler avec une personne comme elle, je lui souhaite une vie pleine de bonheur.

A tous mes amis: **Nadjet, Amina, Djahida, Nesrine, Ilham, kanza et Faten.**

A toute ma grande famille.

Naima

Summaries

Introduction.....	1
Chapitre I : Aperçu sur les huiles essentielles	4
I.1. Historique.....	4
I.2. Définition.....	4
I.3. Localisation et lieu de synthèse	5
I.4. Biosynthèse.....	6
I.4.1. Voie des phénylpropanoïdes	6
I.4.2. Voie des terpénoïdes	7
I.5. Propriétés physiques	8
I.6. Composition chimique	8
I.6.1. Terpènes	8
I.6.2. Composés aromatiques	9
I.6.3. Composés d'origines diverses	9
I.7. Procédés d'extraction.....	9
I.8. Rôles des huiles essentielles au niveau de la plante	12
I.9. Domaines d'application	12
Chapitre II : Présentation de <i>Géranium rosat</i>	15
II.1. Généralités.....	15
II.2. Systématique.....	15
II.3. Description botanique	16
II.4. Répartition géographique	17
II.4.1. Dans le monde	17
II.4.2. En Algérie	17
II.5. Exigences pédoclimatiques.....	17
II.6. Huile essentielle : propriétés physiques et composition chimique.....	18
II.7. Utilisation et domaines d'application.....	18
Chapitre III : Généralités sur <i>Aspergillus niger</i>	21
III.1. Définition.....	21
III.2. Taxinomie.....	21
III.3. Description morphologique	22
III.3.1. Description macroscopique	22
III.3.2. Description microscopique	22
III.4. Croissance et cycle biologique.....	24
III.5. Ecologie et conditions de développement	25
III.6. Symptomatologie	25
Chapitre I : Matériel et méthodes	29

I.1. Matériel	29
I.1.1. Matériel non biologique	29
I.1.2. Matériel biologique	29
I.1.2.1. Matériel végétal	29
I.1.2.2. Matériel animal	30
I.2. Méthodes d'étude	30
I.2.1. Présentation de la zone d'étude	30
I.2.2. Procédé d'extraction des huiles essentielles	31
I.2.2.1. Récolte et séchage	31
I.2.2.2. Technique d'extraction par hydrodistillation	32
I.2.2.2.1. Description du dispositif d'extraction	32
I.2.2.2.2. Extraction par hydro distillation	33
I.2.2.3. Conservation des huiles essentielles	35
I.2.3. Détermination du rendement en huiles essentielles	36
I.2.4. Evaluation de la cinétique d'extraction	36
I.2.5. Mise en évidence du potentiel antifongique des huiles essentielles	36
I.2.5.1. Cueillettes des oignons	36
I.2.5.2. Identification microscopique	37
I.2.5.3. Isolement et repiquage	37
I.2.5.3.1. Choix du milieu de culture	37
I.2.5.3.2. Préparation du milieu PDA	38
I.2.5.3.3. Isolement	38
I.2.5.3.4. Repiquage et purification	39
I.2.5.4. Evaluation du potentiel antifongique	40
I.2.5.4.1. Préparation des différentes concentrations	40
I.2.5.4.2. Application des disques mycéliens	42
I.2.6. Evaluation de la croissance mycélienne	42
I.2.7. Calcul du taux d'inhibition (TI)	43
I.2.8. Détermination de l'indice antifongique (IA)	43
I.2.9. Calcul de la vitesse de croissance mycélienne (VC)	44
Chapitre II : Résultats et discussions	46
II.1. Propriétés organoleptiques des huiles essentielles de <i>Géranium rosat</i>	46
II.2. Rendement en huiles essentielles	47
II.3. Cinétique d'extraction	48
II.4. Identification de l'espèce fongique	49
II.4.1. Description macroscopique	49
II.4.2. Description microscopique	50

II.5. Potentialités antifongiques des huiles essentielles de <i>Géranium rosat</i> vis-à-vis d'<i>Aspergillus niger</i>	51
II.5.1. Croissance mycélienne	51
II.5.2. Taux d'inhibition (TI)	54
II.5.3. Indice antifongique (IA)	55
II.5.4. Vitesse de croissance mycélienne (VC)	56
II.5.5. Discussions	59
Conclusion	63

Listes des figures

Figure 1: Schéma de formation de poches	5
Figure 02: Poils sécréteurs de lavande	5
Figure 2: Canal sécréteur d'ombellifère (Sahraoui,2014).	6
Figure 3: Biosynthèse des huiles essentielles parla voie desphénylpropanoïdes et celle des terpénoïdes(Janin, 2006)	7
Figure 4: Biosynthèse des huiles essentielles parla voie desterpénoïdes(Janin, 2006)	8
Figure 5: Colonie d' <i>A. niger</i> sur milieu Czapekaaprès 7 jours d'incubation à 25 °C(Nguyen, 2007)	22
Figure 6: Apparence microscopique d' <i>A. niger</i> (à gauche : observation microscopique au Gx40(Luisa et Correia,2013); à droite : aspect schématique(Pitt <i>et al.</i> , 1997))	23
Figure 7: Structure de l'appareil conidien d' <i>A. niger</i> (Jesus et Cordova, 1999)a : Organisation générale b : Disposition des conidies en colonne	23
Figure 8: Développement d' <i>A. niger</i> surveillé par microscope électronique à balayage(Dijksterhuis et Wösten, 2013).	24
Figure 9: Cycle fongique d' <i>A. niger</i> (Desoubeaux et Chandener,2010)	25
Figure 10: provoqués par <i>A. niger</i> sur	26
Figure 11: Taches brunes avec	26
Figure 12 : Moisissure noire due à <i>A.niger</i> sur bulbe d'oignon (Kolberget <i>al.</i> ,2000)	26
Figure 13: <i>Géranium rosat</i> (Photo originale, 2020).	29
Figure 14: Chambre de stockage d'Aja de Khemis Miliana (Photo originale, 2020)	30
Figure 15: Localisation du parc national d'El Madad de Thniet El Had de Tissemsilte	31
Figure 16: <i>G. rosat</i> dans des sacs en plastique	32
Figure 17: Séchage de <i>G. rosat</i>	32
Figure 18: Appareil d'hydro distillation de type Clevenger	33
Figure 19: Pesage de 25 g de <i>G. rosat</i>	34
Figure 20: Additionnement de l'eau distillée	34
Figure 21: Ebullition de <i>G. rosat</i> avec	34
Figure 22: Décantation pour séparer les	34
Figure 23: Récupération des huiles essentiellesdans des eppendorffs	35
Figure 24: Éppendorffs contenant des huiles essentielles de <i>G. rosat</i> conservés au réfrigérateur (Photo originale, 2020).	35
Figure 25: Bulbes d'oignon présentant des symptômes de moisissure noire (Photo originale, 2020).	37
Figure 26: Milieu PDA préparé dans un flacon	38
Figure 27: Isolement et ensemencement	39
Figure 28: Etuve utilisée pour l'incubation	39
Figure 29: Boîtes de Pétri utiisées pour	40
Figure 30: Observation microscopique	40
Figure 31: Préparation des différentes concentrations des huiles essentielles pour le test antifongique(Photos originales, 2020)	41
Figure 32: Application des disques mycéliens (Photos originales, 2020)	42
Figure 33: Huiles essentielles de <i>G. rosat</i> obtenues par hydro distillation (Photo originale, 2020)	46
Figure 34: Cinétique d'extraction deshuiles essentiellesde <i>G. rosat</i> en fonction du temps(Photo originale, 2020)Ajouter les légendes	48
Figure 35: Colonies noires d' <i>Aspergillus niger</i> sur milieu PDA après 7 jours d'incubation (Photo originale, 2020)	50
Figure 36: Aspect microscopique d' <i>A. niger</i> (à gauche : observation au GX40, à droite : observation au GX100) (Photos originales, 2020).	51
Figure 37 : Croissance d' <i>A. niger</i> sur milieu PDA après 7 jours d'incubation avec les différentes doses des huiles essentielles de <i>G. rosat</i> (Photo originale, 2020)	52
Figure 38: Diamètres de la croissance mycélienne d' <i>A. niger</i> en fonction de la concentration en huile essentielle de <i>G. rosat</i> après 7 jours d'incubation	53

Figure 39: Taux d'inhibition (TI) de la croissance d' <i>A. niger</i> en fonction des différentes doses des huiles essentielles de <i>G. rosat</i>	54
Figure 40: Indice antifongique (IA) des huiles essentielles de <i>G. rosat</i> calculé après 7 jours d'incubation d' <i>A.niger</i>	56
Figure 41: Evolution de la croissance mycélienne d' <i>A. niger</i> en fonction du temps d'incubation pour la D0 (Témoin).....	57
Figure 42: Evolution de la croissance mycélienne d' <i>A. niger</i> en fonction du temps d'incubation pour la D1 (25ul).....	57
Figure 43: Evolution de la croissance mycélienne d' <i>A. niger</i> en fonction du temps d'incubation pour la D2 (125ul).....	58
Figure 44: Evolution de la croissance mycélienne d' <i>A. niger</i> en fonction du temps d'incubation pour la D3 (250ul).....	58
Figure 45: Vitesse de la croissance mycélienne d' <i>A. niger</i> en fonction des doses des huiles essentielles de <i>G. rosat</i> durant 7 jours d'incubation.....	59

Liste des tableaux

Tableau 1: Techniques d'extraction des huiles essentielles.....	9
Tableau 2: Composés majoritaires de l'huile essentielle de <i>Géranium rosat</i> (Boukhatem, 2010)	18
Tableau 3: Rendement en huiles essentielles extraites de <i>G. rosat</i>	47
Tableau 4: Rendement en HE de <i>G. rosat</i> selon certaines études	47
Tableau 5: Diamètres (en cm) de la croissance mycélienne d' <i>A. niger</i> en fonction du temps d'incubation et de la concentration en huile essentielle de <i>G. rosat</i> durant les 7 jours d'incubation...	52
Tableau 6: Taux d'inhibition (TI) de la croissance d' <i>A. niger</i> en fonction des différentes doses des huiles essentielles de <i>G. rosat</i>	54
Tableau 7: Indice antifongique (IA) des huiles essentielles de <i>G. rosat</i> calculé après 7 jours d'incubation d' <i>A. niger</i>	55

Liste des abréviations

µl : Microlitre

A. niger : *Aspergillus niger*

AFNOR : Association Française de Normalisation

FAO : Food Agriculture Organisation

G rosat : Géranium rosat

HD : Hydro distillation

HEs : Huile(s) essentielle(s)

PDA : Potato Dextrose Agar

RHE : Rendement en huile essentielle

Ti : Taux d'inhibition

IA : l'indice antifongique

VC : vitesse de la croissance mycélienne

R : Répétitions

Introduction

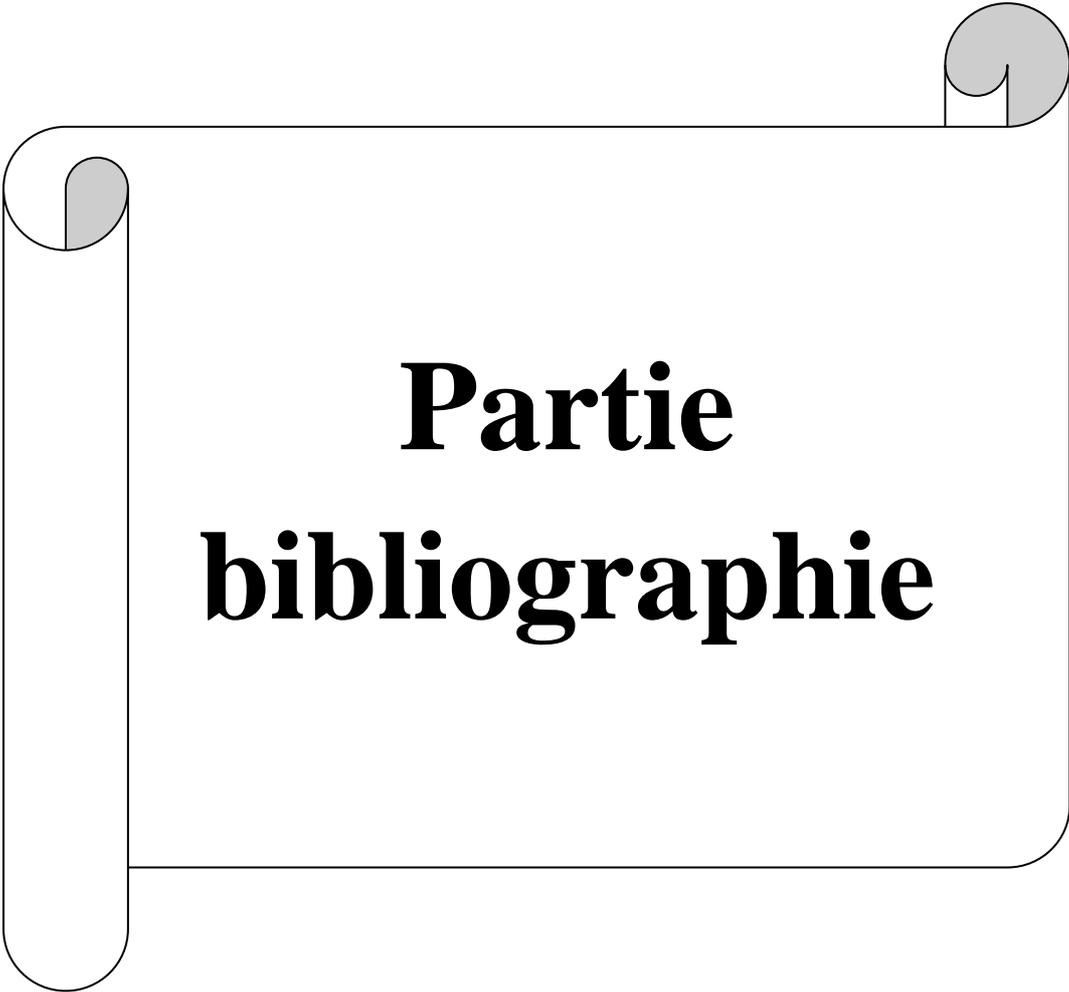
Les maladies de conservation des fruits constituent un obstacle majeur au développement des productions biologiques de fruits, elles se traduisent régulièrement par des pertes allant de 40 à 50% de la récolte (**Pant et Manandhar, 2007**).

La lutte contre ces maladies et particulièrement les maladies cryptogamiques repose plus particulièrement sur l'utilisation des produits chimiques. Cependant, beaucoup d'effets non intentionnels ont été associés à l'emploi intensif et non raisonné de ces produits, suite à une contamination de la biosphère ou même de la chaîne alimentaire (**Schnaubelt, 2005 ; Al-Safadi, 2008 ; Prapagdee et al., 2008**). De même, la persistance de ces résidus toxiques sur les fruits et légumes après traitement et le développement des souches résistantes, à ces composés, présentent la limite de leur emploi (**Pant et Manandhar, 2007**).

Pour résoudre ce problème, une recherche sérieuse est nécessaire pour identifier des méthodes alternatives pour la protection des végétaux, qui sont moins dépendantes des produits chimiques et plus respectueuses à l'environnement (**Prapagdee et al., 2008**).

Les effets antimicrobiens de différentes espèces de plantes aromatiques sont connus depuis longtemps et mis à profit de manière empirique pour l'assainissement de l'air (encensoir) ou pour augmenter la durée de vie des aliments (bouquet garni). Les propriétés antimicrobiennes sont essentiellement dues à la fraction d'huiles essentielles contenues dans ces plantes (**Baba Moussa et al., 1997 ; Bifteck et al., 2002**). Ces huiles essentielles sont des substances huileuses, volatiles et odorantes qui sont extraites par divers procédés (**Guy, 1997 ; Iserin et al., 2007 ; Kaloustian et al., 2008**).

Notre étude est une contribution à la recherche de molécules biologiques actives à pouvoir inhibiteur à l'égard de champignons phytopathogènes ; et dans le but de valoriser notre patrimoine national de plantes aromatiques, notre travail a porté sur l'espèce végétale locale collectée de la région de Tissemsilte *Geranium rosat* et vise à tester l'activité antifongique de leurs huiles essentielles vis-à-vis du champignon responsable de la moisissure noire *Aspergillus Niger* ainsi d'étudier leur action sur la croissance de ce dernier.



Partie
bibliographie

Chapitre I :

Aperçu sur les huiles essentielles



Chapitre I : Aperçu sur les huiles essentielles

I.1. Historique

L'utilisation des arômes pour se soigner n'est pas une technique récente. Dans toutes les civilisations de l'antiquité, la mention des arômes est présente, pour des usages religieux, cosmétiques, mais aussi thérapeutiques. D'abord on se servit des plantes entières pour apporter soulagement et bien-être (sous forme de cataplasmes, infusions, macérations, décoctions) (**Lardry et Haberkorn, 2003**). Ensuite l'homme s'est intéressé à « détacher de son support » le principe aromatique d'une plante (**Deschamp, 1990**).

En chine, l'Empereur Chen Nong (2800 av J-C), médecin érudit, consigne son savoir relatif aux plantes médicinales dans un livre, le Pen Ts'ao, qui recense plus de 1000 plantes médicinales utiles(**Lardy et Haberkorn,2007**).Il semblerait que ce soit les Egyptiens, dont l'histoire remonte à plus de 4000 ans qui furent les premiers à tirer parti du règne végétal dans un souci esthétique et spirituel. Plus tard la civilisation Arabe dont Bagdad, Bassora et Damas étaient les principaux centres commerciaux, développa le commerce des épices et des aromates et donna une grande impulsion à l'Art de distillation. C'est Gerber (721-815) qui mentionna le premier de façon écrite la description de ladistillation.L'alambic est incontestablement associé à Avicenne (930-1037), tout comme le Giovannil Baptista Della Porta (1540-1615), dans son célèbre ouvrage "De destillatione" parut en 1567,mentionne les connaissances avancées des arabes dans le domaine de la distillation(**Lucchesi,2005**).

I.2. Définition

L'huile essentielle est définit comme étant le produit obtenu à partir d'une matière première végétale, soit par entrainement à la vapeur d'eau, soit par des procédés mécaniques à partir de l'épicarpe pour les *Citrus*, soit par distillation à sec. Elle est ensuite séparée de la phase aqueuse par des procédés physiques. Elle renferme un mélange varié de composants aromatiques ayant des propriétés communes. Liquides à température ambiante, les huiles essentielles sont volatiles ce qui les différencie des huile fixes. Elles ne sont que très rarement colorées (**Janin, 2006**).

I.3. Localisation et lieu de synthèse

Les huiles essentielles se trouvent dans des cellules sécrétrices spécifiques. Ce sont des structures histologiques spécialisées qui servent à leur stockage. Ces cellules sécrétrices sont rarement à l'état isolé. Mais le plus souvent regroupées dans des poches sécrétrices (myrtacées, rutacées) (Fig. 01), des poils sécréteurs (Lamiacées)(Fig. 02) ou dans des canaux sécréteurs (apiécées, astéracées) (Fig. 03)(Bruneton, 1999 ; Hazzit, 2002 ; Boz et al., 2009). Elles sont, fréquemment, situées à la périphérie des organes extérieurs de la plante (Kaloustion, 2012 ; Sahraoui, 2014 ; 2015). Elles peuvent être stockées dans tous les organes végétaux : les fleurs, les feuilles, les racines, les rhizomes, les fruits, le bois et/ou les graines (Bruneton, 1993 ; Anton et Lobstein, 2005).

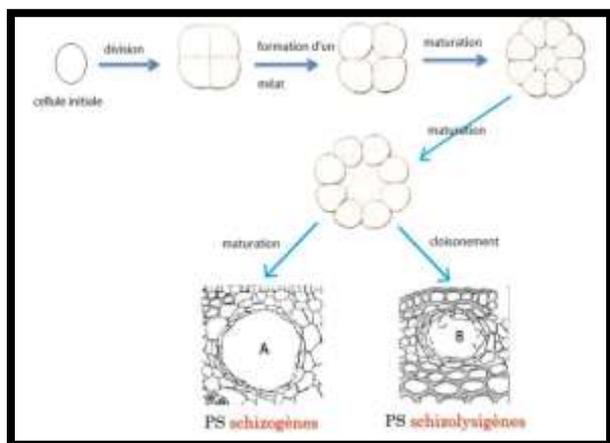


Figure 1: Schéma de formation de poches sécrétrices (Sahraoui, 2014).

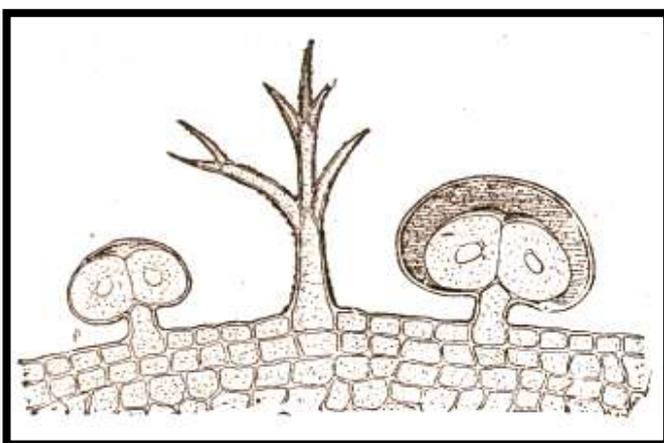


Figure 02: Poils sécréteurs de lavande (Sahraoui, 2014).

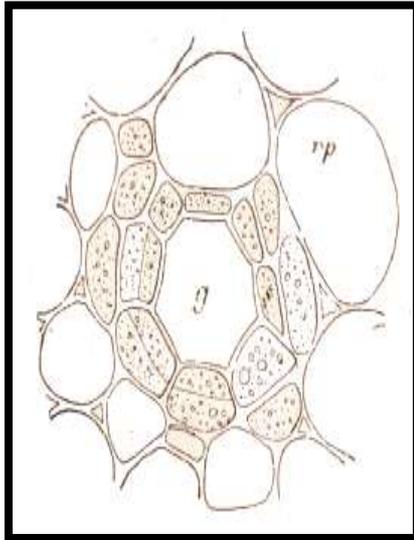


Figure 2: Canal sécréteur d'ombellifère (Sahraoui,2014).

I.4. Biosynthèse

Les huiles essentielles peuvent être synthétisées selon deux voies différentes : la voie des phényle propanoïdes (Faleiro et al., 2003) et la voie des terpénoïdes (Hammer et al., 2003).

I.4.1. Voie des phénylpropanoïdes

La synthèse des huiles essentielles par la voie de phénylpropanoïdes (Fig. 04) commence par un métabolite du fructose, le PEP (phosphoenolpyruvate). Elle aboutit à un très grand nombre de substances aromatiques, via une série d'acides, dont l'acide shikimique (d'où son nom, voie shikimique) et l'acide cinnamique. Les métabolites terminaux, importants en thérapeutique, sont les acides aromatiques suivants : acide salicylique, acide benzoïque et leur esters dont le salicylate de méthyle, certains phénols (eugénol) ainsi que les coumarines. Quelques grandes familles chimiques de molécules non volatiles, comme les tannoïdes et les flavonoïdes, se trouvent incluses dans cette voie (Faleiro et al., 2003).

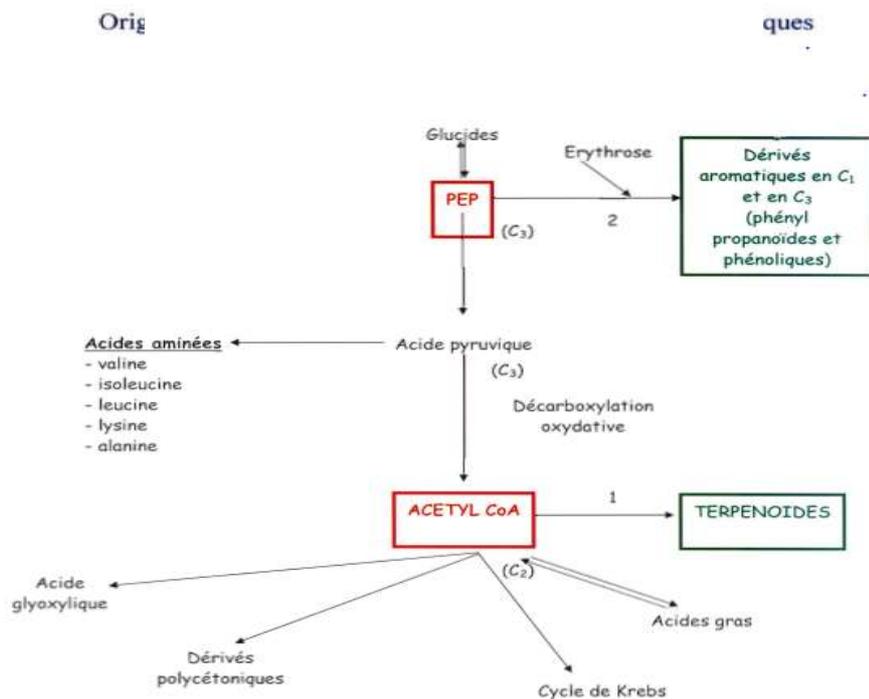


Figure 3: Biosynthèse des huiles essentielles par la voie des phényl propanoïdes et celle des terpénoïdes (Janin, 2006)

I.4.2. Voie des terpénoïdes

Le matériau de base est l'IPP (isopentylpyrophosphate) (Fig. 05), molécule à cinq atomes de carbones ayant une structure semi-alvéolaire. Il est dérivé de l'acétyl CoA (carrefour important), lui-même issu de PEP provenant directement du fructose. La construction des squelettes hydrocarbonés a lieu par la juxtaposition (tête à queue) d'unités isopréniques, unités penta carbonées ramifiées assemblées enzymatiquement. Ainsi on trouve des squelettes hydrocarbonés à dix carbones (monoterpènes), puis à quinze carbones (sesquiterpènes) et plus rarement, à vingt carbones (diterpènes). Le processus peut se poursuivre mais dans d'autres buts que la synthèse des essences (Hammer et al., 2003).

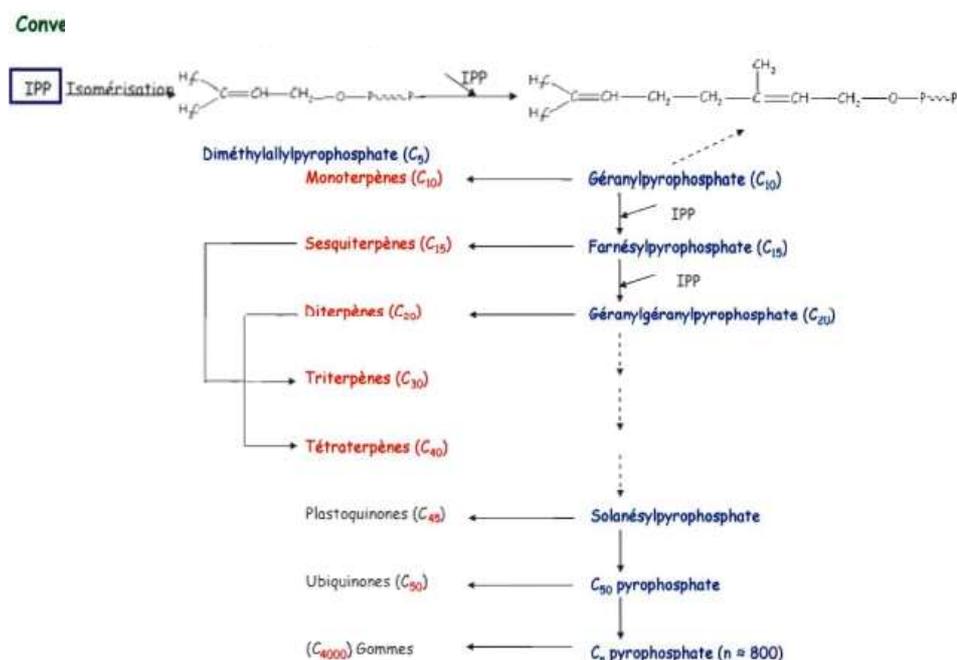


Figure 4: Biosynthèse des huiles essentielles par la voie des terpénoïdes (Janin, 2006)

I.5. Propriétés physiques

Les huiles essentielles sont liquides à température ambiante mais aussi volatiles. Elles sont liposolubles et solubles dans les solvants mais très peu solubles dans l'eau. Il faut donc impérativement un tensioactif pour permettre leur mise en suspension dans l'eau (Lakhder, 2015). Elles sont généralement incolores ou faiblement colorées (Zerrouki, 2009).

I.6. Composition chimique

La composition chimique des huiles essentielles est complexe et peut varier selon l'organe de la plante, le génotype, les facteurs climatiques, l'origine géographique, la nature du sol, les pratiques culturales et le mode d'extraction (Roux-Sitruk et al., 2008 ; Benabdallah, 2012 ; Carole, 2013). En générale, les huiles essentielles sont un mélange de constituants qui appartiennent à trois catégories : les terpènes, les composés aromatiques et les composés d'origine diverses (Bruneton, 1999).

I.6.1. Terpènes

Les huiles essentielles contiennent particulièrement des monoterpènes, des sesquiterpènes et peu souvent des diterpènes. Les terpènes sont des hydrocarbures formés par assemblage de deux ou plusieurs unités isopréniques. Ce sont des polymères de l'isoprène de formule brute (C₅H₈). Elles

sont de structures très diverses (acycliques, monocycliques, bi cycliques,...) et contiennent la plupart des fonctions chimiques des matières organiques(Finar, 1994).

I.6.2. Composés aromatiques

Les composés aromatiques dérivent du phénylpropane (C₆-C₃). Ils sont moins fréquents que les terpènes. Cette classe comprend des composés odorants comme la vanilline, l'eugénol, l'anéthols, l'estragole. Ils sont fréquemment rencontrés dans les huiles essentielles d'apiécées (cumin, fenouil, persil, ...) et sont caractéristiques de celles de la vanille, de l'estragon, du basilic et du clou de girofle (Chemat et al., 2012)

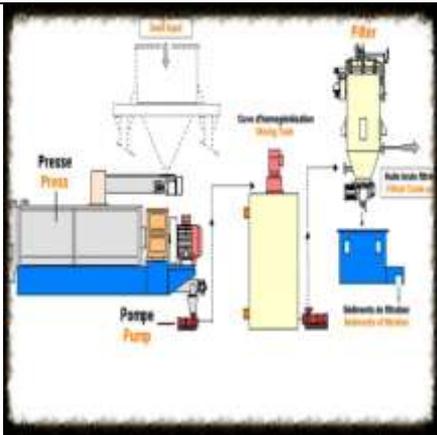
I.6.3. Composés d'origines diverses

Il s'agit là de produits résultant de la transformation de molécules non volatiles. Ces composés contribuent souvent aux arômes de fruits compte tenu de leur mode de préparation, les concrètes et les absolues peuvent en renfermer(Bruneton, 1999).

I.7. Procédés d'extraction

Il existe plusieurs procédés d'extraction des huiles essentielles dont quelques uns sont résumés dans le tableau 01.

Tableau 1Techniques d'extraction des huiles essentielles

Techniques d'extraction et principes	Schémas des procédés d'extraction
<p style="text-align: center;">Expression à froid</p> <p>Cette technique consiste à rompre mécaniquement les poches à essences. L'huile essentielle est séparée par décantation ou centrifugation. D'autres machines rompent les poches par dépression et recueillent directement l'huile essentielle, ce qui évite les dégradations liées à l'action de l'eau (Bencheikh, 2017)</p>	 <p style="text-align: center;">Figure 06: Montage d'extraction par expression à froid</p>

Extraction par micro-ondes

Ce procédé, appelé Vacuum Microwave Hydro distillation (VMHD), consiste à extraire l'huile essentielle à l'aide d'un rayonnement micro-ondes d'énergie constante et d'une séquence de mise sous vide. Seule l'eau de constitution de la matière végétale traitée entre dans le processus d'extraction des essences. Sous l'effet conjugué du chauffage de façon séquentielle dans l'enceinte de l'extraction, l'eau de constitution de la matière végétale fraîche entre brutalement en ébullition. Le contenu des cellules est donc plus aisément transféré vers l'extérieur du tissu biologique, et l'essence est alors mise en œuvre par la condensation, le refroidissement des vapeurs et puis la décantation des condensats (Mompon, 1994 ; Brian, 1995).

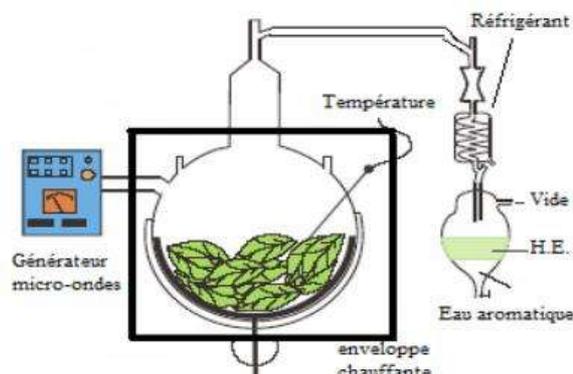


Figure 07 : Montage d'extraction par micro-Ondes (Lucchesi, 2005)

Hydro diffusion

Cette technique est relativement récente. Elle consiste à faire passer, du haut vers le bas (perdescendum) et à pression réduite, la vapeur d'eau au travers de la matrice végétale. L'huile essentielle obtenue avec ce procédé contient des composés non volatils ce qui lui vaut une appellation spéciale « essence de percolation » (Franchomme, 1990 ; Richard, 1992).

Techniques d'extraction et principes

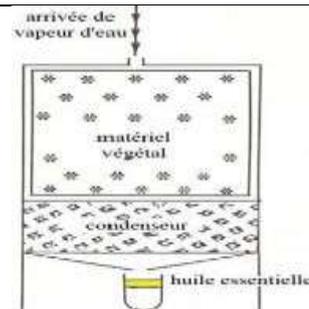


Figure 08: Montage d'hydro diffusion (Franchomme, 1990 ; Richard, 1992)

Schémas des procédés d'extraction

Distillation par entrainement à la vapeur d'eau

Dans cette technique, la vapeur d'eau fournie par une chaudière traverse la matière végétale située au dessus d'une grille. Durant le passage de la vapeur à travers le matériel, les cellules éclatent et libèrent l'huile essentielle qui est vaporisée sous l'action de la chaleur pour former un mélange (eau + huile essentielle). Le mélange est ensuite véhiculé vers le condenseur et l'essencier avant d'être séparé en une phase aqueuse et une phase organique (Benouali,2015) .

Procédé : Entrainement par la vapeur

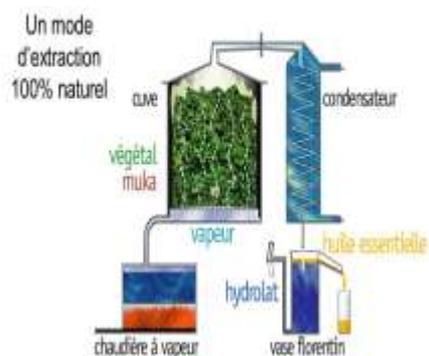


Figure 09: Montage d'extraction par entrainement à la vapeur d'eau

Hydro distillation

L'hydro distillation est la technique de référence dans l'étude des composés volatiles d'une plante. Le phénomène physique est identique à celui décrit précédemment. Cependant une verrerie adaptée a été mis en place permettant à la fois la circulation en circuit quasi-fermé de l'eau sous forme aqueuse et gazeuse et la cohobation de l'huile essentielle. Ces phénomènes ont été rendus possibles à l'échelle du laboratoire grâce à l'utilisation d'un appareillage de type Clévenger (Sutour, 2010).

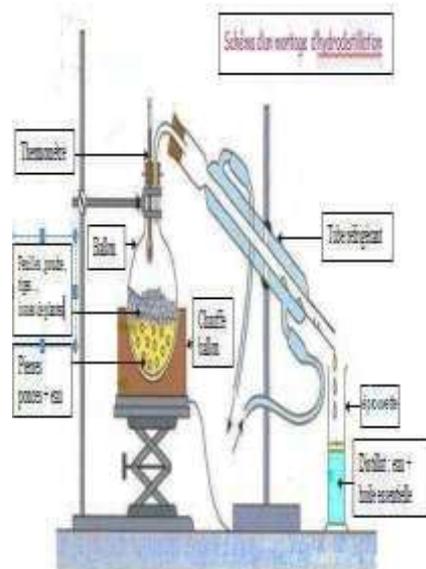


Figure 10 : Montage d'extraction par Hydro distillation (Lucchesi, 2005)

I.8. Rôles des huiles essentielles au niveau de la plante

Le rôle exact que jouent les huiles essentielles dans la physiologie de la plante productrice reste encore mal connu. Toutefois, il existe plusieurs spéculations à ce sujet qui définissent les huiles essentielles comme des signaux moléculaires qui régissent les interactions écologiques entre la plante et son environnement. En effet, la complexité de ces produits leur permet de communiquer une multitude de messages biologiques spécifiques. Etant volatiles, les composants des huiles essentielles sont capables d'influencer un organisme qui se trouve à une certaine distance de la plante productrice. Leur nature lipophile leur permet une certaine persistance dans une biosphère largement aqueuse. Ainsi il a été démontré que les huiles essentielles ont un effet attractif envers les animaux qui servent à la pollinisation (**Ciccarelliet al., 2008**) et à la dispersion des graines. Par contre un effet répulsif a été observé contre les herbivores (**Isman, 2000**). Les plantes aromatiques utilisent les huiles essentielles également pour inhiber la germination et le développement d'autres espèces végétales dans leur voisinage : effet allélopathique (**DeFeoet al.,2002**).

I.9. Domaines d'application

Les huiles essentielles sont utilisées dans la cosmétologie et l'industrie du parfum. Ses propriétés cutanées ainsi que son odeur suave, puissante et rappelant la rose lui valent une place non négligeable dans de nombreux crèmes et produits cosmétiques tel que les savons, les dentifrices, les préparations d'huile pour le bain et les massages (**Janin, 2006**).

Les huiles essentielles sont de plus en plus utilisées dans la conservation des denrées alimentaires et cela grâce à leur activité antimicrobienne à large spectre sans pour autant dénaturer le goût car ces aromates entrent dans la composition des préparations alimentaires (**Kurita et Koike, 1982**).

Les huiles essentielles agissent sur la biomasse et la production du pseudo mycélium et inhibent la germination des spores, l'élongation du mycélium, la sporulation et la production de toxines chez les moisissures (**Oussalah, 2007**). Un grand nombre de composés volatils ont été testés contre une large gamme de champignons et de levures (*Candida albicans*, *Aspergillus niger*, *A. flavus*, *A.fumigatus*, *Penicillium chrysogenum*) (**Ghfir et Dargent, 1995 ; Kalemba et Kunicka, 2003 ; El Ajjouriet al., 2008**).Egalement, il s'est avéré que les virus sont aussi très sensibles aux molécules aromatiques et les parasites au groupe des phénols(**Belkou, 2005**).

Les aldéhydes et les terpènes sont réputés pour leurs propriétés désinfectantes et antiseptiques et s'opposent à la prolifération des germes pathogènes (**Benayad, 2008**).

Les pesticides naturels basés, notamment, sur les huiles essentielles représentent une alternative intéressante pour la protection des cultures contre les insectes et les adventices et sont utilisées comme agents de lutte biologique (**Isman, 2000 ; Dayan et al., 2009 ; Nedjajiet al., 2017**).

Chapitre II :
Présentation de *Géranium rosat*



Chapitre II : Présentation de *Géranium rosat*

II.1. Généralités

Au milieu du XIX^{ème} siècle, la véritable rose du Levant (*Rosa damascène Mill.*) devenant rare et le prix de son huile essentielle très élevé, contraignit les parfumeurs de l'époque de rechercher de nouvelles sources d'essences à odeur de rose, d'où les essais de culture de *Géranium rosat* par D'Emerson et les premières plantations dans la région de Grasse pour la production d'huile essentielle (Peyron, 2013).

Le *Géranium rosat* appartient à la famille des *Géraniacée*. Il porte différents noms dont *Pélargonium graveolens*, *Géranium odorant* et *Géranium Bourbon*. Son nom vient du grec « *Pélargos* » littéralement « cigogne » puisque son fruit ressemble au bec de cigogne (Bossier, 1987).

Le genre *Pélargonium* comprend plus de 200 espèces regroupées en 15 sections, mais une dizaine de variétés seulement sont exploitées pour la production des huiles essentielles (Mosta, 2006).

II.2. Systématique

Selon Hér (1789) et Boutarfaia et Benyahia (2015), le *Géranium rosat* est classé comme suit :

Classification de la plante

- **Embranchement** : Spermaphytes
- **Sous embranchement** : Angiospermes
- **Règne** : Planta
- **Division** : Magnoliophyta
- **Classe** : Magnoliopsida
- **Ordre** : Géraniales
- **Famille** : Géraniacée
- **Genre** : *Pélargonium*
- **Espèce** : *Pélargonium graveolens*
- **Nom binominal** : *Pélargonium graveolens* L'Hér, 1789

II.3. Description botanique

Le *Géranium rosat* est un arbrisseau très ramifié, plus ou moins érigé, jusqu'à 1,4 m de hauteur et 1 m de diamètre au niveau de la cime (Fig. 11). Son système racinaire est étalé, étendu et superficiel, pénétrant rarement à plus de 30 cm. La tige tendre, gris vert, velue, devenant plus sombre et ligneuse avec l'âge. Les feuilles opposées ou alternes, molles, parfumées, hirsutes avec des poils glandulaires et non glandulaires (Fig. 12). L'inflorescence terminale, en tête, avec 5 à 10 fleurs dans un petit pseudo ombellé compact. Les fleurs roses pâles ont une symétrie radiée suivant 5 rayons (Fig. 13) (Lavergne, 2011).



Figure 11: *Géranium rosat* (Boutarfaia et Benyahia, 2015)



Figure 12: Feuilles de *G. rosat*
(Fornet, 2016)



Figure 13: Fleurs de *G. rosat*
(Fornet, 2016)

II.4. Répartition géographique

II.4.1. Dans le monde

Originaires d'Afrique australe où ils sont indigènes, les pélargoniums ont été importés en Europe vers 1690 et y sont communément répandus de nos jours comme plantes d'ornement (**Gomes et al., 2004**). Ils sont aussi cultivés dans de nombreuses régions méditerranéennes et subtropicales (**Boukhatem et al., 2011**).

II.4.2. En Algérie

L'Algérie, de part sa position géographique, jouit de plusieurs facteurs de pédogenèse et de grandes variations climatiques auxquels s'ajoutent les ressources hydriques, tous favorables au développement des cultures intensives des plantes aromatiques (**Belouad, 2001**). Cependant, rares sont les cultures des plantes à parfum qui ont fait l'objet d'études scientifiques très approfondies, le géranium rosat est un exemple éloquent d'espèce qui n'échappe pas à cette règle. Cette plante a été introduite en Algérie au 19^{ème} siècle où elle a acquis des proportions gigantesques durant la période coloniale (**Heuze, 1859**). Aujourd'hui, sa culture, pratiquée sur de petites parcelles dans des conditions de production difficiles, est menacée d'abandon malgré les immenses atouts qu'elle offrait. La distillerie locale « Extral Bio » de Blida, en exploite seulement quelques hectares de géranium destiné à l'extraction des huiles essentielles (**Lis-Balchin, 2002**).

II.5. Exigences pédoclimatiques

Les conditions climatiques ont une forte influence sur le développement de *G. rosat*, qui demande un climat chaud, sec, sans vent nuisible. L'exposition à la lumière a une action marquée sur la qualité de l'huile essentielle et de son rendement. La température doit rester supérieure ou égale à 35°C. Les faibles gelées sont à craindre d'autant que les plantes soient plus jeunes. Il résiste à la sécheresse et l'humidité atmosphérique lui étant nuisible (**Rivière, 1889**).

Le *Géranium rosat* trouve son bonheur dans les hauteurs entre 600 et 1 400 m et largement irrigués (**Réunion, 2000 ; Tibère, 2005**). Les terres les plus favorables sont les sols légers, un peu acides, humifères, perméables et sains (**Bedier, 1982**).

II.6. Huile essentielle : propriétés physiques et composition chimique

Les huiles essentielles de *G. rosat* est de couleur jaune clair. A pression ambiante, sa densité est de 0,85. Un litre d'huile essentielle pèse 850 gramme. Son parfum rappelle celui de la rose et de la citronnelle (**Janin, 2006**).

Les résultats de l'analyse par chromatographie gazeuse-spectrométrie de masse de la composition chimique de l'huile essentielle de *Géranium rosat* ont révélé au total 48 constituants. Cette HE est composé essentiellement d'alcools terpéniques (41%). Les esters forment un pool à moins de 25% suivis des sesquiterpènes (19%). Les cétones sont à un taux de 6% mais constituées uniquement de menthone et d'isomenthone (Tableau 02). Enfin, les composés minoritaires appartiennent à la famille des oxydes (oxyde de rose), aldéhydes (géraniol, néral) et alcools sesquiterpéniques (**Boukhatem, 2010**).

Tableau 2: Composés majoritaires de l'huile essentielle de *Géranium rosat* (**Boukhatem, 2010**)

Composés	Pourcentage
Citronellol	33,215
Formate de citronellyle	10,566
Guaia-6,9-diene	9,256
Géraniol	5,423
Isomenthone	4,352
Tiglate de géranyle	3,033
Linalool	2,237
β -Tiglate de phényle	2,208
Menthone	1,964

II.7. Utilisation et domaines d'application

L'huile essentielle de *Géranium rosat* combat la fatigue, calme les estomacs et les intestins irrités, fait disparaître les bleus et les ecchymoses, active la cicatrisation des petites blessures ou écorchures, soulage le mal de gorge et fait fuir les moustiques. Ses composants sont très employés en parfumerie (**Locaste, 2014**) et pour les crevasses, les pores dilatés, les rides profondes ou tout ce qui doit être "resserré". C'est aussi un ingrédient de choix des masques et soins anti acné (**Kaibeck, 2012**).

Les effets antioxydants de l'huile essentielle de *Pélargonium graveolens* ont été étudiés et démontrés par la méthode des radicaux libres induits et peuvent trouver un intérêt industriel (**Zhong Yaoetal., 2005**).

Les principaux composants de l'huile essentielle de *Pélargonium graveolens*: le géraniol et le citronellol ont montré, in vitro, leurs actions antifongiques propres et synergiques avec combinaison de kétoconazole sur la classe des *Trichophytons* et notamment *T. soudanense* et *T. sclzoenleinii*. Une seconde étude a montré l'action propre et synergique du géraniol et du citronellol en association avec de l'amphotéricine B et du kétoconazole sur deux souches d'*Aspergillus* (*A. niger* et *A. flavus*) (**Shin, 2003**).

L'activité antibactérienne s'est avérée efficace sur les espèces suivantes : *Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis*, *Proteus vulgaris* et *Bacillus cereus*. Cette étude soulève l'intérêt de l'huile essentielle de *Géranium rosat* pour des applications telles que les conservateurs alimentaires et les produits d'entretiens ménagers (**Shin, 2003**).

Chapitre III :
Généralités sur *Aspergillus niger*



Chapitre III : Généralités sur *Aspergillus niger*

III.1. Définition

De nombreuses espèces d'*Aspergillus* sont présentes dans l'environnement humain, notamment dans la poussière et l'air (Morin, 1994). La plupart des *Aspergillus* sont des saprophytes, capables de se développer dans le sol, les débris, dans les composts et sur les végétaux malades déjà abimés par des blessures des piques d'insectes ou des attaques d'autres champignons. Ils contribuent à la biodégradation et le recyclage des matières organiques (Scheidegger et Payne, 2003). Ils sont aussi présents sur les surfaces des graines, sur et dans les fruits et les légumes dans des mauvaises conditions de stockage. Plusieurs espèces de ce genre sont capables de produire des mycotoxines (Scheidegger et Payne, 2003).

III.2. Taxinomie

En raison de son importance économique, *Aspergillus* est l'un des genres les mieux décrits du point de vue taxinomique parmi les champignons filamenteux. Al-Musallam (1980) a révisé la taxinomie du groupe *A. niger* en prenant essentiellement les caractéristiques morphologiques en compte. Récemment, plusieurs méthodes ont été utilisées dans cette section. La classification des espèces dans le groupe varie selon les traitements taxinomiques. Par exemple, Raper et Fennell ont décrit 12 espèces dans le groupe *Aspergillus niger*, Al-Musallam a admis 7 espèces dans la section *nige* et Kusters et *al.* ont accepté 6 espèces (Koji et *al.*, 2001 ; Masayuki et Katsuya, 2010).

La position systématique d'*A. niger* est résumée ci-dessous (Alexopoulos et Mims, 1979 ; Bocquet, 1993) :

Règne: Mycètes

Embranchement: *Amastigomycota*

Sous-embranchement: *Deuteromycotina*

Classe: Deutoromycètes

Ordre: *Moniliales*

Famille: *Moniliaceae*

Genre: *Aspergillus*

Espèce: *Aspergillus niger*

III.3. Description morphologique

III.3.1. Description macroscopique

A. niger est un champignon microscopique qui contamine les récoltes dans les champs ou pendant la conservation dans les silos ou greniers (**Pane et al., 2011**). Il forme des colonies noires atteignant 4 à 5 cm de diamètre en 7 jours sur milieu Czapek incubé à 25 °C (Fig. 14). La colonie est d'abord blanche et translucide puis devient noire en sporulant (**Ayesha et al., 2003**).



Figure 5: Colonie d'*A. niger* sur milieu Czapek après 7 jours d'incubation à 25 °C (**Nguyen, 2007**)

III.3.2. Description microscopique

A. niger représente 5 % des isolats aspergillaires isolés au laboratoire. Lorsque les conditions de développement sont favorables, il se présente sous forme filamenteuse (**Pane et al., 2011 ; Rahul et Jha, 2014**). Il possède alors des têtes cnidiennes larges, brun rouge très sombre à noir, tout d'abord sphériques et secondairement radiées. Elles sont portées par de longs conidiophores (1,5 à 3 mm de long) qui présentent une paroi épaisse, lisse et incolore. La vésicule est globuleuse, brune, et de grande taille (40 à 70 µm de diamètre). Les phialides très serrées, sont insérées sur la vésicule par l'intermédiaire de métules disposées sur tout le pourtour de la vésicule. Les métules et les phialides sont légèrement teintées de brun.

Les conidies sont produites en très longues chaînes qui, au fil du temps, ont tendance à se regrouper en plusieurs colonnes compactes .Elles sont typiquement globuleuses, brunes, échinulées à très verruqueuses, et mesurent 3,5 à 5 µm de diamètre. La pigmentation n'est pas répartie de façon uniforme sur toute la surface de la conidie, mais correspond à des granulations ornementales regroupées en crêtes irrégulièrement distribuées (Dijksterhuis et Wösten, 2013).

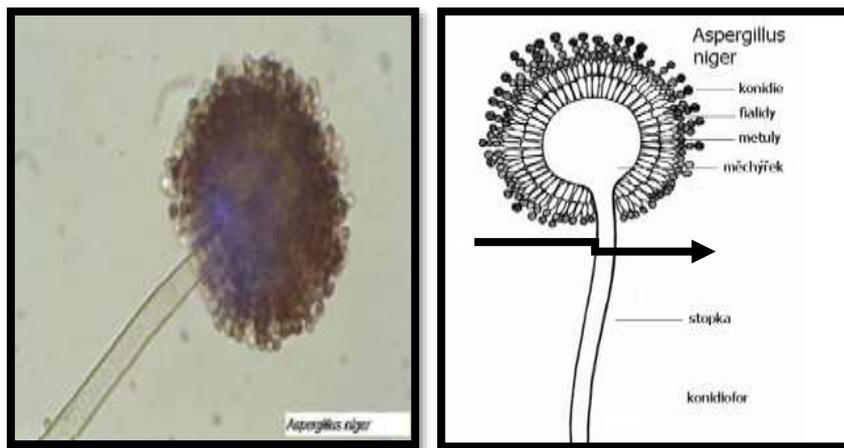


Figure 6: Apparence microscopique d'*A. niger* (à gauche : observation microscopique au Gx40 (Luisa et Correia, 2013); à droite : aspect schématique (Pitt *et al.*, 1997))

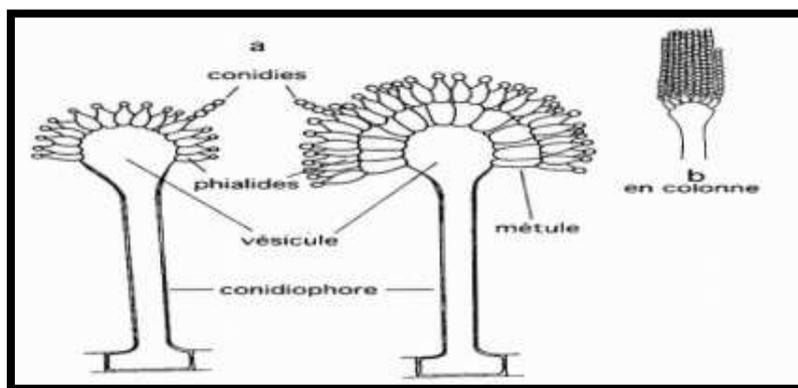


Figure 7: Structure de l'appareil conidien d'*A. niger* (Jesus et Cordova, 1999).

a : Organisation générale

b : Disposition des conidies en colonne

III.4. Croissance et cycle biologique

Dans l'environnement, la multiplication d'*A. niger* est végétative. En condition de sevrage ou d'autres stress, des structures spécialisées se développent à partir du mycélium: les conidiophores (Fig. 17 a, b, c et d). Il s'agit d'organes de fructification au bout desquels les têtes aspergillaires ou vésicules terminales sont retrouvées (Fig. 17 e). Les conidies, spores asexuées unicellulaires et uni nucléés, sont produites au niveau des organes de fructification par les phialides (Fig. 17 f et g). Ce sont les conidies (Fig. 17 h, i et j), de 2 à 3 µm de diamètre et très volatiles, qui sont responsables de la dissémination du champignon dans l'environnement (Quatresous, 2011). Lorsqu'elles rencontrent des conditions favorables, elles sont capables de germer et de reformer des filaments (Fig. 17) (Desoubeaux et Chandener, 2010).

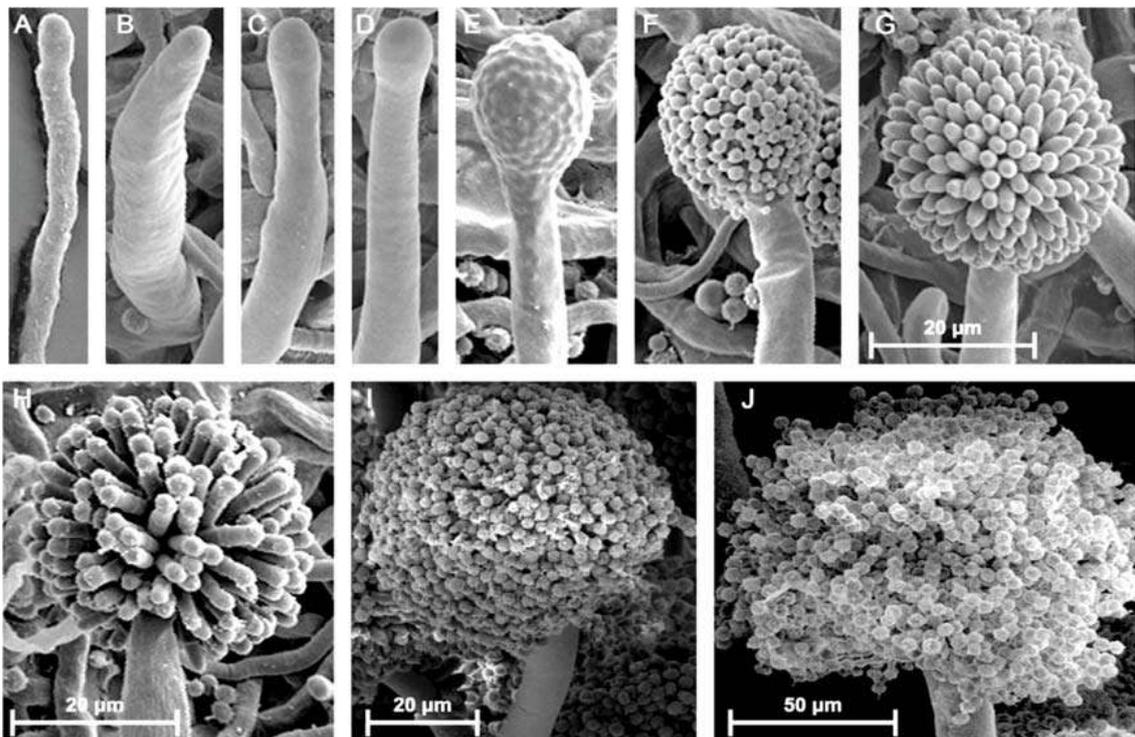


Figure 8: Développement d'*A. niger* sur veillé par microscope électronique à balayage (Dijksterhuis et Wösten, 2013).

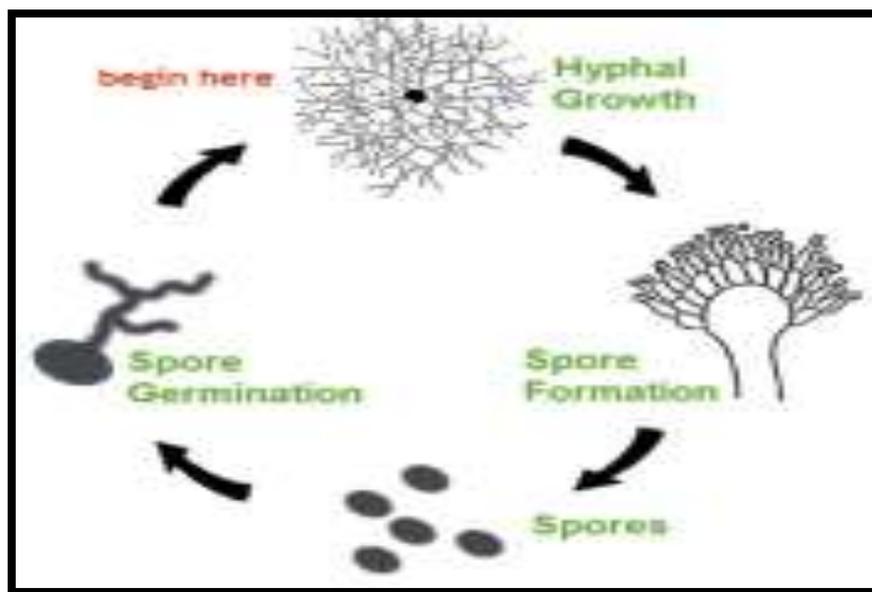


Figure 9: Cycle fongique d'*A. niger* (Desoubeaux et Chandener,2010)

III.5. Ecologie et conditions de développement

A. niger est une espèce cosmopolite qui a été signalée dans le monde entier. Cette moisissure se développe aussi bien en intérieur (où il est possible de la confondre avec *Stachybotryssp*) que sous forte lumière, en extérieur (Mhetras et al., 2009). C'est une des espèces les plus communes du sol. Elle croît sur la matière végétale en décomposition, comme les composts. Elle peut contaminer la viande et les œufs, ou les fruits séchés au soleil. Elle peut aussi endommager les cuirs en surface et en épaisseur (Meyer et al., 2004).

A. niger est capable de pousser dans la plage température large de 6 à 47°C avec un optimum de 35 à 37°C. La limite d'activité de l'eau (a_w) pour la croissance est de 0,88 qui est relativement élevée comparativement aux autres espèces d'*Aspergillus*. Il peut se développer à un pH de 1,4 à 9,8 (Schuster et al., 2002).

III.6. Symptomatologie

Aspergillus niger est responsable de la dégradation de certains fruits et légumes (Metahni,2012). Il a été observé qu'en général, l'infection commence au niveau de l'extrémité du pédoncule ou de l'extrémité apicale du fruit. La pulpe devient très molle et de couleur

brune à noirâtre avec souvent des fructifications blanchâtres à orangées (Fig. 20) (Kouadio,2017).

Sur les légumes et particulièrement les oignons (légume plus sensible et plus touché par *A. niger*), *A. niger* engendre des moisissures noires et des pourritures molles des bulbes (Fig. 21), ce qui pourrait affecter leur capacité de reproduction et les mettre en danger (Kolberget *al.*,2000).



Figure 10: provoqués par *A. niger* sur mangues (Kouadio, 2017)



Figure 11: Taches brunes avec fructifications blanchâtres causés par *A. niger* sur banane (Kouadio, 2017)



Figure 12 : Moisissure noire due à *A. niger* sur bulbe d'oignon (Kolberget *al.*,2000)



**Partie
pratique**

Chapitre 1 :

Matériel et méthodes



Chapitre I : Matériel et méthodes

L'objectif de nos essais est de vérifier le potentiel antifongique des huiles essentielles de *Géranium rosat* sur le champignon *Aspergillus niger* responsable de la pourriture noire de l'oignon. Ainsi de déterminer le taux d'inhibition de la croissance fongique (TI), l'indice antifongique (IA) et la vitesse de croissance mycélienne (VC) de cette même espèce fongique.

I.1. Matériel

I.1.1. Matériel non biologique

Le matériel non biologique utilisé dans notre étude est présenté dans l'annexe 01.

I.1.2. Matériel biologique

I.1.2.1. Matériel végétal

Le matériel végétal utilisé pour l'extraction des huiles essentielles était présenté par la plante aromatique et médicinale spontanée de la famille des Géraniacées *Géranium rosat* (Fig. 22). Cette plante a été prélevée du parc national d'El Madad de la région de Thniet El Had de Tissemsilte.



Figure 13: *Géranium rosat* (Photo originale, 2020).

I.1.2.2. Matériel animal

Le matériel animal, objet d'étude, était présenté par la moisissure *Aspergillus niger* responsable de la pourriture noire de l'oignon. Cette souche a été isolée à partir des bulbes d'oignon infectés et qui présentaient un feutrage noir (symptômes de la pourriture noire) et cela à partir des chambres de stockage d'Aja de Khemis Miliana (Fig. 23).



Figure 14: Chambre de stockage d'Aja de Khemis Miliana (Photo originale, 2020)

I.2. Méthodes d'étude

I.2.1. Présentation de la zone d'étude

Le parc national d'El Madad de la région de Thniet El Had de Tissemsilte (Fig. 24) se situe au Nord-ouest de l'Algérie, au centre de l'Atlas tellien et à la limite sud du grand massif d'Ouarsenis. Avec ses 3 425 ha, il atteint 1 787 m d'altitude. Ce parc représente un ensemble de sites naturels très intéressants par la richesse de sa faune (289 espèces animales) et de sa flore (450 espèces végétales) et son réseau hydrographique. C'est le premier espace naturel protégé en Algérie.

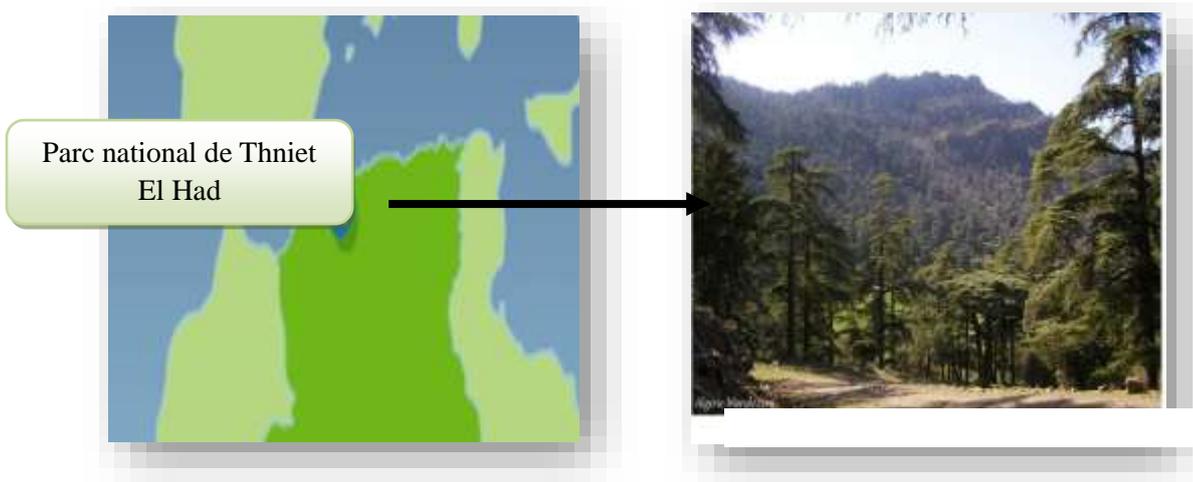


Figure 15: Localisation du parc national d'El Madad de Thniet El Had de Tissemsilte

I.2.2. Procédé d'extraction des huiles essentielles

I.2.2.1. Récolte et séchage

La récolte de la partie aérienne de *Géranium rosat* a été réalisée au stade floraison d'une manière aléatoire. Les échantillons ont été ramenés dans des sacs en plastique (Fig. 25) au laboratoire de production végétale où ils ont été étalés sur du papier blanc pour un séchage de 10 à 15 jours à l'air libre et à l'abri de la lumière et de l'humidité (Fig. 26). Ces échantillons ont été retournés de temps en temps pour assuré une bonne aération.

L'espèce étudiée a été identifiée par le responsable du Parc national de ThnietEl Had d'El Madad.



Figure 16: *G. rosat* dans des sacs en plastique
(Photo originale, 2020)



Figure 17: Séchage de *G. rosat*
(Photo originale, 2020)

I.2.2.2. Technique d'extraction par hydrodistillation

I.2.2.2.1. Description du dispositif d'extraction

L'extraction des huiles essentielles a été effectuée sur la partie aérienne (feuilles et fleurs) par hydro distillation dans un appareil de type Clevenger (Fig. 27) (Clevenger, 1928). Cet appareil est constitué d'un ballon en verre pyrex où l'on place la matière végétale sèche et l'eau distillée, d'une chauffe ballon qui permet la distribution homogène de la chaleur dans le ballon, d'une colonne de condensation de la vapeur (réfrigérant) qui vient de l'échauffement du ballon, d'une ampoule qui reçoit les extraits de la distillation et d'un robinet à partir duquel on récupère l'huile essentielle dans des capsules en verres.



Figure 18: Appareil d'hydro distillation de type Clevenger
(Photo originale, 2020)

I.2.2.2.2. Extraction par hydro distillation

Cette méthode d'extraction consiste à mettre 25 g de la plante sèche de *G. rosat* (Fig. 28) dans un ballon disposé sur chauffe ballon puis additionner 500 ml de l'eau distillée (Fig. 29). L'ensemble est porté à ébullition pendant 3 heures (Fig. 30). Les substances volatiles chargées par les huiles essentielles présentes dans la plante sont entraînées par la vapeur d'eau puis traversent un réfrigérant et se condensent. La vapeur condensée obtenue conduit à une phase organique (huile essentielle) qui est séparée de l'hydrolat par décantation (Fig. 31). Les huiles essentielles sont récupérées à l'aide d'une micro-seringue dans des éppendorffs (Fig. 32). Ainsi, la quantité des huiles obtenues est pesée pour le calcul du rendement.



Figure 19: Pesage de 25 g de G. rosat
(Photo originale, 2020)



Figure 20: Additionnement de l'eau distillée
(Photo originale, 2020)



Figure 21: Ebullition de G. rosat avec
de l'eau distillée
(Photo originale, 2020).



Figure 22: Décantation pour séparer les
huiles essentielles de l'hydrolat
(Photo originale, 2020).



Figure 23: Récupération des huiles essentielles dans des éppendorffs (**Photo originale, 2020**).

I.2.2.3. Conservation des huiles essentielles

Les huiles essentielles de *G. rosat* ainsi obtenues par hydro distillation ont été conservées dans des éppendorffs fermés hermétiquement et bien couverts avec du papier aluminium au niveau d'un réfrigérateur à une température de 4°C jusqu'à leur utilisation (Fig. 33).



Figure 24:Éppendorffs contenant des huiles essentielles de *G. rosat* conservés au réfrigérateur (**Photo originale, 2020**).

I.2.3. Détermination du rendement en huiles essentielles

Le rendement en huiles essentielles est le rapport de la quantité d'huile recueillie après distillation sur la quantité de la matière végétale sèche utilisée, exprimée en pourcentage (Laib, 2012 ; Adjou et Soumanou, 2013).

$$R_{HE}(\%) = (M_{HE} / M_{MV}(\text{sec}) \times 100$$

R_{HE}: Rendement en HE en pourcentage (%)

M_{HE}: Masse de l'huile essentielle récupérée en gramme (g)

M_{MV} (sec) : Masse de la matière végétale sèche en gramme (g)

I.2.4. Evaluation de la cinétique d'extraction

Lors de cette étude, un suivi cinétique a été réalisé sur l'extraction des huiles essentielles de *G. rosat* par hydro distillation. La durée d'extraction est théoriquement le temps nécessaire à la récupération de la totalité de l'huile essentielle contenue dans la matière végétale. Cependant, et pratiquement, il est difficile d'extraire la quantité complète de l'huile essentielle. Ce temps correspond alors au moment pour lequel nous n'observons plus d'huile dans le distillat, il détermine la fin du processus (Mosta, 2006).

I.2.5. Mise en évidence du potentiel antifongique des huiles essentielles

I.2.5.1. Cueillettes des oignons

Les bulbes d'oignon infectés par *A. niger* et présentant des symptômes de moisissure noire ont été ramenés de la chambre de stockage de Aja de Khemis Miliana. Ces échantillons ont été mis dans des sachets et portés directement au laboratoire (Fig. 34).



Figure 25: Bulbes d'oignon présentant des symptômes de moisissure noire (Photo originale, 2020).

I.2.5.2. Identification microscopique

L'identification du champignon a été réalisée par un examen microscopique. A partir d'un bulbe d'oignon contaminé, une quantité du mycélium a été prélevée et mise entre lame et lamelle avec une goutte d'eau distillée, puis observée au microscope optique à l'objectif 40. La détermination de l'espèce de moisissure a été faite tout en se basant sur les caractéristiques du mycélium et des fructifications en s'aidant des clés de détermination de **Zillinsky (1983)**, **Botton et al. (1990)**, **Lepoivre (2003)** et **Nasraoui (2006)**.

I.2.5.3. Isolement et repiquage

I.2.5.3.1. Choix du milieu de culture

Le milieu de culture choisi dans notre expérimentation pour assurer la croissance de l'espèce fongique au laboratoire était le *Potato Dextrose Agar* (PDA : pomme de terre glucosée et gélosée) (Annexe, 01) est un milieu très recommandé pour la culture des champignons. Il est caractérisé par sa clarté, ce qui facilite l'observation de la croissance des champignons dans la boîte de Pétri (**Botton et al., 1990 ; Agrios, 2005**).

I.2.5.3.2. Préparation du milieu PDA

Pour la préparation du milieu PDA, nous avons mis dans un ballon 1l de l'eau distillée, 200 g de pommes de terre coupées en dés, 20 g d'Agar en poudre et 20 g de dextrose (Annexe 01).



Figure 26: Milieu PDA préparé dans un flacon (Photo originale, 2020)

I.2.5.3.3. Isolement

L'isolement consiste à ensemencer une quantité du mycélium prélevé d'oignon contaminé par la pourriture noire en surface du milieu PDA coulé au préalable dans des boîtes de Pétridans la zone de protection (jusqu'à 18cm autour du bec Bunsen) (Fig. 36). Par la suite, les boîtes sont maintenues à l'étuve (Fig. 37) à une température de 28 C° pendant 7 jours.



Figure 27: Isolement et ensemencement
Surface du milieu PDA
(Photo originale, 2020)



Figure 28: Etuve utilisée pour l'incubation
mycélium prélevé de l'oignon du
Photo originale, 2020)

I.2.5.3.4. Repiquage et purification

L'étape de purification nous permis d'éliminer tout les microorganismes se développant dans les boites de Pétri à l'exception de ceux désirés.

A partir des boites de Pétri ensemencées précédemment et dans des conditions aseptiques, un échantillon du feutrage mycélien a été prélevé à l'aide d'une anse stérile et repiqué sur une autre boite de Pétri contenant le milieu PDA (Fig. 38). Ensuite, les boites ont été incubées à l'étuve à une température de 28C° pendant 7 jours. Cette opération a été répétée jusqu'à l'obtention des colonies pures d'*A. niger*.

A chaque fois et avant de réaliser l'ensemencement, une observation microscopique a été faite afin de repiquer que les colonies voulues (Fig. 39).



Figure 29: Boîtes de Pétri utilisées pour le repiquage du mycélium
(Photo originale, 2020)

Figure 30: Observation microscopique des colonies fongiques
(Photo originale, 2020)

I.2.5.4. Evaluation du potentiel antifongique

La réalisation de l'étude de l'activité antifongique des huiles essentielles de *G. rosat* vis à vis de la moisissure *A. niger* a été faite par la méthode de contact direct qui permet la mise en évidence de l'activité antifongique (fongistatique ou fongicide) des huiles essentielles (Fandohan *et al.*, 2005).

I.2.5.4.1. Préparation des différentes concentrations

Pour préparer les différentes concentrations utilisées dans le test antifongique, des quantités des huiles essentielles de *G. rosat* (25, 125 et 250 μ l) ont été mises par une micropipette dans des flacons (Fig. 40 a et b) et ajustées à 50 ml par le milieu PDA (Fig. 40 c). Par la suite, le contenu a été agité durant 5 minutes pour homogénéiser le milieu PDA avec l'huile essentielle (Fig. 40 d).



Figure 31: Préparation des différentes concentrations des huiles essentielles pour le test antifongique (**Photos originales, 2020**)

a : Prélèvement d'une quantité des huiles essentielles

b : Dépôt des huiles essentielles dans un flacon

c : Ajustement par le milieu PDA

d : Agitation du contenu du flacon

I.2.5.4.2. Application des disques mycéliens

Un volume de 15 ml de mélange préparé au préalable (PDA + Huile essentielle) a été coulé dans des boîtes de Pétri (Fig. 41a). Après le refroidissement et la solidification du mélange sur la paillasse au près du bec Bunsen, des disques mycéliens de 5 mm de diamètre issues de la marge d'une culture âgée de 7 jours (Fig. 41 b) ont été prélevés avec un emporte-pièce et déposés, à la surface, au centre de chaque boîte de Pétri (1 disque / boîte) (Fig. 41 c). Chaque concentration a été répétée trois fois. Les boîtes ont été incubées dans l'obscurité à une température de 28°C pendant 72 heures. Le témoin a été réalisé dans les mêmes conditions sans huiles essentielles.

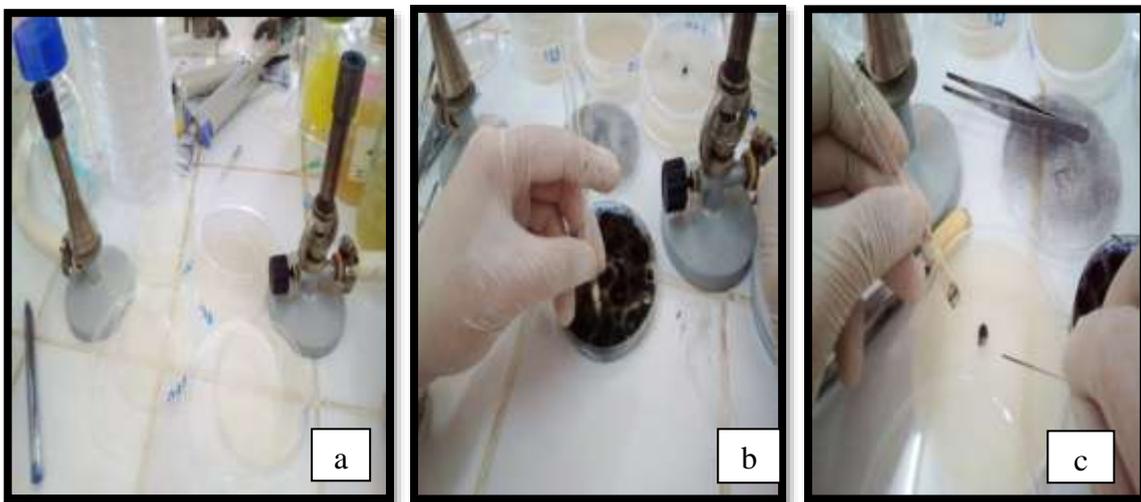


Figure 32: Application des disques mycéliens (**Photos originales, 2020**)

a : Coulage du mélange (PDA+huile essentielle) dans des boîtes de Pétri

b : Prélèvement du disque mycélien avec un emporte-pièce

c : Dépôt des disques mycéliens prélevés à la surface, au centre de la boîte de Pétri

I.2.6. Evaluation de la croissance mycélienne

La croissance mycélienne a été évaluée quotidiennement jusqu'au 7^{ème} jour en mesurant le diamètre des colonies mycéliennes évoluées dans les boîtes de Pétri. Cette lecture a été réalisée en comparaison avec les cultures témoins qu'elles étaient démarrées le même jour et dans les mêmes conditions.

Toute pousse même légère du champignon sera considérée comme action négative c'est-à-dire que l'huile essentielle en question n'est pas inhibitrice vis-à-vis de la croissance fongique.

I.2.7. Calcul du taux d'inhibition (TI)

Les taux d'inhibition de la croissance fongique par rapport au témoin ont été calculés selon la formule cidessous (**Doumbouya et al., 2012**) :

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

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

dC : Diamètre de colonies dans les boites du témoin - ddi (mm)

dHE : Diamètre de colonies dans les boites contenant l'huile essentielle - ddi (mm)

ddi : Diamètre du disque initiale (3mm).

I.2.8. Détermination de l'indice antifongique (IA)

L'indice antifongique est par définition la concentration en huiles essentielles qui inhibe 50% de la croissance mycélienne. Il a été déterminé en appliquant la formule suivante (**Chang et al., 1999**) :

$$IA = (1 - Da / Db) \times 100$$

IA : Indice antifongique

Da: Diamètre de la zone de croissance de l'essai

Db: Diamètre de la zone de croissance du témoin

I.2.9. Calcul de la vitesse de croissance mycélienne (VC)

La vitesse de la croissance mycélienne pour chaque concentration a été déterminée comme suit (Cahagnier et Molard, 1998) :

$$VC = [D1 / Te 1] + [(D2 - D1) / Te 2] + [(D3 - D2) / Te 3] + \dots + [(Dn - Dn-1) / Ten]$$

- VC : Vitesse de croissance mycélienne
- D: Diamètre de la zone de croissance de chaque jour (mm)
- Te: Temps d'incubation (jour)

Chapitre II :

Résultats et discussions



Chapitre II : Résultats et discussions

II.1. Propriétés organoleptiques des huiles essentielles de *Géranium rosat*

L'hydro distillation de la partie aérienne (feuilles et fleurs) de *Géranium rosat* a permis d'extraire des huiles essentielles de couleur jaune (Fig. 42) avec une odeur prononcée de rose et légèrement citronnée (Tableau 03).



Figure 33: Huiles essentielles de *G. rosat* obtenues par hydro distillation (**Photo originale, 2020**)

Tableau 03: Caractéristiques organoleptiques de l'HE de *G. rosat*

Huiles essentielles de <i>G. rosat</i>	Propriétés organoleptiques		
	Aspect	Couleur	Odeur
Notre étude (2020)	Liquide, limpide	Jaunâtre	Légèrement citronnée, rosée
AFNOR(2000)	Liquide mobile, limpide	Jaune ambré à jaune verdâtre	Rosée, ±menthée

D'après le tableau cité ci-dessus, on peut déduire que les caractéristiques organoleptiques de nos huiles essentielles sont les mêmes que celles répertoriés dans les normes **AFNOR (2000)**.

II.2. Rendement en huiles essentielles

Le rendement en huiles essentielles calculé après extraction par hydro distillation de la partie aérienne de *G. rosat* était de 0.25% (Tableau 04).

Tableau 3:Rendement en huiles essentielles extraites de *G. rosat*

<i>G. rosat</i>	Quantité
Biomasse sèche	1389g
Huile essentielle	3.5g
Rendement	0.25%

Le rendement en huiles essentielles de *G. rosat* était de l'ordre de 0.25 %. Ce taux est relativement élevé comparé à ceux rapportés par d'autres études (Tableau 05). Cela peut être expliqué par la différence en période de collecte des échantillons et d'extraction des huiles essentielles de *G. rosat*. Pour notre étude, ces étapes ont été réalisées en pleine floraison qui est caractérisée par une photopériode optimale propice à une biosynthèse importante des huiles essentielles.

tableau 4:Rendement en HE de *G. rosat* selon certaines études

Références	Demarne (1989)	Shawl (2006)	Mosta (2006)	Notre étude (2020)
Pays (Année)	Réunion (1989)	Inde (2006)	Afrique du Sud (2006)	Algérie Tissemsilte (2020)
Rendement (%)	0,08-0,16	0,22	0,25	0.25

Le rendement élevé, que nous avons obtenu, pourrait être dû non seulement à la période de récolte de la plante mais également à l'intervention d'une multitude de facteurs

comme l'entretien réservé aux plantes, les écartements entre plants (**Rajeswara, 2002**), le désherbage (**Rodolfo et al., 2006**), ainsi que l'arrosage régulier (**Boira et Blanquer, 1998**). En plus, le rendement en huiles essentielles est influencé par plusieurs paramètres, tels que la température, l'humidité relative, la durée totale d'insolation, le régime des vents, l'espèce végétale et même l'organe végétal, les pratiques culturales et le procédé d'obtention des huiles essentielles surtout chez les espèces qui possèdent des structures histologiques de stockage superficielles comme les pélargoniums odorants (**Demarne, 1985**).

II.3. Cinétique d'extraction

La variation du rendement en huile essentielle parvenues de l'extraction par hydro distillation de *G. rosaten* fonction du temps est illustrée par la figure 43.

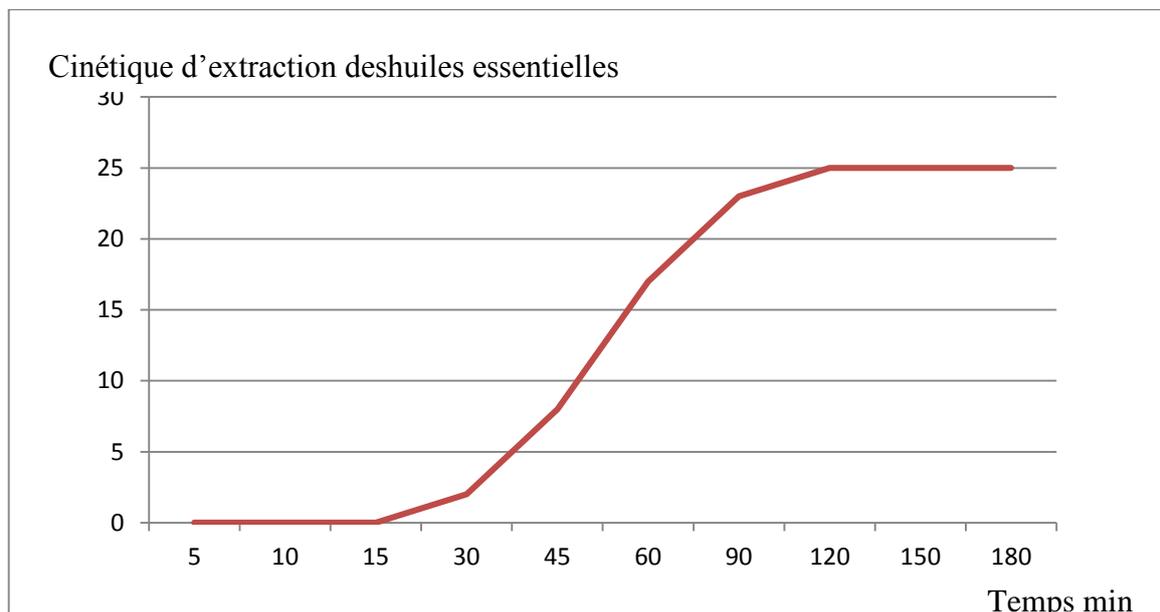


Figure 34: Cinétique d'extraction des huiles essentielles de *G. rosat* en fonction du temps (Photo originale, 2020)

La figure précédente montre clairement l'allure générale attendue d'une courbe classique de la cinétique d'extraction. D'après cette allure on peut distinguer trois différentes parties d'extraction :

- Dans la première partie (de 00 à 15mn), nous observons un palier où le rendement est nul. Cette étape correspond à la phase de chauffage de la matière végétale.

- La seconde phase (de 15 à 120mn) correspond à un saut marqué en quantité des huiles essentielles récupérées. Elle représente la phase d'accélération où l'extraction est rapide à cause de la diffusion externe. La pente de cette partie montre la facilité de l'extraction.

- Enfin, au cours de la troisième étape (à partir de 120mn), la courbe tend vers un second palier qui correspond au rendement maximum possible à atteindre de la plante et à la fin de l'extraction donc à une phase plus lente due à l'épuisement des huiles essentielles de la plante.

Dans le cas des *G. rosat* où les structures sécrétrices sont superficielles, la membrane externe ou la cuticule qui constitue la seule barrière à la libération des huiles essentielles, est vite rompue à ébullition. Les composés volatils sont aussitôt évaporés d'où la courte durée pour atteindre le pic cumulatif lors de l'extraction. Lorsque les essences sont sous-cutanées, elles doivent d'abord diffuser à travers l'épaisseur du tissu végétal avant d'entrer en contact avec l'eau ou sa vapeur. Elles seront alors lentement évaporées en comparaison avec les structures sécrétrices superficielles (Mosta, 2006).

II.4. Identification de l'espèce fongique

II.4.1. Description macroscopique

L'observation des boîtes de Pétriensemencées par le champignon prélevé de l'oignon contaminé par la pourriture noire a révélé la présence de colonies de moisissures noires atteignant 4 à 5 mm de diamètre et cela après 7 jours d'incubation à 28°C sur milieu PDA (Fig. 44). Les colonies étaient d'abord blanches et translucides (environ 3 jours d'incubation) puis deviennent noires et opaques en sporulant. Les colonies ont présenté des diamètres irréguliers avec un aspect poudreux et gonflé.



Figure 35: Colonies noires d'*Aspergillus niger* sur milieu PDA après 7 jours d'incubation (Photo originale, 2020)

Les caractéristiques macroscopiques du champignon isolé dans notre étude correspondent bel et bien à celle d'*Aspergillus niger* selon la bibliographie (Ayesha et al., 2003). On peut alors conclure que le champignon isolé de l'oignon collecté de la chambre de stockage d'Aja de Khemis Miliana était bien *Aspergillus niger*.

II.4.2. Description microscopique

L'observation microscopique du mycélium prélevé des colonies de moisissures noires développées sur milieu PDA après 7 jours d'incubation a montré la présence d'un appareil végétatif constitué de filaments (hyphes formant les conidiophores). A l'extrémité des filaments se trouvent des bourgeonnements globuleux ou têtes conidiennes de couleur brun rouge très sombre à noir. Les spores exogènes ou conidies, de petite taille, sont disposées en chaînette. Elles sont globuleuses et brunes (Fig. 45).

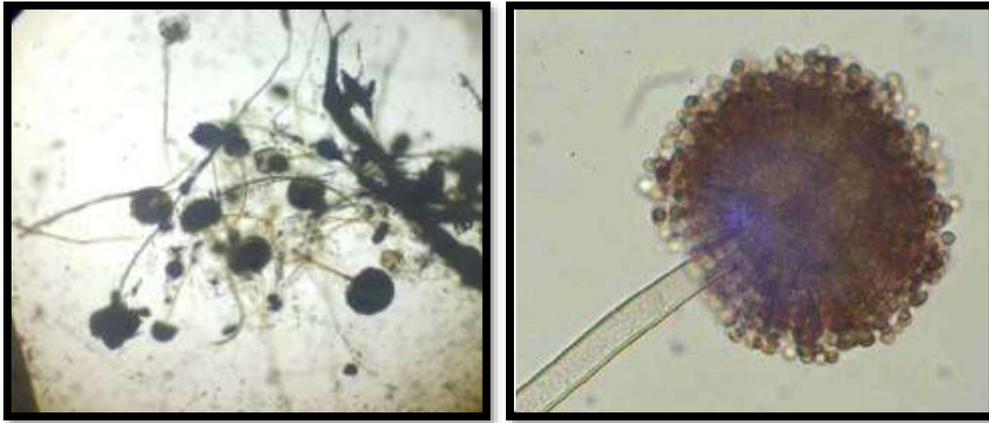


Figure 36: Aspect microscopique d'*A. niger* (à gauche : observation au GX40, à droite : observation au GX100) (Photos originales, 2020).

Les caractéristiques microscopiques des moisissures noires développées sur milieu PDA après 7 jours d'incubation rappellent celles d'*Aspergillus niger* selon la clé d'identification des champignons de Zillinsky (1983), Botton *et al.* (1990), Lepoivre (2003) et Nasraoui (2006) et selon celles citées en bibliographie par Diguta (2010), Anand (2016) et Dijksterhuis et Wösten (2013). On peut alors confirmer que le champignon parvenu des oignons infectés par la pourriture noire collectés de la chambre de stockage d'Aaja de Khemis Miliana est bien *Aspergillus niger*.

II.5. Potentialités antifongiques des huiles essentielles de *Géranium rosat* vis-à-vis d'*Aspergillus niger*

II.5.1. Croissance mycélienne

La croissance mycélienne d'*A. niger* sur milieu PDA contenant les différentes doses des huiles essentielles de *G. rosat*, a été évaluée quotidiennement en mesurant les diamètres de colonies fongiques à l'aide d'une règle graduée. Les résultats sont mentionnés dans le tableau 06 puis illustrés par les figures 46 et 47.

Tableau 5: Diamètres (en cm) de la croissance mycélienne d'*A. niger* en fonction du temps d'incubation et de la concentration en huile essentielle de *G. rosat* durant les 7 jours d'incubation

Jour \ Dose (HE)	1	2	3	4	5	6	7
D0 (Témoin)	1.5	3	3,9	5	7	8,9	9
D1 (25ul)	1	1,7	3,3	4,5	6,1	7,1	8,5
D2 (125ul)	0	0	0	0	0	0	0
D3 (250ul)	0	0	0	0	0	0	0

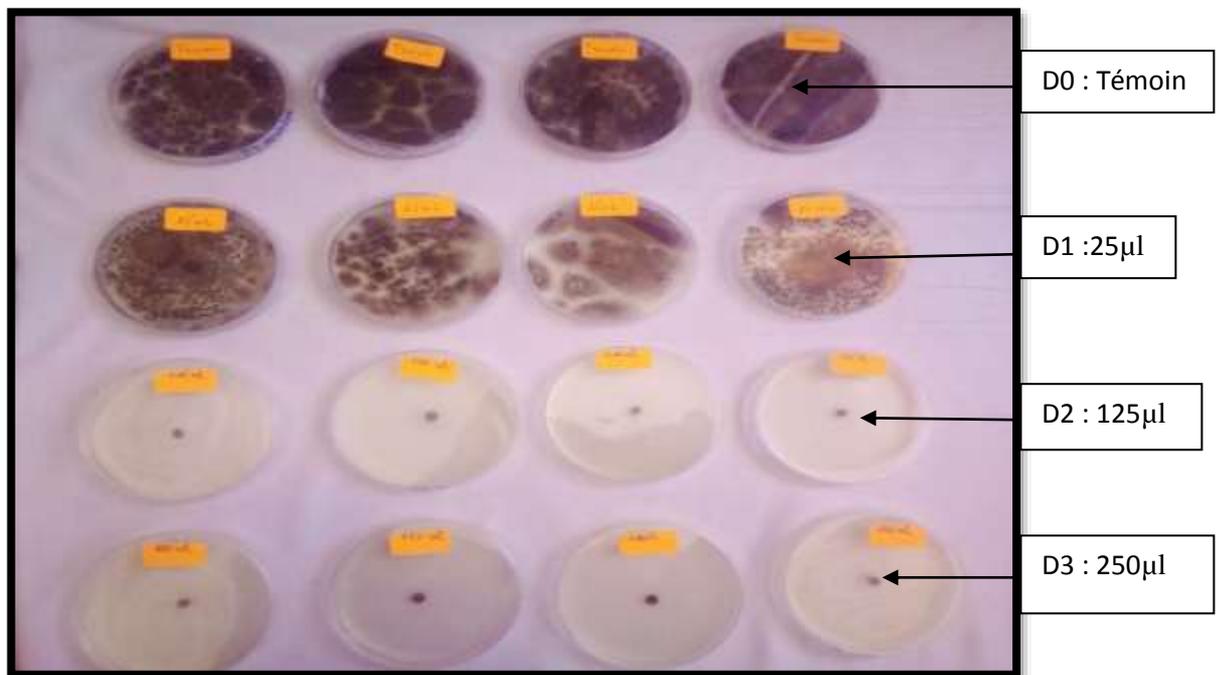


Figure 37 : Croissance d'*A. niger* sur milieu PDA après 7 jours d'incubation avec les différentes doses des huiles essentielles de *G. rosat* (Photo originale, 2020).

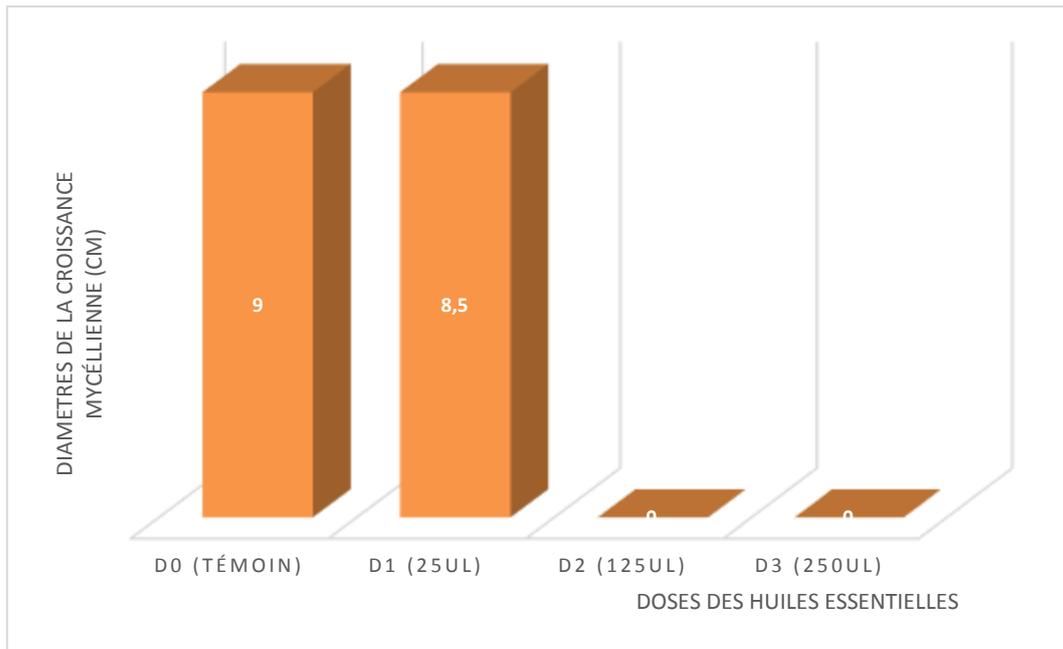


Figure 38: Diamètres de la croissance mycélienne d'*A. niger* en fonction de la concentration en huile essentielle de *G. rosat* après 7 jours d'incubation

Le tableau et les figures présentés ci-dessus montrent une diminution dans les diamètres de la croissance mycélienne en parallèle avec l'augmentation des doses des huiles essentielles. Ainsi, pour les boîtes témoins (D0), la croissance d'*A. niger* était très importante. Pour la D2 (125 μ l) et la D3 (250 μ l), on a enregistré une inhibition totale (100%) de la croissance mycélienne. Alors que pour la D1 (25 μ l) la croissance mycélienne était légèrement faible. Aussi, pour la D0 et la D1, les diamètres de croissance ont été évolués progressivement et en parallèle en fonction du temps d'incubation.

Selon nos résultats, on peut dire que les huiles essentielles de *G. rosat* ont exercé un effet antifongique important sur la moisissure *A. niger* vu qu'elles ont empêché fortement son développement (D2 et D3).

Plusieurs travaux ont étudié l'effet et le mode d'action des huiles essentielles sur les champignons. Ainsi, selon **Giordani et Kaloustian (2006)**, l'action antifongique des huiles essentielles s'explique par 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 du champignon. 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 champignons (**Sharma et Tripathi., 2006**).

II.5.2. Taux d'inhibition (TI)

Les taux d'inhibition de la croissance fongique par rapport au témoin ont été calculés selon la formule de **Doumbouya et al. (2012)**. Les résultats obtenus sont mentionnés dans le tableau 07 ensuite présentés par la figure 48.

Tableau 6: Taux d'inhibition (TI) de la croissance d'*A. niger* en fonction des différentes doses des huiles essentielles de *G. rosat*

Doses (HE)	TI
D0 (Témoin)	00%
D1 (25ul)	05,74%
D2 (125ul)	100%
D3 (250ul)	100%

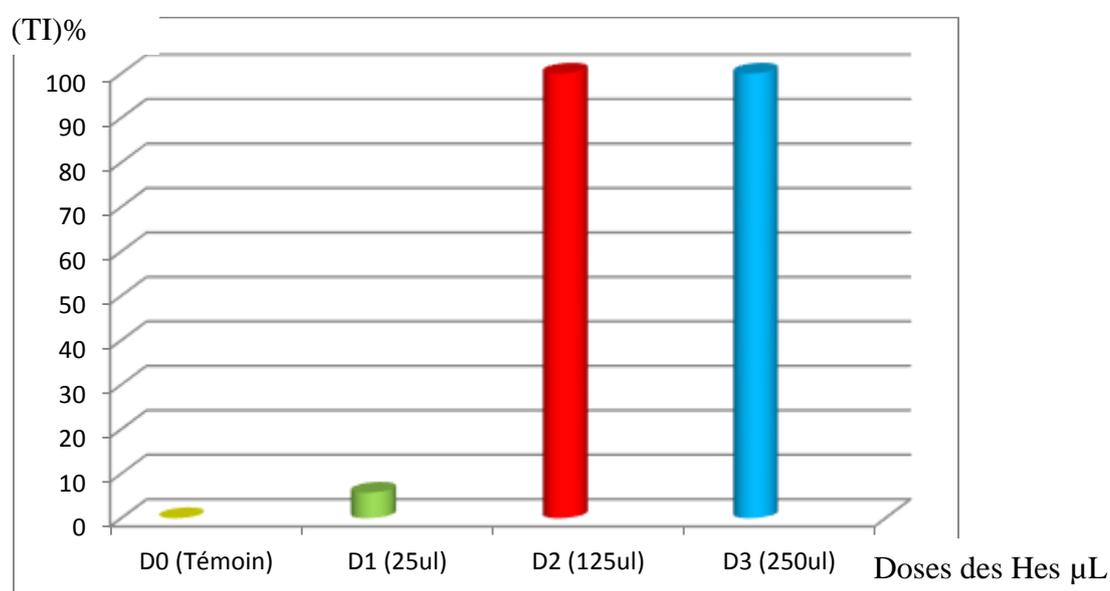


Figure 39: Taux d'inhibition (TI) de la croissance d'*A. niger* en fonction des différentes doses des huiles essentielles de *G. rosat*

Les taux d'inhibition (TI) de la croissance d'*A. niger* ont augmenté progressivement en fonction des différentes doses des huiles essentielles de *G. rosat*. Ils étaient de 00% pour le témoin, 5,74% pour la D1 et 100% pour la D2 et la D3. Ce cas de figure nous permis dedéduire que la souche fongique testée (*A. niger*) est très sensible aux huiles essentielles étudiées (*G. rosat*).

Les concentrations des huiles essentielles du *G. rosat* (125ul, 250ul) appliquées sur la souche fongique *A. Niger* ont empêché complètement sa croissance (TI : 100%). Ces résultats sont dus selon **Uribe et al. (1985)** aux dommages membranaires sévères, à l'inhibition de la respiration et à la perte d'homéostasie provoquées par les huiles essentielles d'où la mort cellulaire ou l'inhibition totale de la croissance mycélienne.

Les principaux composants de l'huile essentielle de *G. rosat* : le géraniol et le citronellol ont montré, in vitro, leurs actions antifongiques propres et synergiques avec combinaison de kétoconazole sur la classe des *Trichophytos* et notamment *T. soudanense* et *T. sclzoenleinii*(**Shin et Lim, 2007**).Une étude a montré des taux d'inhibition intéressants du géraniol et du citronellol en association avec de l'amphotéricine B et du kétoconazole sur la souche d'*A. niger*(**Willson et al., 1997 ; Shin, 2003 ; Willem, 2004 ; Janin, 2006**).

II.5.3. Indice antifongique (IA)

Les résultats du calcul de l'indice antifongiquesont cités dans le tableau 08puis montrés par la figure 49.

Tableau 7:Indice antifongique (IA) des huiles essentielles de *G. rosat* calculé après 7 jours d'incubation d'*A.niger*

Dose (HE)	IA
D0 (Témoin)	00%
D1 (25ul)	06%
D2 (125ul)	100%
D3 (250ul)	100%

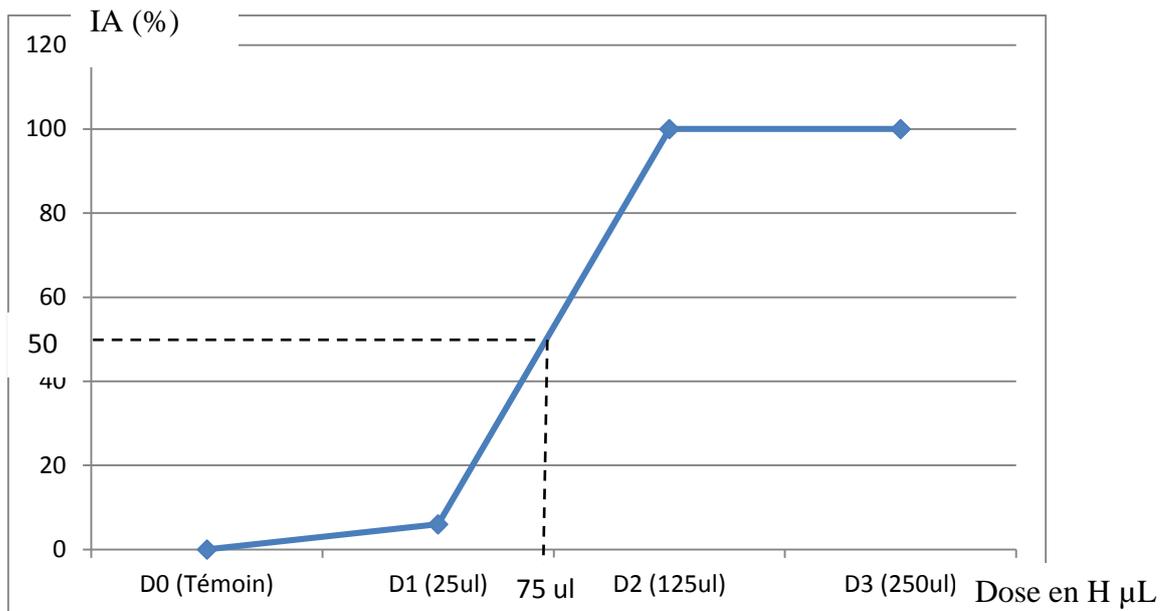


Figure 40: Indice antifongique (IA) des huiles essentielles de *G. rosat* calculé après 7 jours d'incubation d'*A.niger*

D'après le tableau 08 et la figure 49, on déduit que les indices antifongiques s'augmentent parallèlement avec l'augmentation de la concentration des huiles essentielles de *G. rosat*. Il varie de 00% pour la D0 (Témoin), 6% pour la D1 et 100% pour la D2 (125ul) et la D3 (250ul).

L'indice antifongique est par définition la concentration en huiles essentielles qui inhibe 50% de la croissance mycélienne (**Chang et al., 1999**). Donc, et par projection sur l'axe des doses (Fig. 49) la concentration qui inhibe 50%de la croissance mycélienne est de 75ul.

II.5.4. Vitesse de croissance mycélienne (VC)

L'évolution quotidienne de la croissance mycélienne d'*A. niger* traité par les différentes concentrations des huiles essentielles de *G. rosat* durant les 7 jours d'incubation est présentée par les figures 50, 51, 52 et 53. Le calcul de la vitesse de cette croissance fongique est illustré par la figure 54.

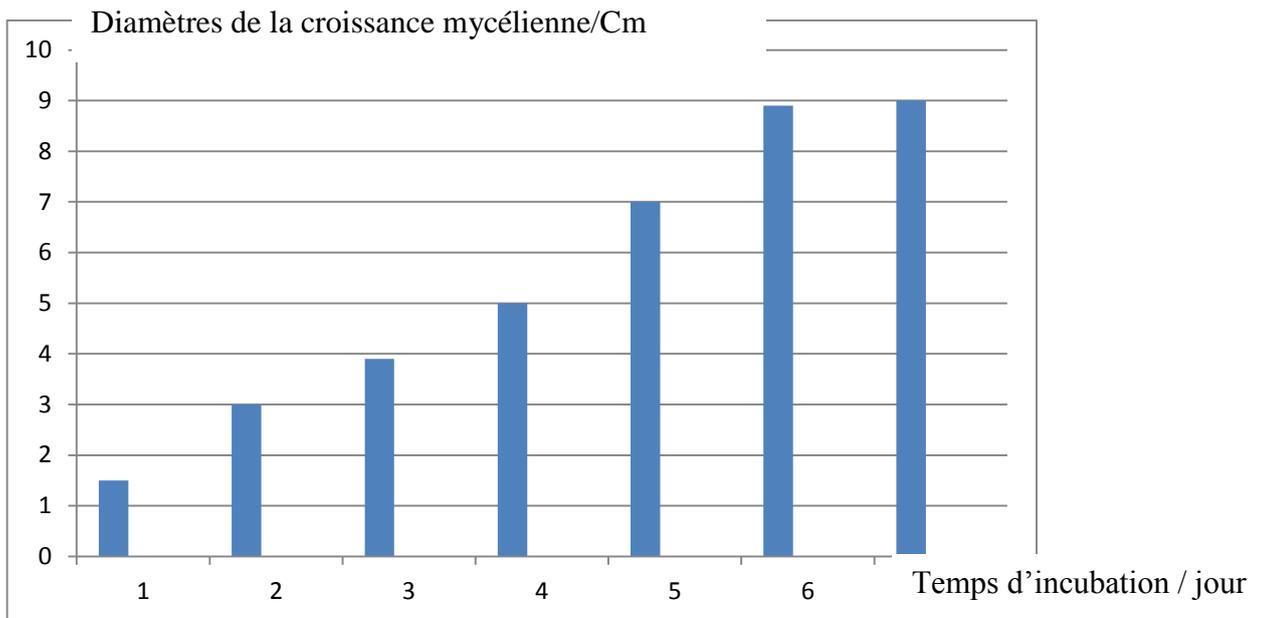


Figure 41: Evolution de la croissance mycélienne d'*A. niger* en fonction du temps d'incubation pour la D0 (Témoin).

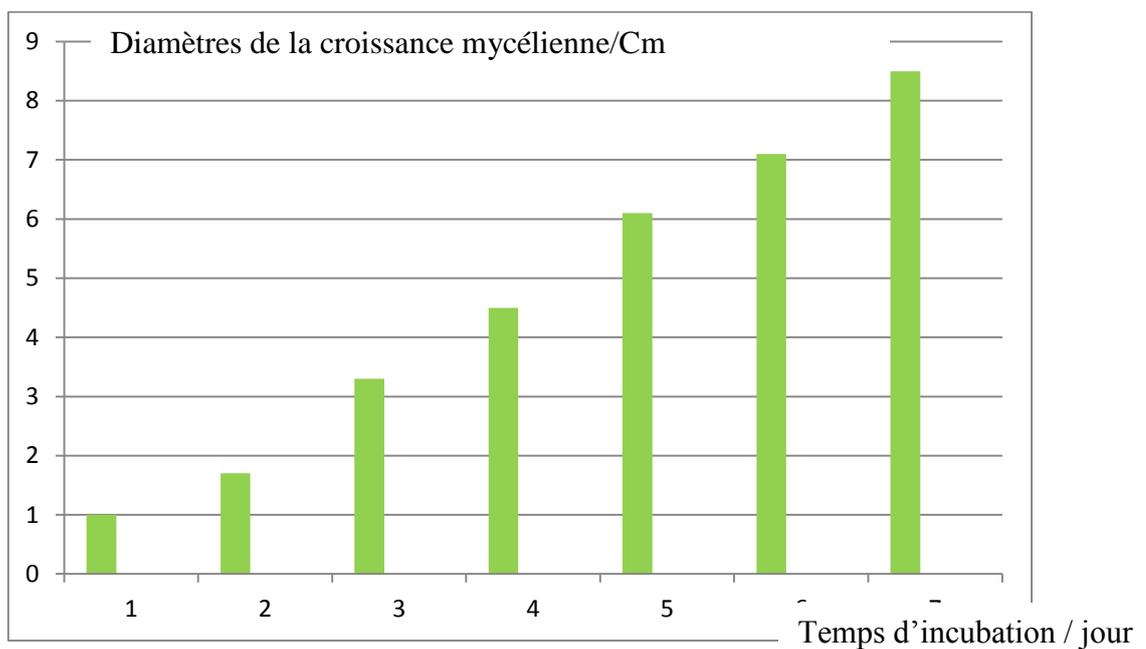


Figure 42: Evolution de la croissance mycélienne d'*A. niger* en fonction du temps d'incubation pour la D1 (25ul).

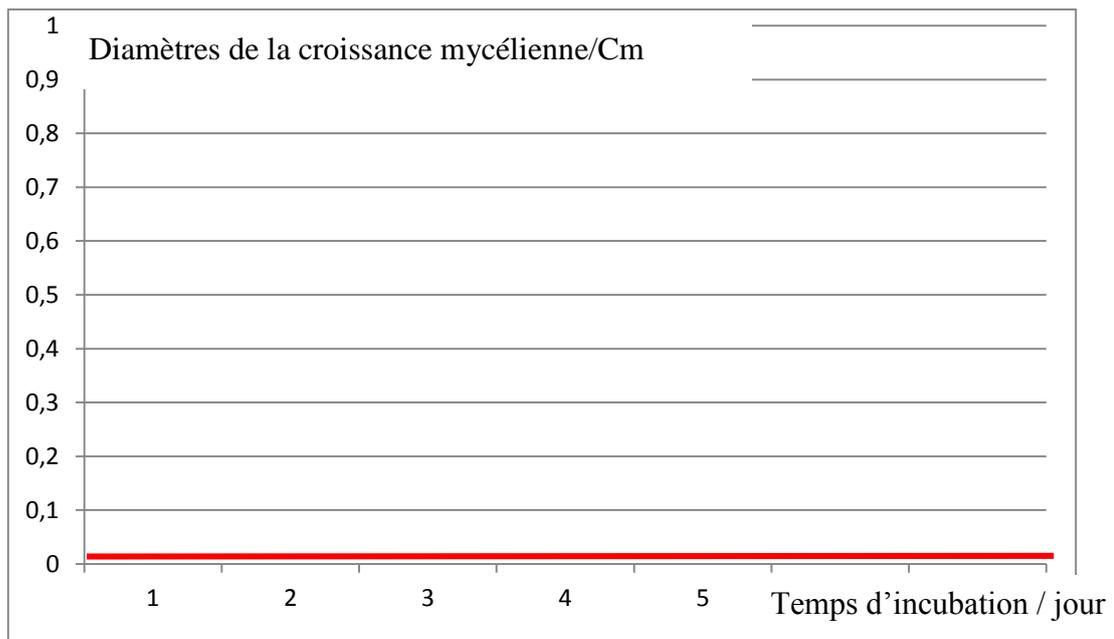


Figure 43: Evolution de la croissance mycélienne d'*A. niger* en fonction du temps d'incubation pour la D2 (125ul)

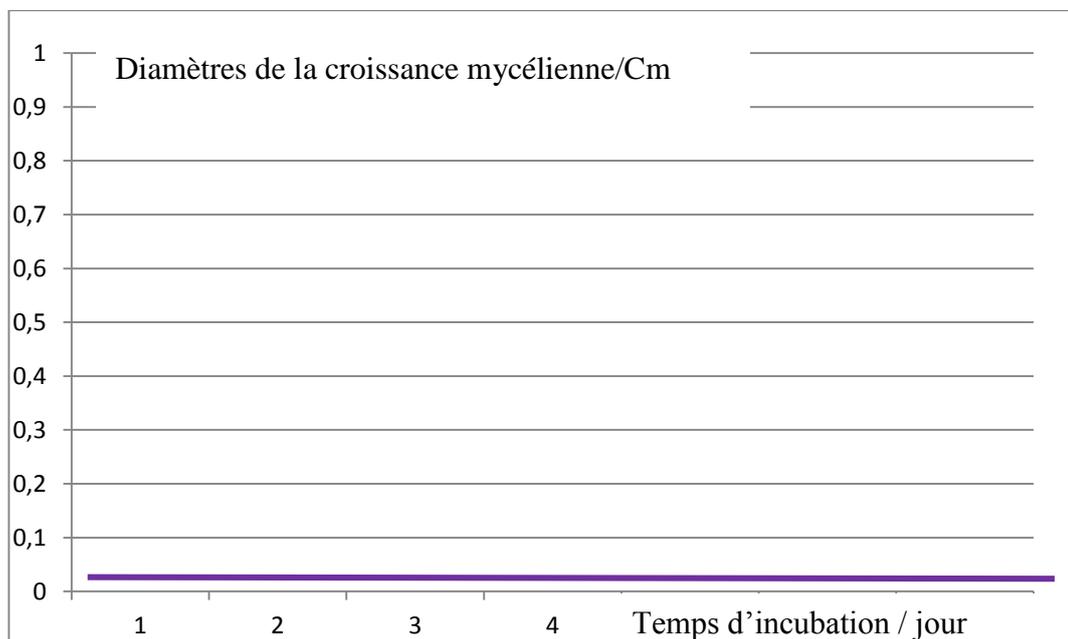


Figure 44: Evolution de la croissance mycélienne d'*A. niger* en fonction du temps d'incubation pour la D3 (250ul)

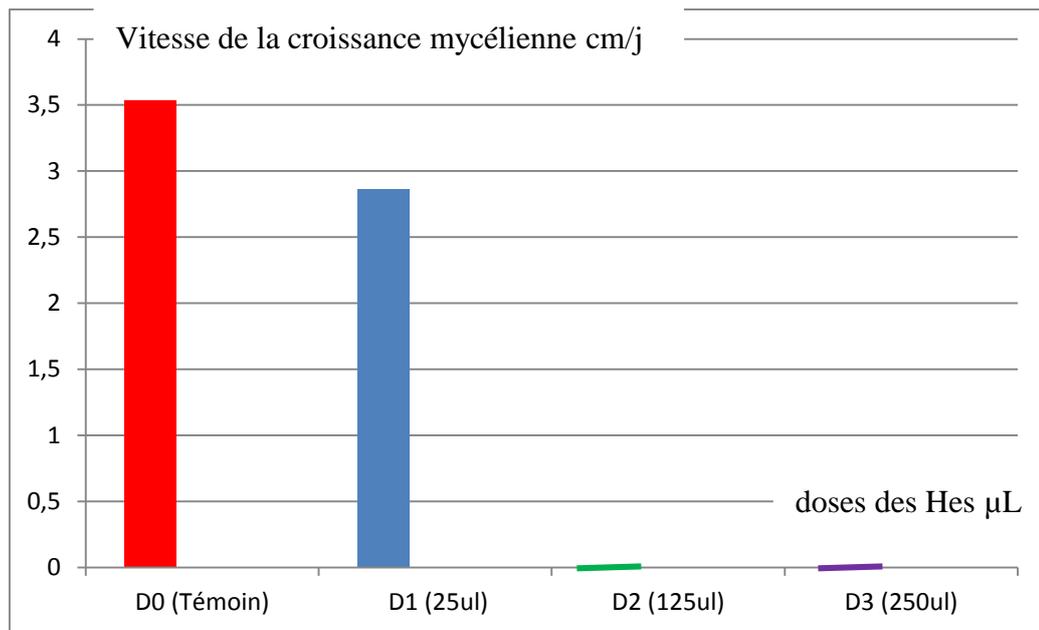


Figure 45: Vitesse de la croissance mycélienne d'*A. niger* en fonction des doses des huiles essentielles de *G. rosat* durant 7 jours d'incubation

La croissance mycélienne d'*A. niger* augmente avec le temps d'incubation et diminue avec l'augmentation de la concentration en huiles essentielles de *G. rosat*. Pour la D0 et la D1, les diamètres de la croissance enregistrés ont évolué de 1,5cm et 1cm le premier jour jusqu'à 9cm et 8,5cm le septième jour, respectivement. Tandis que pour la D2 et la D3, la croissance mycélienne était nulle(00cm) durant toute la période d'incubation. Ainsi, la vitesse de la croissance fongique était importante (3,54cm/j) pour le témoin (D0 sans huiles essentielles), puis elle a diminué (2,86cm/j) suite à l'application des huiles essentielles (D1) pour s'estomper complètement (00cm/j) pour la D2 et la D3. On peut dire alors que les huiles essentielles de *G. rosat* sont très efficaces contre la souche fongique *A. niger*.

La différence du pouvoir antifongique des concentrations des huiles essentielles de *G. Rosat* peut être attribuée à leurs compositions chimiques. En effet, aux molécules qui possèdent un très large spectre d'activité antimicrobienne et qui sont naturellement présents dans les essences de la plupart des espèces de *Géranium*.

II.5.5. Discussions

Les huiles essentielles de *G. rosat* testées à différentes concentrations à l'égard des colonies de la moisissure *A. niger* responsable de la pourriture noire de l'oignon ont révélé des potentialités antifongiques très intéressantes. Elles ont provoqué une inhibition de la croissance mycélienne à partir de la dose 25 µl (D1). Cette inhibition était complète avec les doses 125ul et 250ul (D2 et D3, respectivement).

Selon ces observations, on peut spéculer que la forte activité antifongique observée chez les huiles essentielles de *G. rosat* revient à l'efficacité de ses composants chimiques. D'une manière générale, l'activité biologique d'une huile essentielle est à mettre en relation avec sa composition chimique, les groupes fonctionnels des composés majoritaires (**Lahlou, 2004 ; 2005**) et les effets synergiques entre les composants (**Franchomme, 1981 ; Kurita et Koik, 1982 ; Gueldeneret al., 1985 ; Inouyet al., 2000 ; Burt, 2004 ; vinda-Martoset al., 2008**). Ainsi la nature des structures chimiques qui la constituent, mais aussi leurs proportions jouent un rôle déterminant (**Pibiri, 2006**). Un des facteurs intervenant sur l'intensité de l'action antifongique de l'huile essentielle est la dose appliquée : ceci a été généralement observé in vitro (**Do Amaral et al., 1998; Evans et Martin, 2000; Castillejos et al., 2006**). En effet, les composés majoritaires sont souvent responsables de l'activité antifongique de cette huile essentielle. **Giordani et al. (2008)**, ont supposé que la nature lipophile d'huile essentielle la rend plus observable par les mycéliums fongiques. De même que les composés phénoliques d'huile essentielle qui jouent un rôle important sur l'inhibition des enzymes fongiques contenant le groupement SH dans leur site actif (**Celimeneet al., 1999 ; Soyluet al., 2005**).

L'activité antifongique de l'huile essentielle de *G. rosat* est due à ses constituants majoritaires: alcools terpéniques (citronellol, géraniol, linalol) qui représentent environ 50,07% des constituants de cette huile, mais aussi à ses constituants minoritaires: oxydes, aldéhydes (géraniol, néral)(**Boukhatem, 2010**). En effet, les terpènes oxygénés sont des agents antimicrobiens très actifs (**Gueldeneret al., 1985 ; Faidet al., 1996 ; Griffin et al., 1999 ; Dormanet Deans, 2000 ; Kamran et al., 2001 ; Satraniet al., 2006**). Selon **Randrianarivelo (2008)**, les constituants minoritaires sont également connus pour leur activité antimicrobienne. Les esters peuvent contribuer à l'effet antimicrobien global des huiles essentielles (**Derwich et al., 2010**).

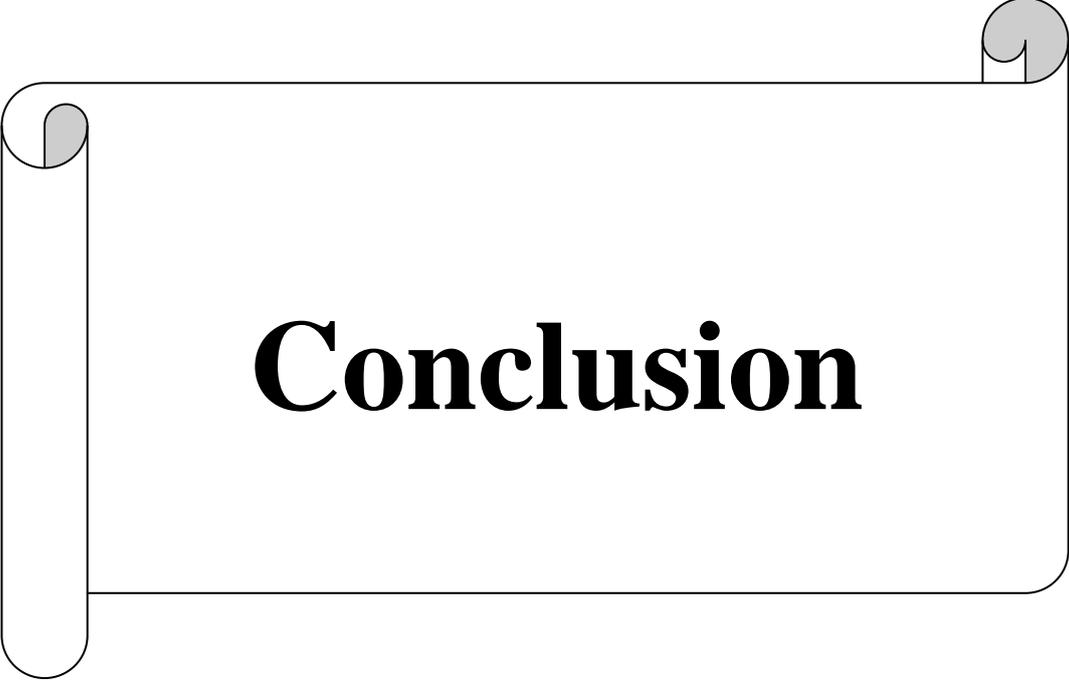
Les huiles essentielles de *G. rosat* ont montré une activité inhibitrice importante sur *A. Niger* et sur d'autres moisissures *Penicillium digitatum* et *P. expansum*. Certains travaux

relatent aussi le pouvoir fongicide puissant de l'huile essentielle de *G. rosat* d'Afrique (Kuritaet *al.*, 1981 ; Lis-Balchin et Deans, 1996 ; Lalliet *al.*, 2008), ce qui est aussi en accord avec les investigations de plusieurs auteurs qui ont montré que, pour les huiles essentielles de plusieurs plantes médicinales, les moisissures sont plus sensibles que les autres microorganismes (Pellecueret *al.*, 1973, 1974 ; Benjilaliet *al.*, 1984 ; Kivanç et Ajjûl, 1986 ; Tantaoui-Elarki et Beraoud, 1994 ; Hammer et *al.*, 2003).

Les diamètres de la croissance mycélienne ont diminué en parallèle avec l'augmentation de la dose des huiles essentielles, ceci peut être dû à la présence de plus de composés actifs avec l'accroissement de la concentration en huile essentielle.

Les champignons ont montré une sensibilité accrue à l'augmentation de la concentration de l'huile essentielle dans leur milieu de culture où le diamètre de la colonie se réduit à chaque fois qu'on augmente la dose jusqu'à une inhibition totale où aucune croissance n'est observée (Boutarfaia et Benyahia, 2015).

Les huiles essentielles de *Géranium rosat* ont manifesté un très bon pouvoir antifongique vis-à-vis de *Fusarium poae* et *Fusarium sporotrichioides* qui sont avérés sensibles respectivement à des doses de 2.5 et 5 µl/ml (Gueldeneret *al.*, 1985 ; Faidet *al.*, 1996 ; Griffin et *al.*, 1999 ; Dormanet Deans, 2000 ; Kamran et *al.*, 2001 ; Satraniet *al.*, 2006).



Conclusion

Conclusion

Au cours de notre travail nous avons essayé de définir l'effet in vitro des huiles essentielles de *G. rosat* à l'égard de la souche fongique *A. niger* agent de la moisissure noire de l'oignon dans le but de rechercher des produits naturels qui peuvent substituer les produits chimiques utilisés en massif dans le traitement des maladies des plantes en générale et des maladies cryptogamiques en particulier qui dénoncés à cause de leurs effets néfastes sur l'environnement et la santé humaine.

Les huiles essentielles de *G. rosat* extraites par hydro distillation étaient jaunes avec une odeur prononcée de rose et légèrement citronnée. Elles ont donné un rendement de 0.25%.

L'observation macro et microscopique du champignon prélevé des oignons infectés par la moisissure noire ont permis d'identifier la souche fongique *A. niger*.

L'analyse des résultats relatifs à la croissance mycélienne d'*A. niger* soumis à l'action des différentes concentrations des huiles essentielles de *G. rosat* nous sont permis de constater que ces huiles essentielles ont exercé une action inhibitrice plus forte sur *A. niger* avec un taux d'inhibition de 100%. Une réduction dans la concentration des huiles essentielles a entraîné une diminution dans le pouvoir inhibiteur de celles-ci.

Les diamètres de la croissance mycélienne ont évolué progressivement en fonction de la durée d'incubation et ont diminué en parallèle avec l'augmentation de la concentration des huiles essentielles de *G. rosat*.

La plus haute vitesse de croissance mycélienne (3,54cm/j) a été enregistrée en absence des huiles essentielles (Témoin (D0)), puis elle a décroît jusqu'à l'inhibition totale (00cm/j) pour la D2 (125ul) et la D3 (250ul).

A l'instar de ces résultats nous pensons que les huiles essentielles de *G. rosat* possèdent une aptitude pour éliminer *A. Niger* et peuvent donc avoir des intérêts pratiques en lutte biologique contre la moisissure noire de l'oignon.

Enfin, ce travail ouvre la voie à d'autres perspectives et il mérite une étude plus approfondie et détaillée pour exploiter les propriétés antifongiques des huiles essentielles de *G. rosat* dans le domaine agricole.

Annexes

Annexe 01 : Milieux de culture

Le milieu utilisé pour la culture du champignon *A. niger* est le milieu PDA (*Potato Dextrose Agar*). Il est constitué de :

- Pomme de terre.....200g
- Glucose20g
- Agar-agar.....15g
- Eau distillée1000ml

Pour la préparation de ce milieu, il faut laver et couper les pommes de terre en petit morceaux, les mettre dans l'eau distillée et porter le tout à ébullition. Ensuite, filtrer et compléter avec le dextrose (ou glucose) et l'Agar. Enfin, le milieu est stérilisé à l'autoclave (120°C pendant 20 minutes).

Annexe 02 : Verrerie, instruments et matériel

Pour la réalisation des différents tests nous avons utilisé le matériel suivant :

- Balance de précision
- Agitateur
- Plaque chauffante
- Micro seringue
- Etuve
- Autoclave
- Vortex
- Flacons de 250 ml
- Bec Bunsen
- Boîtes de Pétri de 90 mm de diamètre

- Pipettes Pasteur
- Eppendorffs
- Micro pipette (25 , 125 et 250 µl)- Microscope optique

- Lames et lamelles
- Erlenmeyers
- Fioles jaugées
- Béchers
- Ballons
- Pipettes graduées
- Anse à ensemercer
- Papier aluminium - Emporte pièce
- Sac en plastique
- Sac en papier- Hydro distillateur de type Clevenger
- Réfrigérateur
- Gants de laboratoire et bavettes

Annexe 03 : Produits

Les produits utilisés durant notre étude sont :

- Eau de javel
- Alcool
- Bleu de méthylène
- Huile à immersion
- Et l'eau distillée

Annexe 04 : Calculs liés à l'activité antifongique

Tableau 01 : Diamètres (en cm) de la croissance mycélienne d'*A. niger* en fonction de la concentration en huiles essentielles de *G. rosat* durant les 7 jours d'incubation avec les différentes répétitions

Dose (HE) / Jours	D0 (Témoin)	D1 (25µl)	D2 (125µl)	D3 (250µl)
1	R1 :1.4 R2 :1.5 R3 :1.5	R1 :1 R2 :1 R3 :1,1	R1 :0 R2 :0 R3 :0	R1 :0 R2 :0 R3 :0
2	R1 :2.9 R2 :3 R3 :3.1	R1 :1.6 R2 :1.8 R3 :1.9	R1 :0 R2 :0 R3 :0	R1 :0 R2 :0 R3 :0
3	R1 :3.8 R2 :4 R3 :4,1	R1 :3.3 R2 :3.4 R3 :3.4	R1 :0 R2 :0 R3 :0	R1 :0 R2 :0 R3 :0
4	R1 :4.9 R2 :5 R3 :5.1	R1 :4.5 R2 :4.5 R3 :4.7	R1 :0 R2 :0 R3 :0	R1 :0 R2 :0 R3 :0
5	R1 :7 R2 :7 R3 :7.1	R1 :6 R2 :6.2 R3 :6.2	R1 :0 R2 :0 R3 :0	R1 :0 R2 :0 R3 :0
6	R1 :8.8 R2 :8.9 R3 :9.1	R1 :7 R2 :7.1 R3 :7.2	R1 :0 R2 :0 R3 :0	R1 :0 R2 :0 R3 :0
7	R1 :9 R2 :9 R3 :9	R1 :8 R2 :8,5 R3 :9	R1 :0 R2 :0 R3 :0	R1 :0 R2 :0 R3 :0

R : Répétitions

Tableau 02 : Moyennes des diamètres (en cm) de la croissance mycélienne d'*A. niger* en fonction de la concentration en huiles essentielles de *G. rosat* durant les 7 jours d'incubation

Dose (HE) / Jours	D0 (Témoin)	D1 (25µl)	D2 (125µl)	D3 (250µl)
1	1,5	1	0	0
2	3	1,7	0	0
3	3,9	3,3	0	0
4	5	4,5	0	0
5	7	6,1	0	0
6	8,9	7,1	0	0
7	9	8,5	0	0

Tableau 03 : Taux d'inhibition calculés pour les différentes concentrations des huiles essentielles de *G. rosat*

Dose HE	Formule	Taux d'inhibition (%)
D0 (Témoin)	$TI(\%) = 100 \times ((90-3) - (90-3)) / (90-3)$	00
D1 (25ul)	$TI(\%) = 100 \times ((90-3) - (85-3)) / (90-3)$	5,74
D2 (125ul)	$TI(\%) = 100 \times ((90-3) - (0-3)) / (90-3)$	100
D3 (250ul)	$TI(\%) = 100 \times ((90-3) - (0-3)) / (90-3)$	100

Tableau 04 : Indice antifongique calculés pour les différentes concentrations des huiles essentielles de *G. rosat*

Dose HE	Formule	Indice antifongique (%)
D0 (Témoin)	$IA(\%) = (1 - 9 / 9) \times 100$	00%
D1 (25ul)	$IA(\%) = (1 - 8,5 / 9) \times 100$	06%
D2 (125ul)	$IA(\%) = (1 - 0 / 9) \times 100$	100%
D3 (250ul)	$IA(\%) = (1 - 0 / 9) \times 100$	100%

Tableau 04 : Vitesses de la croissance mycélienne calculées pour les différentes concentrations des huiles essentielles de *G. rosat*

Dose HE	Formule	Vitesse de la croissance mycélienne(cm/j)
D0 (Témoin)	$VC = [1.5 / 1] + [(3 - 1.5) / 2] + [(3.9 - 3) / 3] + [(5 - 3.9) / 4] + [(7 - 5) / 5] + [(8.9 - 7) / 6] + [(9 - 8.9) / 7]$	3,54
D1 (25ul)	$VC = [1 / 1] + [(1.7 - 1) / 2] + [(3.3 - 1.7) / 3] + [(4.5 - 3.3) / 4] + [(6.1 - 4.5) / 5] + [(7.1 - 6.1) / 6] + [(8.5 - 7.1) / 7]$	2,86
D2 (125ul)	$VC = [0 / 1] + [(0-0) / 2] + [(0-0) / 3] + [(0-0) / 4] + [(0-0) / 5] + [(0 - 0) / 6] + [(0-0) / 7]$	0
D3 (250ul)	$VC = [0 / 1] + [(0-0) / 2] + [(0-0) / 3] + [(0-0) / 4] + [(0-0) / 5] + [(0 - 0) / 6] + [(0-0) / 7]$	0

Résumé

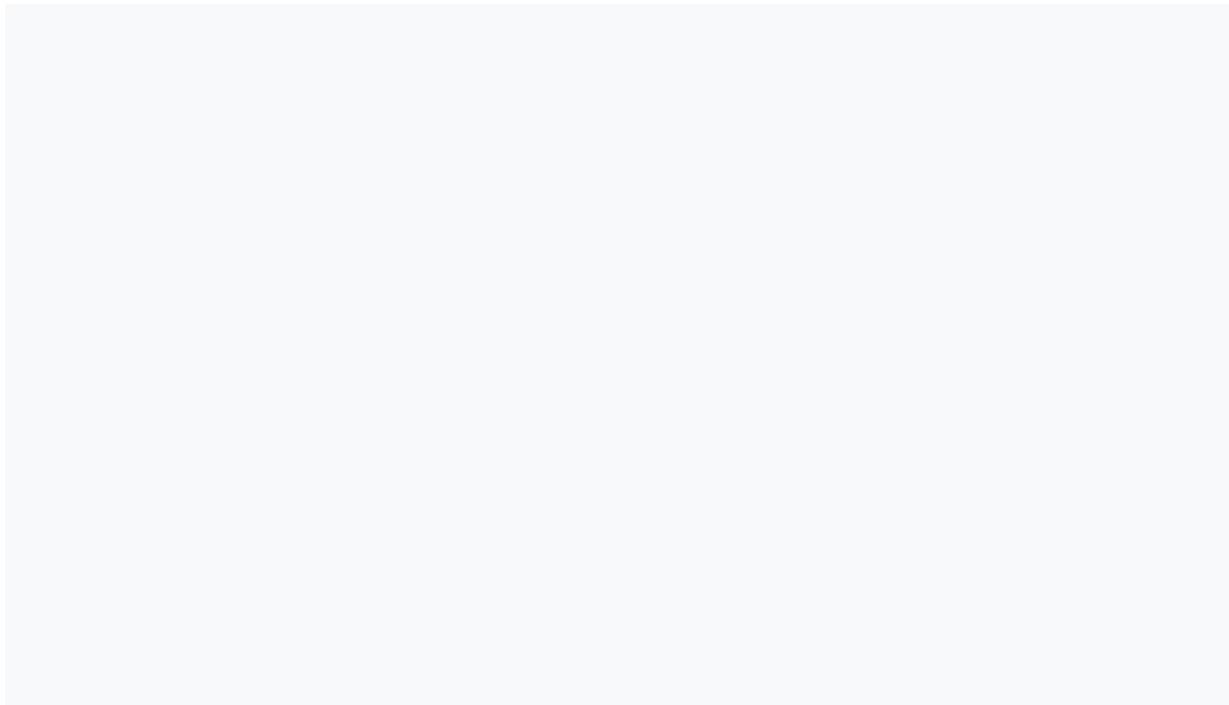
Abstract

ملخص

Résumé

L'objectif de ce travail est de mettre en évidence l'activité antifongique des huiles essentielles d'une plante aromatique et médicinale de la famille des *Géraniacée*, en l'occurrence *Géranium rosat*, récoltée du parc national de Thniat El Had de Tissemsilte et d'étudier leur action sur la croissance du champignon *Aspergillus niger* responsable de la moisissure noire. Ces huiles essentielles ont été extraites par hydro distillation. Ainsi, le rendement obtenu était de 0,25%. L'activité antifongique a été testée en utilisant différentes concentrations des huiles essentielles. Les résultats remportés ont montré que ces huiles ont un effet inhibiteur important à l'égard du champignon étudié. Les diamètres de croissance mycélienne ont évolué progressivement en fonction du temps d'incubation et ont diminué avec l'augmentation de la dose des huiles essentielles. Le taux d'inhibition le plus marqué a été observé pour la D2 (125ul) et la D3 (250ul). L'indice antifongique était de 75 μ La vitesse de croissance mycélienne la plus élevée était enregistrée pour la D0 (Témoin).

Mots clés : *Géranium rosat*, huiles essentielles, *Aspergillus niger*, moisissure noire, potentialités fongicides



summary

The objective of this work is to highlight the antifungal activity of essential oils of an aromatic and medicinal plant of the Geraniaceae family, in this case *Geranium rosat*, harvested from the Thniat El Had de Tissemsilte national park and " study their action on the growth of the fungus *Aspergillus niger* responsible for black mold. These essential oils were extracted by hydro distillation. Thus, the yield obtained was 0.25%. The antifungal activity has been tested using different concentrations of the essential oils. The results obtained showed that these oils have a strong inhibitory effect on the fungus studied. The diameters of mycelial growth gradually changed with the incubation time and decreased with increasing dose of essential oils. The strongest inhibition rate was observed for D2 (125ul) and D3 (250ul). The antifungal index was 75 μ l. The highest rate of mycelial growth was recorded for OD (Control).

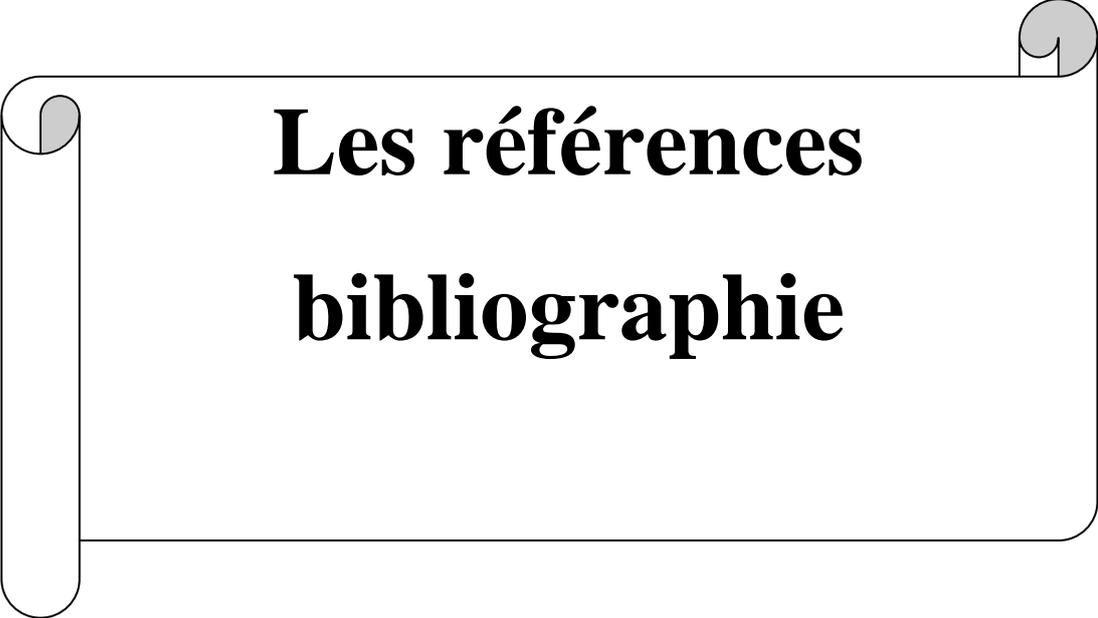
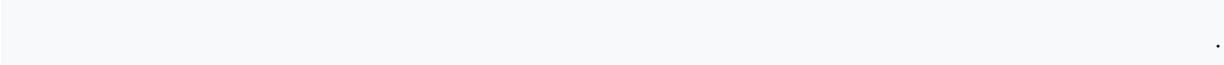
Key words: Rose geranium, essential oils, *Aspergillus niger*, black mold,

ملخص

الهدف من هذا العمل هو تسليط الضوء على النشاط المضاد للفطريات للزيوت العطرية لنبات عطري وطي من عائلة Géraniacées ، في هذه الحالة Géranium rosat ، التي تم جمعها من حديقة ثنية الحد ولاية تيسمسيلت و دراسة تأثيرهم على نمو فطر Aspergillus niger المسؤول عن العفن الأسود. تم استخراج هذه الزيوت الأساسية عن طريق التقطير المائي. وهكذا ، كان العائد الذي تم الحصول عليه 0.25٪. تم اختبار النشاط المضاد للفطريات باستخدام تركيزات مختلفة من الزيوت الأساسية.

أظهرت النتائج التي تم الحصول عليها أن هذه الزيوت لها تأثير مثبط قوي على الفطريات المدروسة. تغيرت أقطار النمو الفطري تدريجياً مع وقت الحضانه وتقل مع زيادة جرعة الزيوت الأساسية. لوحظ أقوى معدل تثبيط لـ D2 (125ul) و D3 (250ul). كان معامل مضاد للفطريات 75 ميكرو لتر ، وسجل أعلى معدل نمو فطري لـ OD (التحكم).

الكلمات المفتاحية: روز الجيرانيوم ، الزيوت الأساسية ، الرشاشيات النيجر ، العفن الأسود



Les références bibliographiques

- 1-Adjou E.S. et Soumanou 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– 5566p.
- 2-AFNOR.** « Recueil de normes : les huiles essentielles. Tome 2. Monographies relatives aux huiles essentielles ». AFNOR, Paris, 2000, 661-663p.
- 3-Alexopoulos, J. et Mims, C.W.(1979).** Subdivision *Zygomycotina*. En. *Introductory Mycology*. John Wiley and sons New York. 228p.
- 4-Al-Mussalam A. (1980).** Revision of the black *Aspergillus* species. PhD Thesis. Rijks université. Utrecht. 45p.
- 5-Al-Safadi, B. ,(2008).** Characterization and distribution of *Daucus* species in Syria. *Biologia*. 63.(2): 177-18 p.
- 6-Anand, K. (2016).** Fungal Protease Production by *Aspergillus niger* and *Aspergillus flavus* Using Rice Bran as the Substrate. *Academia Journal of Agricultural Research*. United States of America (USA)., 4(6), 333-338p.
- 7-Anton R. and Lobstein A., (2005).** Plantes aromatiques. Epices, aromates, condiments et huiles essentielles. Ed. Tec. & Doc., Paris, 522p.
- 8-Ayesha, K., Ikram, U.H., Waseem, A.B., et Sikander, A., (2003).** Isolation and screening of *Aspergillus niger* isolates for xylanase biosynthesis. *Biotechnology*, 185-190 p.
- 9-Baba-Moussa, F., Koumaglo, K., Ayedoun, A., Akpagana, K., Moudachirou, M. and Bouchet, P., (1997).** Antifungal activity of essential oils extracted in the African states of Togo and Benin. *Cryptogamie, Mycologie*, 12: 165-168 p.
- 10-Bedier J.,(1982).** « Le géranium bourbon et ses applications en aromathérapie », Thèse « U.E.R des sciences pharmaceutiques », Président du jury : M. Jacques PELLECUER, Faculté de pharmacie Montpellier, 52p.
- 11-Belaiche P.,(1979).** Aromatogramme. In *Traité de phytothérapie et d'aromathérapie*. Edition Maloine-S-S, tome I. 9-20p.

12-Belkou h, beyoud f.et talebbahmed z., (2005).Approche de la composition biochimique de la menthe verte (*Mentha spicata* L) dans la région de Ouargla, univOuargla. 2-61 p.

13-Belouad A. 2001 « Plantes médicinales d'Algérie ». Office des Publications Universitaires, Alger, pp : 5-10p.

14-Benabdallah, F., (2012). Etude morphologique des feuilles et des fruits du pistachier de l'atlas (*Pestacia atlantica* Desf.) et valorisation des huiles essentielles des feuilles et de l'oléoresine. Mém. de magister. Univ, Mohamed Kheider. Biskra. 55p.

15-Benayad N.,(2008). Les huiles essentielles extraites des plantes médicinales marocaines : moyen efficace de lutte contre les ravageurs des denrées alimentaires stockées, laboratoire des substances naturelles et thermolyse éclair, département de chimie, faculté des sciences de rabat.

16-Bencheikh, S.,(2017). Etude de l'activité des huiles essentielles de la plante *Teucrium polium* ssp *Aurasianum* Labiatae. Univ. Kasdi Merbah Ouargla. The. Doc. 15p.

17-Billeerbeck, V-G.,Roques, C., Vaniere, P. et Marquier, P.,(2002). Activité antibactérienne et antifongique de produit à base d'huiles ; hygiènes volumes x, n°3 : 248-250 p.

18-Bosser J., Cadet Th., Guénot J., Marais W. ,(1987) .Flore des Mascareignes » Office de la recherche scientifique et technique d'outre mer. Paris p 95.

19-Bhattacharya P; Mukerjee A.B; Jacks G et Nordqvist S., (2002). Métal contamination at wood preservation site: Caractérisation and expérimental studies on remediation. sci. total environ . 290: 165-180p.

20-Botton B; Breton A; Févre M. Gauthier S; Guy Ph; Larpent J-P; Reymond P; Sanglier J-J; Vayssier Y. and Veau R. ,(1990). Moisissures Utiles Et Nuisibles : Importance Industrielle. Edition Masson, Paris. S .

21-Boukhatem M N (1), Hamaidi M S, Saidi F, HAKIMY.,(2010).Extraction, composition et propriétés physico-chimiques de l'huile essentielle du Géranium Rosat (*Pélagonium graveolens* L.) cultivé dans la plaine de Mitidja (Algérie). page revue « Nature et Technologie » n°03 : juin 2010 37 à 45p.

22-Boutarfaia et BenyahiaI., (2014).Contribution à l'extraction et l'activité del'huile essentielle du*Pélargoniumgraveolens* 'L'Hér'' de la région d'OuarglaUniversité KasdiMerbah-Ouargla Mémoire présenté en vue de l'obtention du diplôme de 15 16 p.

23-Boz I., Burzo I., Zamfirache M.M., Toma C. and Padurariu C., (2009). Glandular trichomesand essential oil composition of *Thymus pannonicus* All. (Lamiaceae). *Analele Universitatiidin Oradea, Fascicula Biologie,* p.36-39.

24-Bruneton J.,(1993). Pharmacognosie. Phytochimie, plantes médicinales. Tec. et Doc. Lavoisier,2ème édition,.Paris. 915p.

25-Brian, M.L., (1995). *The isolation of aromatic materials from plant products, R.J. Reynolds TobaccoCompany, Winston- Salem(USA),5:51-53 p.*

26-Broydé H, Doré T .,(2013).Effets des pratiques agricoles sur la contamination des denrées par les mycotoxines issues de fusarium et aspergillus et *Aspergillus spp* .cahAgric : p 05.

27-Bruneton J. (1999). Pharmacognosie-Phytochimie, Plantes médicinales, *Tec et Doc*, Paris, 11-19p.

28-Bruneton J.,(1993).Pharmacognosie : Photochimie, plantes médicinales. Paris: Tec. et Doc.Lavoisier, 623 p.

29-BrunetonJ.(1999).Pharmacognosies , Photochimie, Plantes médicinales .Edition Tec et Doc , Paris ,éditions médicales internationales , paris , pp :483 560.

30-Cahagnier, B. and D. Richard-Molard., (1998). *Analyse mycologique in Moisissures des aliments peu hydratés, Ed. Tec & Doc, Paris.140-158p.*

31-Carette A.S., (2000). La lavande et son huile essentielle. Thèse de doctorat. Université de Toulouse. 100 p.

32-Carole Minker.,(2013). 200 plantes qui vous veulent du bien. Franc. p 120-214.

33-Chang, S.-T., et al.,(1999).Antifungal compound in the éthyle acetate soluble fraction of the extractives of *Taiwania (Taiwaniacryptomerioi des Hayata)* heartwood. *Holzforschung.* 535, 487-490 p.

- 34-Chemat, F ; Fabiano-Tixier, A.S ; Hellal, A. ; Boutekedjiret, C. ; Fernandez, X.,(2012).** « Activités chimiques et biologiques des huiles essentielles », In Chemat, F. and Fernandez, X.(Eds.), La chimie des huiles essentielles. Ed. Vuibert, pp. 212–248.
- 35-Ciccarelli D., Garbari F. and Pagni A. M., (2008).** The flower of *Myrtus communis* (Myrtaceae) : secretory structures, unicellular papillae, and their ecological role. *Flora* 203,85-93 p.
- 36-Dayan F. Canterrell C.L., Duke S.O .,(2009).** Natural product in crop protection bioorganic et médicale chemistry ,17.4022-4034,p.
- 37-De Feo V., De Simone F. and Snatore F., (2002).** Potentiel allelochemicals from the essential oils of *Rutagraveolens*. *phytochemistry* 61,573-578 p.
- 38-Dellarras C., (2007).** Microbiologie pratique pour le laboratoire d'analyse de contrôle sanitaire. Médicale international et TEC et DOC, Paris. PP. 112-140 p.
- 39-Demarne FE.,(1989).** « L'amélioration variétale de géranium rosat », Thèse de doctorat en sciences, Université Paris Sud.
- 40-Demarne FE., (1985).** « Le géranium rosat ». Parfums, Cosmétiques et Arômes, n°62,
- 41-Deschamp S.,(1990).** 60 huiles essentielles de plantes. Paris, Éditions Arys. 94p.
- 42-Desoubaux G, J. Chandénier.,(2010).** feuillets de Biologie Aspergillus et maladies Aspergillaires VOL LI N° 293, p03.
- 43-Diguta C. F., (2010).** Ecologie des moisissures présentes sur baies de raisin. Thèse de Doctorat, Université de Bourgogne, Dijon, France.57p.
- 44-Dijksterhuis, J., Wosten, H., (2013).** Développement of *Aspergillus niger*. Studies in mycology, CBS-KNAW Fungal Biodiversity centre, Utrecht, the Netherlands an institute of the Royal Netherlands Academy of arts and sciences.68p.
- 45-Dorman H.J.D., S.G. Deans., (2000).** Antimicrobial agent from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. *J. Appl. Microbiol.*, **88** (2), 308-316 p.
- 46-Doumbouya M., Abokouabenan .L., Nicaise A., camara B., kanko k ., Aidara D et Kone D., (2012).** Activité comparées in vitro de deux fongicides de synthèse et de deux huiles

essentielles sur des champignons telluriques des culture maraichères en cote d'Ivoire. *J. Appl. Bot.* 35:323-3530.

47-El Ajjouri M., Ghanmi M., Satrani B., Amarti F., Rahouti M., Aafi A., Ismaili MR., et Farah A., (2010). Composition chimique et activité antifongique des huiles essentielles de *Thymus algeriensis* Boiss. Et Reut. et *Thymus ciliatus* (Desf.) Benth. Contre les champignons de pourriture du bois. *Acta Botanica Gallica.* 157 (2) : 285-294 p.

48-Evans W. C., Trease G. E., (1996). Trease and Evan's Pharmacognosy. 14th edition. London: W.B. Saunders, p48.

49-Faid M., M. Charal ., M. Mosaddak, (1996). Chemical composition and antimicrobial activities of two aromatic plants: *Origanum majorana* L. and *O. compactum* Benth. *J. Essent. Oil Res.*, **8**, 657-664 p.

50-Faleiro M.L; Miguel M.G ; Ladeiro F; Venancio F; Travares R; Brito J.C; Figueiredo A; Barroso J.G et. Perdo L.G., (2003). Antimicrobial activity of essential oils isolated from portuguese endemic species of thymus. *Lett. Appl. Microbiol.* 36: 35-40 p.

51-Fandohan P., Gbenou J., Gnonlofin B., (2004). Effect of essential oils on the growth of *Fusarium verticillioides* and Fumonisin contamination in Corn. *J. Agric. Food Chem.* 52 : 6824-6829 pp.

52-Fantino N.S., (1990). Etude du polymorphisme au d'une population de lavande (*Lavandula angustifolia* Mill.) Détermination de critères précoces de sélection. Thèse de doctorat. Université de La Rochelle. p :41-45

52-Finar, I.L. ,(1994). « Organic chemistry », Ed. Longman Scientific et Technical, Vol. II.

53-Fornet N., (2016). Mémoire de fin d'études « Conseil en aromathérapie » HIPPOCRATUS « Le GÉRANIUM ROSAT BOURBON» Île de La Réunion page 06.

54-Fornet N., (2016). Mémoire de fin d'études « Conseil en aromathérapie » HIPPOCRATUS « Le GÉRANIUM ROSAT BOURBON» Île de La Réunion page 11.

55-Franchomme, P. ; Pénoël, D., (1990). L'aromathérapie exactement. Encyclopédie de l'utilisation thérapeutique des huiles essentielles. Roger Jallois éditeur. Limoges. 445 p.

56-Gilly G.,(1997). (Les plantes à parfum et huiles essentielles à Grasse)L'HARMATTAN, Paris, 11-19p.

57-Giordani R. et Kaloustian J., (2008). Action anticandidosique des huiles essentielles : leur utilisation concomitante avec des médicaments antifongiques. *Phytothérapie* (2006) Numéro 3:121-124 p.

58-Gommes PB, MATA VG, RODRIGUES AE.,(2004).« Caractérisation of Portuguese grown geranium oil (*Pélargonium* sp.) ». *J. Essent. Oil Res.* 16 490–495 p.

59-Griffin S.G., S.G. Wyllie, J.L. Markham., D.N. Leach.,(1999).The rôle of structure and molecular properties of terpenoids in determining antimicrobial activity. *Flav. Fragr. J.*, **14** (5), 322-332 p.

60-Gueldener R.C., D.M. Wilson., A Heidt., (1985). Volatile compounds inhibiting *Aspergillus flavus*. *J. Agri. Food*,**33**, 413-419.

61-Guy Gilly. ,(2005).Les plantes aromatique et huiles essentielles a grasse – botanique-culture chimie-production et marché.préface de Hubert richard ;l'harmattan .

62-Hammer K.A., C.F. Carson., T.V. Riley, (2003). Antifungal activity of the components of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil. *J. Appl. Microbiologie. Immunol.*, 95(4), 853-860.

63-Hazzit M.,(2002). Arômes alimentaires. Thèse magister, USTHB, Alger. 96p.

64-Heuze G.,(1859).« Les plantes industrielles ». Librairie de L.HACHETTE et Cie, Paris, pp : 282-2

65-Huang H. S., Chang L. H., Jong T. T., Nien Y. F.et Chang C. M. J.,(1995). Supercritical carbon dioxide extraction of turmeric oil from *Curcuma longa* Linn., and purification of turmerones. *Separation and Purification Technology.* 47, p:119-125

66-Isman M. B., (2000). Plant essential oils for pest and disease management. *Crop Prot.*19, 603-608.

67-Janin Julien., (2006).Intoxication volontaire par l'ingestion d'huile essentielle de *Géranium Bourbon* (*Pélargonium Graveolens*.) à propos d'un cas Réunionnais page 26 27 52

68-Jesus, A. et Cordova, L. ,(1999). Isolement, identification et physiologie des champignons thermophiles en vue de la production de lipases par fermentation en milieu solide. Centre de montpellier (vol: 10). France: Edition VARIA. .,14p.

69-KaibekJ.,(2012). Adopter la slow cosmétique. Paris: Leduc . S, 224-225p.

70-Kaloustian J., Chevalier J., Mikail C., Martino M., Abou L. et Vergnes M.F., (2008).Etude de six huiles essentielles : Composition chimique et activité antibactérienne, *Phytothérapie*, 6: 160–164.

71-Kaloustian J., et Hadji-Minaglou F., (2012). La connaissance des huiles essentielles : Qualitologie et aromathérapie entre science et tradition pour une application médicale raisonnée, Springer- verlag, Paris-France : 17-160.

72-Kamran S., M. Digrak. U. Ravid ., A. Iicim., (2001).Antibacterial and antifungal activity of essential oils of *Thymus revolutus* Celak. from Turkey. *J. Ethnopharm.*, **76**, 163-186.

73-Kiran, A.,(2016). Fungal Protéase Production By *Aspergillus niger* and *Aspergillus flavus* using Rice Bran as the substrate. *Academia journal of Agricultural Research* . , 4(6), 333-338p.

74-Koji,Y.,Wang,L.,Makoto,M. ,Kazuko,N.,(2001) . Identification, Classification and phylogeny of the *Aspergillus* section *Nigri* inferred from mitochondrial cytochrome b gene . *FEMS Microbiology letters* . , (200),241-246p.

75-Kolberg, Christopher Wagner et Gillian A. cooper-Driver., (2000).« Patterns of *Aspergillus niger* var. *phoenicis* (Corda) AL- Musallam infection in Namibian populations of *Welwitschia mirabilis* Hook.f. », *Journal of arid Environments*, vol.46, n°2,2000, p.

76-Clevenger J.F., (1928),*Apparatus for the determination of volatile oil.* *J. Am. Pharm Assoc.*, **17**(4), 346-351

77-Kurita, Koike., (1982). Systematic antimicrobial effect of sodium chloride and essential oils components. *Agric. Biol. Chem.*, 46-159-165p.

78-Laghchimi A., Znini M., Majidi L., Renucci F., El Harrak et A., Costa J., (2014). Chemical composition and effect of liquid and vapor phase of *Lavandula multifida* essential

oïdonmycelial growth of fungi responsible for the rot of apple. *J. Mater. Environ. Sci.* 5 (6) : 1770-1780.

79-Lahlou N.,(2005).et al. : Étude de la cytotoxicité de l'huile essentielle de *Menthapulegium* : essais biologiques varies; Les cahiers de la recherche A (6) : 716

80-Laïb I., (2012). Etude des activités antioxydante et antifongique de l'huile essentielle des fleurs sèches de *Lavandulaofficinalis* : application aux moisissures des légumes secs. Revue « Nature etTechnologies », N° 07, 44-52p.

81-Lakhdar L., (2015).Evaluation de l'activité antibactérienne d'huiles essentielles marocaines sur *AggregatibacterActinomycetrmcomitans* : Etude in vitro. thèse de doctorat., Faculté de Médecine Dentaire de rabat, 172P.

82-Lalli J.Y., R.L. Van Zyl, Vuuren ., A.M. Viljoen, (2008).In vitro biological activities of South African *Pélargonium* (Géraniacées) species. *South African J. Bot.*, **74**, 153-157.

83-Lalli Y . , Jacqueliienne Y. , (2005).In vitro pharmacological properties and composition of leaf essential oils and extracts of selected indigenous pelargonium (Geraniaceae) species- Thesis master of pharmacy,faculy of Health Scienses, university of the witwatersrand , Johannesburg (south Africa).52p.

84-Lardry J.M., Haberkorn V., (2003).Les formes galéniques destinées à l'usage externe. *Kinésithérapie*, Les Annales, n° 16 :21-25p.

85-Lavergne, R.,(2011).Les plantes médicinales réunionnaises d'aujourd'hui, Éditions ORPHIE.

86-Lardy, J.M V. Haberkorn.,(2007).L'aromathérapie et les huiles essentielles. *Revue de Kinésithérapie*. (61): 14-17.

87-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.*

88-LemaireC., CHAUVIERE A .,(1824). de la culture des *Géraniums*, des *calcéolaires*, des *verveines* et des *cinéraires*. Paris :Cousin, 36p.

89-Lis-Balchin. M. (2005).Aromathérapie science, a guide for health care Professional. London:Pharmaceutical press, p.195-201.

- 90-Lis-Balchin M. , S.G Deans, (1996).**Antimicrobial effects of hydrophilic extract of Pélargonium species (Géraniacée). Lett. AppliedMicrobiol., **24** (4), 205-207.
- 91-Lis-Balchin. M.(2002).** «Géranium and pélargonium: the genera *Géranium* and *Pélargonium*». CRC Press, Taylor et Francis, London, , pp: 116-131, 147-165, 184-217
- 92-LocasteS ,(2014).** Ma bille de la phytothérapie. Paris : Leduc, 206- 207p.
- 93-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
- 94-Luisa, I., Correia, C.(2013).** *Aspergillus aspergillose* –Les défis dans la lutte contre la maladie. Master en sciences pharmaceutiques. Université Fernando Pessoa.63p.
- 94-Masayuki,M., et Katsuya,G. (2010).**Aspergillus : molecularbiology and genomics. Edition caister Académique press, Norflok(England).12p.
- 96-Metahni.,M(2012).** Déposition et Réenvolde Spores FongiquesContribution à la Compréhension du Risque Nosocomial Aérotransmis
-Thèse de Doctorat présentée par :
Pour obtenir le titre de :Docteur de l'École Normale Supérieure de Lyon - Université de Lyon.page 31
- 97-MetaniA.,(2010).** Observations au microscope électronique à balayage, plateforme de microscopie de l'Université Claude Bernard - Lyon 1. Images personnelles.
- 98-Meyer,A.,Deiana,J., et Bernard,A. (2004).** Cours de microbiologie générale : avec problèmes et exercices corrigés .2em Edition.
- 99-Mhetras,Nc.,Bastawde,K.B, et Gokhale, D. V. (2009) .**Purification and characterization afacide lipase from *Aspergillus Niger* NCIM 1207. Bio ressourceTechnology. , (100). 1486-1490p.
- 100-Mompon, B.,(1994).**Quel avenir commercial pour les produits obtenus par les nouvelles technologies d'extraction : CO2, Micro-ondes, ultrasons, nouveaux solvants, 4 ième rencontre internationale de Nyons., 149-166p.
- 101-Morin. , O(1994).**Aspergillus et aspergillose : biologie Ed T techniquesEncycl.MedChir. (Elsevier, Paris),Maladies infectieuses,8-600.

103-MostaNM.(2006). « Essential oil yield and composition of rosescentedgeranium (*Pélargonium*sp) as influenced by harvesting frequency and plant shoot age ». Thesis of doctorat MSC Agronomy, faculty of Natural and agricultural sciences, university of Pretoria p 25.

103-Nasraoui B., (2006).leschampignons et pseudo champignons pathogènes des plantes cultivé .biologie naturelles systématique, Interaction pathologique.

104-Nedjai I., et Nedjai S., (2017). Activité antimicrobienne des huiles essentielles. Mémoire deFin de cycle en vue de l'obtention du diplôme Master, option écologie microbienne. Département de microbiologie, Université A. MIRA – Bejaia, 12p et 34 p.

105-Neffati, A., (2010). Thèse de doctorat en Sciences de l'université de Caen, Etude de la composition chimique et évaluation d'activités biologiques de l'huile essentielle d'une Apiaceae de Tunisie : *Pituranthos chloranthus*.51p.

106-Nguyen M (2007).Identification des espèces de moisissures potentiellement productrices mycotoxines dans le riz commercialise dans cinq provinces de la centrale du vitenam – étudesdes conditions pouvant reduire la production des mycotoxines toulouse, page 40.

107-Ouraini D;Agoumi A; Alaoui M.I; Alaoui K; Cherrah Y;M. Benlemlih; Alaoui M ,Belabbas.(2005).Approche thérapeutique des dermatophyties par les huiles essentielles de plantes aromatiques marocaines phytothérapie numéro .1: 3-12

108-Oussalah M., Caillet S., Saucier L. et Lacroix M., (2007). Inhibitory effects of selected plantessential oils on four pathogen bacteria growth: *E. coli* O157:H7, *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes*. *Food Control*. 18 (5), 414-420.

109-Pane, B.,Sourabies,o.,Philippe,A.,Nikiem,A. , Alfred, S. et Traor,E. (2011). Caractérisation de Souches d'*Aspergillus* Sp isolées des graines d'arachides cultivées au Burkina Faso, Afrique de l'ouest. *International journal of biological and chimicalSciense. , 5(3) ,1232-1249.*

J.

5:51

110-Pant, B. and Manandhar, S. (2007).*In-vitro* propagation of carrot (*Daucus carota*). *Sci. World J.* 5:51.

- 111-Peyron L., Richard H.(1992).** L'extraction des épices et herbes aromatiques et les différents types d'extraits épices et aromates. Paris: Tec. et Doc. Lavoisier,
- 112-Pibiri M. C., (2006).** Assainissement microbiologique de l'air et des systèmes de ventilation au moyen d'huiles essentielles. Thèse de Doctorat, Lausanne, Canada, p : 177.
- 113-Piochon M. (2008).** Etude des huiles essentielles d'espèces végétales de la flore Laurentienne : composition chimique, activités pharmacologiques et hémi-synthèse. Mémoire, Université du Québec à Chicoutimi, Canada., 81p.
- 114-Pitt, J.I., Hocking, A.D., Bhudhasamai, K., Miscamble, B.F., Wheeler, K.A. et Tanboon, E.K.P. (1994).**The normal microflora of commodities from Thailand. 2: Beans, rice, small grains and other commodities. *International Journal of Food Microbiology* **23**: 35–53.
- 115-Pourmortazavi S.M. et Hajimirsadeghi S.S. (2007).**Supercritical fluid extraction in plant essential and volatile oil analysis, *Journal of Chromatography A*, 1162, 2-24p.
- 116-Prapagdee B., Kuekulvong C., et Mongkolsuk S., (2008).**Antifungal potential of extracellular metabolite produced by *Streptomyces hygroscopicus* against phytopathogenic fungi. *Int. J. Biol. Sci.* **4** : 330-337p.
- 117-Quatresous N. (2011).**Aspergillus humaine. Epidémiologie, diagnostic biologique contrôle. Thèse de Doctorat. Université de Limoges. Limoges.65p.
- 118-Rahul, P ., et Jha, S .N (2014).** Basics of the genus Aspergillus. *International journal of Research in Botany.* , 4(2) ,26-30p.
- 119-Rajeswara Rao Br., (2002).** « Biomass yield, essential oil yield and essential oil composition of rose-scented geranium (*Pelargonium* species) as influenced by row spacings and intercropping with coriander (*Mentha arvensis* L.f. *piperascens* Malinv. Ex Holmes). *Industrial Crops and Product* **16**, 133–144.
- 120-Read.N.D, (1991).***Electron Microscopy of Plant Pathogens.* K. Mendgen et D.-E. Lesemann, p98.
- 121-Réunion .,(2000).** « Une agriculture très localisée » Recensement agricole 2000- Aout 200

- 122-Réunion, A. (2000).** Une agriculture très localisée. Recensement agricole 2000. 125 p.
-Revue de botanique appliquée et d'agriculture coloniale n°68, 1927, p273-287
- 123-Richard, H. (1992).** Épices et Aromates. Technologie et Documentation Lavoisier. Paris. 339p.
- 124-Rivier C. (1889).** Algérie : horticulture général, végétation, culture spéciales ,acclimatation. Paris : Hachette. P.67.
- 125-Rodolfo J, Koroch A, Simon J, Hitimana N., (2006).** « Quality of géranium oils: case studies in southern and eastern Africa ». Journal of essential oil research (JEOR), p60.
- 126-Roger M. ,Peerson R. , et Stephan R. , (1999) .** Le géranium rosat fiches Technique, projet dappui à la filière Essentielles SYPEAM p01.
- 127-Roux-Sitruk D., (2008).**Chaumont J.P., Cieur C., Millet J., Morel J.M., Tallec D., Conseil en aromathérapie, ed Pro-Officina Wolters Kluwer France 187pp
- 128-Sahraoui 2014/2015 UN1901.** Laboratoire de pharmacognosie.
- 129-Satrani B., A. Farah ., M. Talbi, (2006).** Effet de la distillation sur la composition chimique et l'activité antimicrobienne des huiles essentielles de myrte (*Myrtus communis* L.) du Maroc. Acta Bot. Gallica, **153** (2).
- 130-Scheidegger K .A.et Payne G.A.(2003).**Unmoking the secrets behindd secondary metabolism,A review of *Aspergillus flavus* from pathogenicity to functional genomics .journal of Toxicology and Toxin Review,22,427-463.
- 131-Schnaubelt.-K(2005).** Essential oil therapy according to traditional Chinese medical concepts. *Int. J. Aromather.* (15): 98-105p.
- 132-Schuster E., Dunn-Coleman N., Frisvad J C.,VanDijck P. W.M., (2002).** On the safety of *Aspergillus niger* – a review. Appl MicrobialBiotechnology 59, 426-435.
- 133-Sevastianos, R., Zaouia, N., Salih, G., TantaouiElaraki, A., Lamrani, K., Cheheb, M., Hassouni, H., Frederic, V., Isabelle, G. P., Christopher, A. Ismaili, A. M. (2006).**Characterization of filamentous fungi isolated from Moroccan olive and olive cake:

Toxinogenic potential of *Aspergillus* strains. *Molecular Nutrition and Food Research*, 50 (6): 500-506p.

134-Sharma N., et Tripathi A., (2006).Fungitoxicity of the essential oil of *Citrus sinensis* on post-harvest pathogens. Vol 22: 587-593.

135-Shaw IAS, Kumar T, Chishti N, Shabir S., (2006). « Cultivation of rose-scented géranium (*Pélagonium* sp) as a cash crop in Kashmir valley ». *Asian Journal of Plant Sciences* 5 (4): 673-675.

136-Shin S ;(2003)."Anti-aspergillus activities of plant essential oils and their combination effects with ketoconazole or amphotericin B." College of Pharmacy, Duksung Women's University, Dobongku, Seoul, South Korea.104p.

137-Shin S., Lim S., (2007). "Antifungal effects of herbal essential oils alone and in combination with Ketoconazole against trichophyton spp." College of Pharmacy, Duksung Women's University, Dobongku, Seoul, South Korea.72p.

138-Sutour S(2010).études de la composition chimique d'huiles essentielles et d'extraits de menthes de corce et de kumquats. Thèse pour obtenir le grade de docteur de L'université de corce Pascal Paoli Faculte de sciences et techniques.36p.

139-Tantaoui-Elaraki A. , L. Beraoud, (1994).Inhibition of growth and aflatoxin production in *Aspergillus parasiticus* by essential oils of selected plant materials. *J.Environm. Pathol. Toxicol Oncl.*, 13, 67-72p.

140-Tibere F ;(2005).« bulletin d'information année 2005 ».Association d'agriculteurs APLAMEDOM. 06p.

141-Willem J . , (2004).les huiles, médecine d'avenir. Ed. ARVAS, 318p.

142-Wilson c. L., Solar j .M. , Elgaout A and Wisniewski M . E . , (1997). rapid évolution of plant extracts and essential oil for antifungal activity *Botrytis cinera* . plan dis. , N°81.204-210p.

143-Zerrouki N., (2009).contribution a l'étude photochimique de le plante *teraclins articulata* Activité biologique et biochimique de la plante. Diplôme de magister. 101P.

144-Zhong Yao C., Sun W., Xu Z., Wang C., Qu W. et Lin C.(2005).
" Study on antioxidant activity of essential oils and its monomer from *Pélargoniumgraveolens*."
Shangai Institute of Technologyfebruary.