

République Algérienne Démocratique et Populaire  
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

UNIVERSITE ABOUBAKR BELK AÏD – TLEMCCEN  
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie et des Sciences de la Terre et de  
l'Univers



**Département d'Ecologie et Environnement**  
Laboratoire d'Ecologie et Gestion des Ecosystèmes Naturels

## **Thèse de Doctorat**

Spécialité : **Ecologie animale**

Présenté par :

**Melle SENOUCI Hanane**

### **Thème**

**« Etude des activités biologiques de l'huile essentielle de *Ammoides verticillata*, en combinaison avec les huiles essentielles de *Curcuma longa* et *Allium sativum* et Micro-encapsulation de l'HE de *Ammoides verticillata* en vue d'une lutte biologique »**

#### **Jury :**

<b>Président</b>	: Mr Amrani Sidi Mohamed	Professeur	Université de Tlemcen
<b>Encadreur</b>	: Mme Gaouar Benyelles Nassira	Professeur	Université de Tlemcen
<b>Co-encadreur</b>	: Mr Dib Mohamed El Amine	Professeur	Université de Tlemcen
<b>Examineurs:</b>	Mr Benali Nedjib	MCA	Université de Gafsa, Tunisie
	Mr Benmehdi Hocine	Professeur	Université de Bechar

**Année Universitaire 2019 – 2020**

## REMERCIEMENTS

Merci à **Dieu** le tout puissant de m'avoir donné le privilège et la chance d'étudier et de suivre le chemin de la Science.

Je tiens tout d'abord à remercier mon encadreur **Mme GAOUAR-BENYELLES N.**, Professeur à l'Université de Tlemcen pour m'avoir fait l'honneur de diriger cette thèse et qui a suivi et veillé rigoureusement sur le bon déroulement de ce travail avec ses critiques constructives et sa surveillance étroite des résultats obtenus. Je lui suis reconnaissante pour la confiance et le soutien permanent qu'elle m'a témoigné dans ce travail ainsi que pour sa disponibilité et pour la grande autonomie qu'elle m'a accordée.

Je tiens particulièrement à adresser ma profonde reconnaissance à mon co-encadreur **Mr DIB Mohamed El Amine**, Professeur à l'Université de Tlemcen, Département de Chimie, pour son aide précieuse pour la réalisation de ce travail et tous les membres de laboratoire « LASNABIO ».

J'adresse aussi mes vifs remerciements à **Mr AMRANI S.M.**, Professeur au Département d'Agronomie, pour m'avoir fait le grand honneur d'accepter la présidence du jury.

Je tiens à remercier **Mr Benali Nejib**, Maître de Conférences à L'Université de Gafsa en Tunisie, d'avoir accepté d'examiner ce travail et pour l'aide qu'il m'a accordée pour la réalisation d'une partie de ce travail, je tiens à lui exprimer ma gratitude et mon profond respect.

Je suis très sensible à l'honneur que me fait **Mr BENMEHDI Houcine**, Professeur à L'Université de Bechar, d'avoir accepté de juger ce travail, je suis très heureuse de bénéficier de ses observations ; je tiens à lui exprimer ma sincère reconnaissance.

Je remercie très sincèrement **Mr HASSANI F.**, Maître de Conférences au Département d'Ecologie et Environnement, Faculté SNV-STU, Université de Tlemcen, pour avoir accepté d'examiner ce travail malgré ses nombreuses responsabilités. Je tiens à lui exprimer ma sincère reconnaissance et mon profond respect.

Mes vifs remerciements vont également à **Mr MEHREZ Romdhane**, Professeur et **BENALI Nejib**, Maître de Conférences à l'Université de Gafsa en Tunisie et toute leur équipe pour m'avoir accueillie dans leur Laboratoire d' « Ecologie et analyses chimiques » et pour leur aide précieuse pour la réalisation de la micro-encapsulation et toutes les techniques auxquelles ils m'ont initié.

Je remercie vivement **Mme M'SAAD GUERFALLI Meriem** et tous les membres de l'Unité de la Mouche Stérile du Centre National des Sciences Technologiques et Nucléaires CNSTN de Tunisie pour leur aide précieuse, leur gentillesse, leur présence, leurs conseils ainsi que leur disponibilité.

J'adresse ma profonde reconnaissance à toutes les personnes ayant participé d'une façon ou d'une autre, de loin ou de près à la réalisation de cette thèse.

Je ne pouvais finir sans remercier très fortement mes parents pour la confiance et la liberté qu'ils m'ont toujours accordées dans mes choix et pour leur inquiétude quant à l'avancée de mes travaux.

Merci à mes frères, mes sœurs, mes amis et tous les membres de notre laboratoire **d'Ecologie et Gestion des Ecosystèmes Naturels** pour leur soutien et leurs encouragements.

# Dédicaces

## **Je dédie cette thèse À Allah**

Tous puissant pour tous ses bienfaits qui sont dénombrables qui m'a aidée et guidée dans le bon chemin. Exaltation et reconnaissance pour votre charité et miséricorde.

**À mes chers parents Mohammed et Fatima** Sources de mes joies, secrets de ma force, vous serez toujours mon modèle

**Papa**, dans ta détermination, ta force et ton honnêteté ;

**Maman**, dans ta bonté, ta patience et ton dévouement en faisant de moi la personne que je suis aujourd'hui.

Merci pour tous vos sacrifices pour que vos enfants grandissent et prospèrent.

Merci de travailler sans relâche malgré les péripéties de la vie, veillant au bien-être de vos enfants. Merci d'être tout simplement mes parents. C'est à vous que je dois cette réussite et je suis fière de vous l'offrir.

**À ma chère professeur GAOUAR BENYELLES Nassira** Merci pour votre temps et votre patience tout le long de la réalisation de ce travail. Vos encouragements inlassables, votre amabilité, votre gentillesse méritent toute admiration.

## **À mes chères sœurs et frères**

En témoignage de l'attachement, de l'amour et de l'affection que je porte pour vous, je vous souhaite tout le bonheur, la réussite et la sérénité. Je vous exprime à travers ce travail mes sentiments de Fraternité et d'amour.

## **À mes chers oncles et tantes maternels et paternels et toute ma famille**

**À mon fiancé** je vous souhaite une vie pleine de santé, de Bonheur et de réussite.

## **À tous mes amis(e)**

En témoignage de l'amitié et les souvenirs qui nous unissent, je vous dédie ce travail et je vous souhaite une vie pleine de santé et de Bonheur.

## Liste des tableaux

<b>Tableau 01</b> : les différents stades de développement avec leurs températures optimales , (Lousert et Brousse, 1978).	<b>09</b>
<b>Tableau 2</b> : Principales maladies de l'olivier Selon Argenson et al. (1999)	<b>13</b>
<b>Tableau 3</b> : Synthèse des données climatiques de la station de Zenata	<b>40</b>
<b>Tableau 4</b> : Nombre des piqûres et de trous de sortie pour 10 arbres	<b>43</b>
<b>Tableau 5</b> : Paramètres géographiques des sites des espèces récoltées	<b>46</b>
<b>Tableau 6</b> : les souches microbiennes utilisées	<b>51</b>
<b>Tableau 7</b> : corrélations linéaires des piqûres et trous de sortie en fonction des dates	<b>58</b>
<b>Tableau 08</b> : propriétés des trois huiles essentielles	<b>60</b>
<b>Tableau 09</b> : Rendements en huiles essentielles des plantes étudiées	<b>60</b>
<b>Tableau 10</b> : Composition chimique de l'huile essentielle	<b>61</b>
<b>Tableau 11</b> : Pourcentages d'inhibition du radical libre DPPH• en fonction des concentrations des huiles essentielles de <i>A. verticillata</i> , <i>C. longa</i> et <i>A. sativum</i> .	<b>65</b>
<b>Tableau 12</b> : Résultats des combinaisons doubles et triples entre les trois huiles essentielles	<b>67</b>
<b>Tableau 13</b> : Activité insecticide de l'huile essentielle de <i>A. verticillata</i>	<b>69</b>
<b>Tableau 14</b> : diamètres des zones d'inhibition des différentes huiles essentielles (en mm)	<b>72</b>
<b>Tableau 15</b> : Concentrations minimales inhibitrices (CMI) et bactéricides (CMB) de l'huile essentielle de <i>Ammoides verticillata</i> en µl/ml et le rapport CMB/CMI	<b>73</b>
<b>Tableau 16</b> : Activité antifongique des huiles essentielles individuelles	<b>77</b>
<b>Tableau 17</b> : Activité antifongique des mélanges d'huiles essentielles	<b>79</b>
<b>Tableau 18</b> : Effets du mélange d'huiles essentielles <i>A. sativum</i> + <i>C. longa</i> sur la protection des tomates contre les infections causées par les champignons testés	<b>83</b>



## Liste des figures

<b>Figure 01</b> : Schéma de la taxonomie du genre <i>Olea</i> ( <i>Oleaceae</i> ,) simplifiée et répartition géographique des taxons ( <b>Breton et al., 2006</b> ).	<b>05</b>
<b>Figure 02</b> : Fleurs de l'olivier	<b>07</b>
<b>Figure 03</b> : le fruit d'olivier ( <b>Rossini, 1999</b> ).	<b>07</b>
<b>Figure 04</b> : Le cycle de vie de l'olivier ( <b>Argenson et al; 1999</b> ).	<b>08</b>
<b>Figure 5</b> : Répartition de l'olivier dans la Méditerranée ( <b>Amouretti, 1989</b> )	<b>11</b>
<b>Figure 06</b> : Carte oléicole d'Algérie (Source : Institut Technique des Arbres Fruitiers (ITAF , 2008)	<b>12</b>
<b>Figure 7</b> : Stades adultes de la mouche <i>Bactrocera oleae</i> /source ( <a href="http://www.afidol.org">www.afidol.org</a> ).	<b>14</b>
<b>Figure 8</b> : Larve et pupes de <i>Bactrocera oleae</i>	<b>15</b>
<b>Figure 09</b> : cycle de développement de <i>Bactrocera oleae</i> /source ( <a href="http://www.afidol.org">www.afidol.org</a> ).	<b>16</b>
<b>Figure 10</b> : Galerie et piqûres de ponte	<b>17</b>
<b>Figure 11</b> : Trou de sortie d'une puppe ou d'un adulte	<b>17</b>
<b>Figure 12</b> . Monoterpène alpha-myrcène	<b>20</b>
<b>Figure 13</b> . Sesquiterpène : (E) -bêta-farnésène	<b>21</b>
<b>Figure 14</b> : <i>Ammoides verticillata</i>	<b>25</b>
<b>Figure 15</b> . <i>Curcuma poudre et rhizome</i> .	<b>27</b>
<b>Figure 16</b> : ail <i>Allium sativum</i>	<b>29</b>
<b>Figure 17</b> : Structure du matériau encapsulé (huile) et encapsulant.	<b>31</b>
<b>Figure 18</b> : Représentation schématique du principe général d'une technique de microencapsulation.	<b>32</b>
<b>Figure 19</b> : Exemple de coacervation complexe ( <b>Abdellaoui, 2018</b> )	<b>34</b>
<b>Figure 20</b> : situation géographique de la wilaya de Tlemcen	<b>35</b>
<b>Figure 21</b> : Station de Bouhanak	<b>36</b>
<b>Figure 22</b> :Moyennes mensuelles et annuelles des précipitations de la station de Zenata (1989-2018).	<b>37</b>
<b>Figure 23</b> : Moyennes mensuelles et annuelles des températures de la station de Zenata (1989-2018).	<b>38</b>
<b>Figure 24</b> : Diagramme ombrothermique de Bagnouls et Gausson de la station de Zenata (1989-2018).	<b>40</b>
<b>Figure 25</b> : Climagramme d'Emberger de Zenata (Période allant de 1989 à 2018)	<b>41</b>

<b>Figure 26:</b> Technique de microculture ( <b>Harris, 1989</b> )	<b>46</b>
<b>Figure 27 :</b> Montage d'hydrodistillation type Clevenger	<b>47</b>
<b>Figure 28 :</b> Réaction entre le radical libre DPPH• et l'antioxydant.	<b>49</b>
<b>Figure 29.</b> Procédé de coacervation complexe utilisant de la gélatine et de la gomme arabique comme polymères.	<b>53</b>
<b>Figure 30 :</b> protocole expérimental	<b>55</b>
<b>Figure 31:</b> Variation du nombre moyen de piqûres en fonction des dates	<b>57</b>
<b>Figure 32 :</b> Variation du nombre moyen de trous de sortie en fonction des dates	<b>57</b>
<b>Figure 33 :</b> Fluctuations du nombre moyen des piqûres et de trous de sortie par date	<b>59</b>
<b>Figure 34:</b> CI50 des huiles essentielles déterminées par la méthode DPPH•	<b>66</b>
<b>Figure 35 :</b> Activité insecticide de <i>Ammoides verticillata</i> contre les différents stades de la mouche de l'olive <i>Bactrocera oleae</i>	<b>69</b>
<b>Figure 36:</b> CL50 de l'huile essentielle de <i>A. verticillata</i> sur L3, pupes et adulte de <i>Bactrocera oleae</i>	<b>70</b>
<b>Figure 37:</b> Activités antibactériennes de l'huile essentielle de <i>Ammoides verticillata</i> contre <i>Candida albicans</i> ; <i>Staphylococcus aureus</i> ; <i>Bacillus cereus</i> et <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<b>72</b>
<b>Figure 38 :</b> Activités antifongiques des huiles essentielles de <i>A. verticillata</i> , <i>A. sativum</i> et <i>C. longa</i> sur les quatre souches fongiques	<b>78</b>
<b>Figure 39 :</b> Activités antifongiques des mélanges d'huiles essentielles	<b>81</b>
<b>Figure 40 :</b> Les effets protecteurs des huiles essentielles <i>A. sativum</i> et <i>C. longa</i> se mélangent après dix jours de stockage à $25 \pm 1$ ° C	<b>82</b>
<b>Figure 41:</b> émulsion contenant l'HE, gélatine G et gomme arabique GA	<b>85</b>
<b>Figure 42 :</b> Microcapsules (contenant l'HE) après séchage	<b>86</b>
<b>Figure 43 :</b> Etapes de la formation des microparticules par coacervation complexe (Photo originale prise par microscope optique G*40)	<b>87</b>
<b>Figure 44 :</b> Huile essentielle encapsulée par la gomme arabique et la gomme d'amandier	<b>88</b>
<b>Figure 45 :</b> Relargage de l'HE de <i>Ammoides verticillata</i> par les microcapsules à 22°C.	<b>88</b>

## Liste des abréviations

***B.oleae*** : *Bactrocera oleae*

***O.europea*** : *olea europea*

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

***A. sativum*** : *Allium sativum*

***C. longa*** : *Curcuma longa*

**GC-MS** : chromatographie en phase gazeuse couplée à une spectrométrie de masse

**HE** : Huile essentielle

***P. aeruginosa*** : *Pseudomonas aeruginosa*

***S.aureus*** : *Staphylococcus aureus*

***B.cereus*** : *Bacillus cereus*

***C. albicans*** : *Candida albicans*

***P. expansum*** : *Penicillium expansum*

***F. solani*** : *Fusarium solani*

***R. stolonifera*** : *Rhizopus stolonifera*

***A. alternata*** : *Alternaria alternata*

**G/ GA** : Gélatine/Gaumme arabique

**DMSO** : Diméthylsulfoxyde

**GN** : Gélose nutritive

**HCl** : Chlorure d'hydrogène

**NaOH** : Hydroxyde de sodium

**PDA** : Potatos Dextros Agar

# Table des matières

Introduction	2
<i>Synthèse bibliographique</i>	
I-Présentation de la plante hôte	04
1. Description botanique de la plante	04
1.1. Taxonomie de l'olivier (Cronquist, 1981)	04
1.2. Morphologie de l'olivier	05
1.2.1. Système racinaire	05
1.2.2. Tronc	06
1.2.3. Feuilles	06
1.2.4. Fleurs	06
1.2.5. Fruit ou drupe	07
1.3. Cycle végétatif	07
1.4. Exigences de l'olivier	09
1.4.1. Climat	09
1.4.2. Températures	09
1.4.1. Eau	10
1.4.2. Lumière	10
1.4.3. Exigences pédologiques	10
1.5. Répartition géographique de l'olivier	10
2. Bioagresseurs de l'olivier	12
<b>II. La mouche de l'olive <i>Bactrocera oleae</i> Gmel.</b>	
1. Description	14
2. Biologie et cycle de développement	15
3. Facteurs favorisant le développement de la mouche de L'olive	16
4. Dégâts	17
5. Lutte contre <i>Bactrocera oleae</i>	17
a. Lutte intégrée (IPM)	18
b. Lutte chimique	18
<b>III. Les huiles essentielles</b>	
1. Composition chimique des huiles essentielles	20
1.2. Les monoterpènes	20

1.3. Les sesquiterpènes	20
1.4. Phénols et phényles propanoïdes	21
1.5. Molécules aliphatiques non terpénoïdes	21
2. Activité antioxydante des huiles essentielles	22
3. Activité antifongique et antibactérienne des huiles essentielles	22
4. Effets synergiques, additifs et antagonistes des mélanges alimentaires sur . les capacités antioxydantes et antifongiques totaux	23
<b>IV. Les plantes étudiées</b>	<b>25</b>
1. <i>Ammoïdes verticillata</i>	25
1.1. Présentation de la plante	25
1.2. Caractéristiques générales des Apiacées	25
1.3. Nom scientifique	26
1.4. Composition chimique	26
1.5. Utilisation thérapeutique	26
2. <i>Curcuma longa</i>	27
2.1. Présentation de la plante	27
2.2. Nom scientifique	28
2.3. Composition chimique	28
2.4. Utilisation thérapeutique	28
3. <i>Allium sativum</i>	28
3.1. Présentation de la plante	28
3.2. Nom scientifique	29
3.3. Composition chimique	29
3.4. Utilisation thérapeutique	29
<b>V. Micro-encapsulation des huiles essentielles</b>	<b>30</b>
1. Définition de l'encapsulation	30
2. Intérêt de l'Encapsulation	30
3. Les formes galéniques obtenues	31
4. Techniques de Micro-encapsulation de l'huile essentielle	32
5. Coacervation	32
5.1. Principe	32
5.2. Usage	33

## *Matériels et Méthodes*

<b>PRESENTATION DE LA ZONE D'ETUDE</b>	<b>35</b>
<b>1. Situation géographique</b>	<b>35</b>
<b>1.1. Situation géographique de la wilaya de Tlemcen</b>	<b>35</b>
<b>1.2. Situation géographique de la station d'étude</b>	<b>36</b>
<b>2. Etude bioclimatique</b>	<b>36</b>
<b>2.1. Paramètres climatiques</b>	<b>37</b>
<b>2.1.1. Précipitations</b>	<b>37</b>
<b>2.1.2. Températures</b>	<b>38</b>
<b>2.2. Synthèse bioclimatique</b>	<b>39</b>
<b>2.2.1. Diagramme ombrothermique de Bagnouls et Gaussen (1953)</b>	<b>39</b>
<b>2.2.2. Quotient pluviothermique d'Emberger</b>	<b>40</b>
<b>3. Etude entomologique</b>	<b>42</b>
<b>3.1. Echantillonnage des olives</b>	<b>42</b>
<b>3.2. Estimation du taux d'infestation</b>	<b>43</b>
<b>3.3. Analyse statistique des données</b>	<b>43</b>
<b>3.3.1. Analyse de variance et autres tests utilisés</b>	<b>43</b>
<b>3.3.2. Corrélation et régression</b>	<b>43</b>
<b>4. Etude mycologique</b>	<b>44</b>
<b>4.1. Purification des souches fongiques isolées</b>	<b>45</b>
<b>4.2. Identification des moisissures</b>	<b>45</b>
<b>5. Matériel végétal</b>	<b>46</b>
<b>5.1. Choix des plantes</b>	<b>46</b>
<b>5.2. Collecte du matériel végétal</b>	<b>46</b>
<b>5.2.1. Procédés d'extraction des huiles essentielles</b>	<b>47</b>
<b>5.2.2. Conservation des huiles essentielles</b>	<b>47</b>
<b>5.2.3. Détermination du rendement en huiles essentielles</b>	<b>47</b>
<b>5.3. Analyse des huiles essentielles</b>	<b>48</b>
<b>5.3.1. Chromatographie en phase gazeuse (CPG)</b>	<b>48</b>
<b>5.3.2. Conditions CPG-SM</b>	<b>48</b>
<b>5.3.3. Identification des composés</b>	<b>48</b>
<b>6. Activité antioxydante</b>	<b>49</b>
<b>7. Activité Antimicrobienne</b>	<b>50</b>
<b>7.1. Méthode de disques</b>	<b>51</b>

7.2. Détermination des CMI et CMB	52
8. Procédé d'encapsulation par coacervation complexe	52
8.1. Matériel et produits chimiques	52
8.2. Mode opératoire	53
8.3. Calcul du rendement d'encapsulation (%)	54
<b><i>Résultats et Discussion</i></b>	<b>56</b>
<b>1. Etude Entomologique</b>	<b>56</b>
1.1. Effet de la date	56
1.1.1. Effet de la date en fonction des piqûres	57
1.1.2. Effet de la date en fonction des trous de sortie	57
1.2. Corrélations entre les caractères liés à l'infestation de l'olive et la date	58
1.3. Cinétique des populations de <i>B. oleae</i> dans la station de Bouhanak	58
<b>2. Etude phytochimique</b>	<b>60</b>
2.1. Caractéristiques des huiles essentielles extraites	60
2.2. Rendement en huiles essentielles des plantes étudiées	60
2.3. Composition chimique des huiles essentielles étudiées	61
<b>3. Pouvoir antioxydant</b>	<b>65</b>
3.1. Evaluation des propriétés antioxydantes des trois huiles essentielles	65
3.2. Piégeage du radical libre DPPH•	65
3.3. Matrice croisée	66
<b>4. Activité antiparasitaire de L'huile essentielle de <i>Ammoides verticillata</i> sur <i>Bactrocera oleae</i></b>	<b>69</b>
<b>5. Activité antibactérienne de l'huile essentielle de <i>Ammoides verticillata</i></b>	<b>72</b>
5.1. Méthode de disque	72
5.2. Méthode de microdilution	73
<b>6. Activités antifongiques combinatoires des huiles essentielles de <i>Ammoides verticillata</i>, <i>Allium sativum</i> et <i>Curcuma longa</i></b>	<b>76</b>
6.1. Activités antifongiques in vitro des huiles essentielles individuelles et combinées	76
6.1.1. Activité antifongique in vitro des huiles essentielles individuelles	76
6.1.2. Etude de l'effet synergique	79
6.2. Activité antifongique in vivo des huiles essentielles combinées	82

<b>7. Micro-encapsulation de l'huile essentielle de <i>Ammoides verticillata</i></b>	<b>85</b>
<b>7.1. Observation visuelle</b>	<b>85</b>
<b>7.2. Etapes de la formation des microparticules par coacervation complexe</b>	<b>86</b>
<b>7.3. Caractérisation des capsules</b>	<b>86</b>
<b>7.4. Étude du relargage de l'huile de <i>Ammoides verticillata</i> à température     . ambiante</b>	<b>88</b>
<b>7.5. Efficacité de l'encapsulation</b>	<b>90</b>
<b>7.6. Interprétation</b>	<b>90</b>
<b><i>Conclusion</i></b>	<b>92</b>
<b><i>Référence bibliographique</i></b>	<b>95</b>

---

# INTRODUCTION

---

# INTRODUCTION

---

L'olivier, *Olea europea* est l'un des arbres les plus caractéristiques de la région méditerranéenne ; un arbre chargé de symboles : de paix et de réconciliation, de victoire, de force et de fidélité, de longévité et d'espérance, comme il a une grande importance nutritionnelle, sociale et économique pour les peuples de cette région où il est largement distribué (**Gaouar, 1995**).

L'olivier est exposé à un complexe parasitaire très diversifié : ravageurs, oiseaux, maladies cryptogamiques, bactériennes et plantes parasites. L'ensemble des maladies de l'olivier entraîne des chutes de rendement considérables et représente une menace pour l'oléiculture.

*Bactrocera oleae* est considéré comme l'un des ravageurs les plus redoutables parmi les insectes nuisibles, attirant l'attention de tous les oléiculteurs, notamment en Algérie (**Gaouar et Debouzie, 1991; Gaouar, 1996 ; Bouktir, 2003 ; Hamiche, 2005**).

Ce phytophage transmet également des champignons et bactéries provoquant la pourriture des fruits. En effet, en se nourrissant, les larves de ce phytophage créent des galeries à travers le fruit ; la destruction et la consommation de la pulpe permettent l'accès et le développement de ces bioagresseurs qui déprécient la qualité de l'huile d'olive (**Athar, 2005**).

La recherche des alternatives biologiques et naturelles aux pesticides est une grande préoccupation pour l'industrie alimentaire, principalement en raison des pertes post-récolte importantes qui se produisent en raison de la contamination fongique. En même temps, les agences et les organisations de protection de l'environnement expriment leur inquiétude à propos de l'utilisation généralisée des fongicides de synthèse qui contaminent le sol et l'eau et laissent des résidus toxiques qui pourraient affecter les cultures ainsi que les consommateurs. D'un point de vue santé, le plus grand danger est associé au développement des champignons est leur capacité à produire des mycotoxines. La possibilité d'utiliser des composés extraits de plantes ou leurs extraits entiers pour contrôler la contamination par les mycotoxines est une alternative prometteuse.

Le fait d'utiliser des plantes qui ont été historiquement employées par la médecine alternative, dont la sécurité est avérée, renforce la confiance chez les consommateurs qui sont de plus en plus intéressés à obtenir des « produits verts » et « bio ». Il induit également un avantage économique supplémentaire en raison de la possibilité de fournir une utilisation pour une large gamme de plantes.

De nombreuses études ont été consacrées à la recherche de produits naturels ayant une activité antimicrobienne, surtout fongicide ; cependant, l'activité insecticide des huiles essentielles a été peu étudiée, ce qui nous incite à effectuer ce travail afin de savoir si l'on peut utiliser certaines huiles essentielles pour lutter contre la mouche de l'olive, l'un des ravageurs des plus importants au monde.

Pour contribuer à une gestion durable de l'environnement, la mise en place de nouvelles alternatives de contrôle des insectes est davantage encouragée et justifie l'élaboration de ce travail afin d'évaluer l'activité insecticide, larvicide, fongicide et bactérienne des huiles

# INTRODUCTION

---

essentielles des plantes médicinales aromatiques sur *Bactrocera oleae*, la mouche de l'olive et la flore microbienne qui l'accompagne.

Pour toutes ces raisons, nous avons jugé utile d'étudier les infestations du ravageur *Bactrocera oleae* dans un verger situé à Bouhanak (wilaya de Tlemcen) ainsi que des champignons et bactéries pathogènes dont l'installation est favorisée par les attaques de ce phytophage. Nous avons testé l'efficacité insecticide et fongicide des huiles essentielles de trois plantes aromatiques locales sur ces bioagresseurs de l'olive.

Les huiles essentielles HE de *Ammoides verticillata*, *Curcuma longa* et *Allium sativum* possèdent d'importantes propriétés biologiques telles que des activités antibactériennes et antioxydantes (**Robak et Gryglewsky, 1988 ; Zhang et al., 2017 ; Dosoky et al., 2018**). Dans ce travail nous avons évalué les propriétés antioxydantes et antifongiques des mélanges des huiles essentielles de ces trois plantes.

Par ailleurs, nous avons testé les activités insecticides et bactériennes de l'huile essentielle de *Ammoides verticillata* (Nounkha), la plante endémique de notre région, souvent utilisée en médecine traditionnelle. Après avoir obtenu des résultats très intéressants sur les activités biologiques de cette HE et en vue de l'obtention d'un produit multifonctionnel (engrais, insecticide, fongicide...), nous avons procédé à son encapsulation par coacervation complexe, en utilisant la gomme arabique et la gomme d'amandier comme polysaccharide.

C'est la première fois que l'encapsulation de l'huile essentielle d'*Ammoides verticillata* par coacervation complexe a été effectuée.

Cette encapsulation consiste à créer une membrane, qui isole le principe actif (huile essentielle) du milieu environnant, la protégeant ainsi efficacement de tout facteur dégradant tels que : la radiation lumineuse ou thermique, l'agression chimique, l'incompatibilité avec d'autres produits... (**Benali et al., 2018**). En effet, les formulations poudreuses obtenues par cette technique présentent une meilleure protection des principes actifs et de leurs périodes d'action comparées à celle des huiles essentielles brutes.

Le but de ce présent travail a été de déterminer :

- Les taux d'infestation des olives de notre région comme préalable aux activités insecticides des huiles essentielles des plantes étudiées ;
- la composition chimique des huiles essentielles de chaque plante par CPG et CPG-SM ;
- le pouvoir antioxydant des huiles essentielles par les tests de DPPH ;
- les activités antibactériennes testées sur quatre souches bactériennes pathogènes ;
- les effets synergiques des combinaisons doubles et triples des huiles essentielles des trois plantes et leurs activités antifongiques sur quatre champignons responsables de la pourriture des fruits in-vivo et in-vitro ;

# INTRODUCTION

---

- la micro-encapsulation par coacervation complexe de l'huile essentielle d'*A. verticillata* pour une meilleure conservation et un relargage optimisé.

L'objectif du présent travail vise d'un côté à valoriser nos ressources naturelles et de l'autre, à préserver l'environnement et la santé, en proposant des alternatives aux pesticides dont la nocuité est démontrée tout en préservant les composés aromatiques des huiles essentielles contre la dégradation thermique et leur volatilité par la micro-encapsulation.

# *CHAPITRE I :*

---

## *SYNTHESES BIBLIOGRAPHIQUE*

---

## I-Présentation de la plante hôte

Depuis des millénaires, l'olivier est cultivé dans le Bassin méditerranéen où il marque le paysage de sa silhouette si caractéristique. Arbre sacré, il a inspiré aussi bien les grands textes religieux fondateurs (Bible, Torah, Coran) que les peintres et les poètes (**Breton et al., 2006**).

L'olivier est la deuxième plus importante culture fruitière et oléagineuse à travers le monde, après le palmier à huile.

Sa culture est liée à la région méditerranéenne où il revêt une grande importance économique, sociale et écologique. En effet, 95% des oliveraies mondiales se concentrent dans cette région, assurant l'essentiel de la production mondiale. Comme conséquence des effets bénéfiques de l'huile d'olive sur la santé humaine, l'intérêt pour cette culture est grandissant, la consommation de l'huile d'olive s'est développée aussi dans les pays traditionnellement non producteurs comme les USA, l'Australie et le Japon (**Pineli et al., 2003**).

L'Algérie fait partie des principaux pays méditerranéens dont le climat est propice à sa culture. Durant les trente années qui ont suivi l'indépendance, l'oléiculture fut abandonnée et le paysan livré à lui-même. Malgré une prise de conscience salvatrice, quoique tardive, l'évolution des plantations est insignifiante ; en 10 ans on a planté moins de 50.000 arbres, soit moins de 5000 oliviers par an.

Actuellement, un programme de plantation en intensif a été mis en œuvre pour rattraper le retard accusé par l'Algérie dans le domaine de l'oléiculture par rapport aux autres pays du Maghreb, et ce, en dépit de la disponibilité des ressources naturelles considérables lui permettant d'occuper une place de choix sur le marché mondial.

### 1. Description botanique de la plante

L'olivier appartient à l'ordre des Ligustrales et à la famille des Oléacées ; cette famille comportant environ 30 genres et 600 espèces dont les lilas (*Syringae*), Forsythia et troènes (*Ligustrum*), les frênes (*Faxinus*) et le Phillyrea (**Lousert et Brousse, 1978**).

#### 1.1. Taxonomie de l'olivier (Cronquist, 1981)

**Embranchement** : Magnoliophyta

**Sous-embranchement** : Magnoliophytina

**Classe** : Magnoliopsida

**Sous-classe** : Asteridae

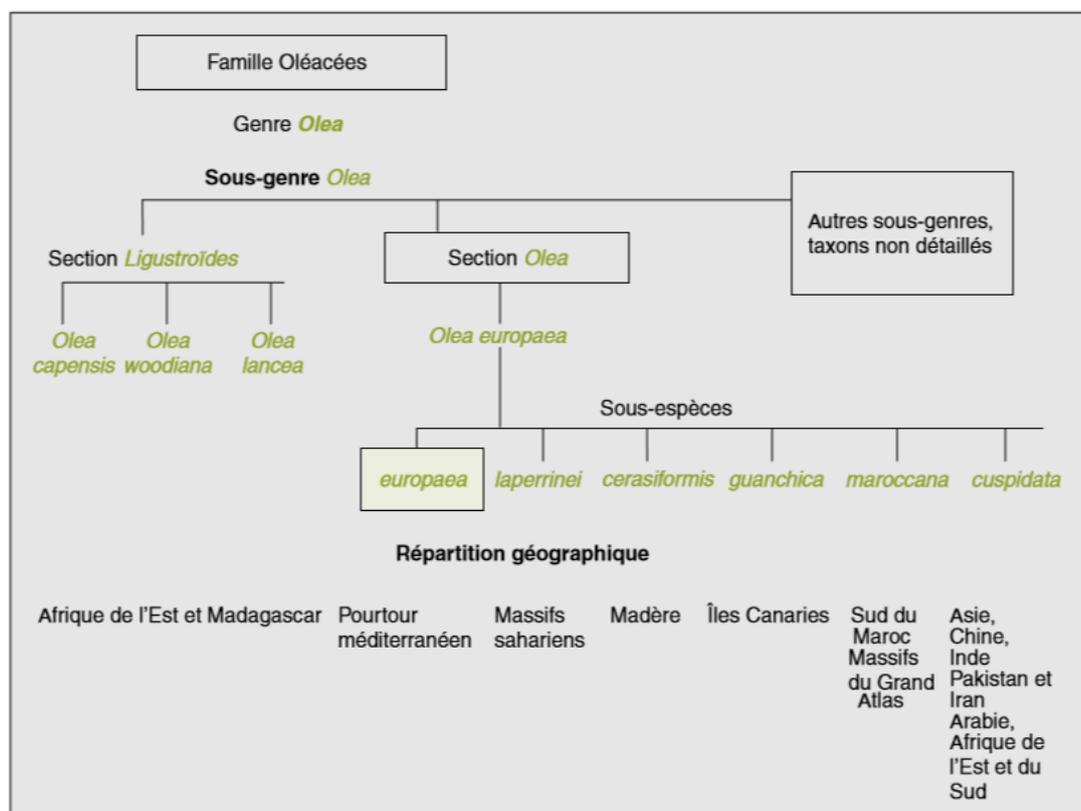
**Ordre** : Scrophulariales

**Famille** : Oleaceae

**Genre** : *Olea*

**Espèce** : *Olea europaea* L.

Sous-espèces : *Olea europaea* L. ssp. *Sativa* Hoffm. et Link (= *O. europaea* L. ssp. *Europaea*), *Olea europaea* L. ssp. *Oleaster* Hoffm. et Link (= *O. europaea* L. ssp. *sylvestris* Miller) (Figure 1).



**Figure 1** : Schéma de la taxonomie du genre *Olea* (*Oleaceae*,) simplifiée et répartition géographique des taxons (Breton et al., 2006).

## 1.2. Morphologie de l'olivier

Arbre fruitier se distinguant des autres espèces par sa pérennité et sa grande longévité, il est réputé pour sa grande rusticité et sa plasticité, lui permettant de se développer dans différentes conditions de milieu et de climat.

### 1.2.1. Système racinaire

Le système racinaire est fonction des conditions du sol et du mode de multiplication. Il est pivotant s'il est issu de semis et dans des terres légères ; fasciculé s'il est obtenu par bouturage et dans des

terres lourdes. Selon **Benrouina (2001)**, le nombre de racines et leur étendue à différentes profondeurs du sol sont fortement dépendants de la nature du sol. Il reste généralement localisé à une profondeur de 50 à 70cm.

Le système racinaire de l'olivier arrive à former sous le tronc une souche ligneuse très importante appelée "matte" ou "cépée" dans laquelle s'accumule d'importantes quantités de réserves qui lui permettent de résister aux conditions difficiles.

### **1.2.2. Tronc**

C'est le principal support de l'arbre, qui va du collet au niveau du sol jusqu'au point d'insertion de la première branche. Il est d'aspect et de couleur variables selon l'âge. Chez les jeunes arbres, le tronc est droit, circulaire, lisse, de couleur gris-verdâtre. En vieillissant, il devient noueux, crevassé, élargi à la base en prenant une couleur gris foncé presque noire.

Le tronc qui atteint parfois 10 à 20 mètres de circonférence et 12 mètres de hauteur, est recouvert d'une écorce brun-grisâtre, lisse chez les jeunes, et plus ou moins crevassée sur les vieux pieds d'oliviers. Il peut vivre plusieurs centaines d'années.

### **1.2.3. Feuilles**

Les feuilles de l'olivier sont entières et lancéolées, disposées sur les branches avec un pétiole de courte taille ; comme chez toutes les Oléacées, elles sont opposées (Figure 3). Même si la forme générale est lancéolée, ses proportions varient des ovales à presque linéales, selon la variété.

Leur couleur peut aussi varier, on observe des variétés avec des feuilles de couleur vert brillant et d'autres de tonalités plus foncées. Dans l'envers, la couleur varie entre des tonalités grises argentées et d'autres plus châtaines, dues à la présence des poils étoilés dans cette position.

Ce sont des feuilles persistantes avec une durée moyenne de 2 à 3 ans. Leur taille varie entre 3 et 8 cm de longueur et 1 à 2,5 de largeur. Elles sont habituellement très rigides et présentent un nerf central très marqué.

### **1.2.4. Fleurs**

Les fleurs sont blanches avec une corolle, deux étamines, un calice à quatre pétales ovales et un ovaire de forme arrondie qui porte un style assez épais et terminé par un stigmate (Figure 2). Cet ovaire contient deux ovules. Les fleurs sont regroupées en petites grappes de 10 à 20, poussant à l'aisselle des feuilles au début du printemps. La plupart des oliviers sont auto-fertiles, c'est-à-dire que leur propre pollen peut féconder leurs propres ovaires. La fécondation se fait principalement

par le vent et ne dure qu'une petite semaine par an. S'il ne pleut pas trop durant cette période, 5 à 10% des fleurs produiront des fruits pour une bonne production.



**Figure 2:** Fleurs de l'olivier

### **1.2.5. Fruit ou drupe**

Le fruit de l'olivier appelé olive est une drupe à mésocarpe charnu, riche en lipides dont on extrait l'huile. Il est recouvert par un péricarpe lisse et un noyau ou endocarpe fusiforme, très dur, protégeant l'amande. A maturité, l'épicarpe passe de la couleur vert tendre (olive verte) à la couleur violette ou rouge (olive tournante) puis à la coloration noirâtre (olive noire). La forme du fruit peut être sphérique, ovoïde ou ovoïde-allongé. Celle de l'endocarpe est sphérique, ovoïde, elliptique ou allongée (Figure 3). La forme et la dimension du fruit et du noyau ainsi que le nombre de sillons sont des caractéristiques variétales. **Fontanazza et Baldoni (1990)** signalent que la longueur du fruit et celle du noyau sont les caractères les plus héréditaires.



**Figure 3:** Feuilles et fruits de l'olivier

### **1.3. Cycle végétatif**

Le déroulement annuel du cycle végétatif de l'olivier est en étroite relation avec les conditions climatiques de son aire d'adaptation, caractérisée essentiellement par le climat méditerranéen.

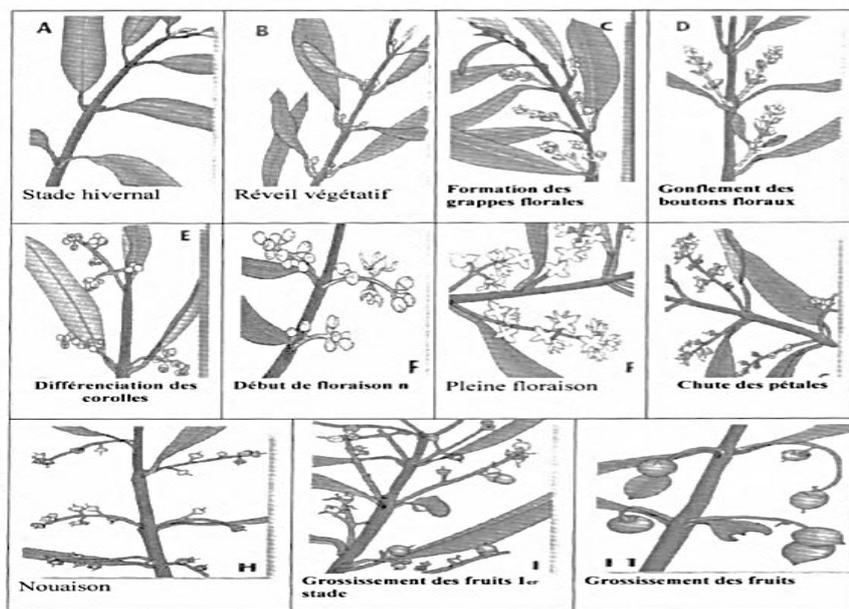
Après la période de ralentissement des activités végétatives (repos hivernal) qui s'étend de novembre à février, le réveil printanier (mars-avril) se manifeste par l'apparition de nouvelles pousses terminales et l'éclosion de bourgeons axillaires ; ces derniers, bien différenciés, donneront soit du bois (jeunes pousses), soit des fleurs (**Loussert et Brousse, 1978**).

Au fur et à mesure que la température printanière s'adoucit, que les jours s'allongent et l'inflorescence se développe; la floraison a lieu en mai-juin.

C'est en juillet-août que l'endocarpe se sclérifie (durcissement du noyau). Les fruits grossissent pour atteindre leur taille normale fin septembre-octobre. Suivant les variétés, la maturation est plus ou moins rapide.

La récolte s'effectue de la fin septembre pour les variétés précoces récoltées en vert, jusqu'en février pour les variétés tardives à huile (**ITAF, 2013**).

L'olivier ne produit naturellement qu'une année sur deux en l'absence de taille et la production s'installe lentement, progressivement, mais durablement: entre 1 et 7 ans, c'est la période d'installation improductive, dont la durée peut doubler en cas de sécheresse; jusqu'à 35 ans, l'arbre se développe et connaît une augmentation progressive de la production ; entre 35 ans et 150 ans, l'olivier atteint sa pleine maturité et sa production optimale. Au-delà de 150 ans, il vieillit et ses rendements deviennent aléatoires. Le cycle de vie de l'olivier est résumé dans la figure 4 :



**Figure 4:** Cycle de vie de l'olivier (**Argenson et al., 1999**)

**1.4. Exigences de l'olivier**

La faculté adaptative de l'olivier aux aléas de l'environnement est en étroite relation avec les qualités pédo-agrologiques du sol.

**1.4.1. Climat**

Bien que l'olivier fût introduit dans les quatre coins du monde, sa culture et ses exigences sont associées à la zone méditerranéenne, cette dernière est caractérisée par un hiver doux et humide et un été sec et chaud. Comme l'olivier ne peut pas résister à des températures inférieures à -15°C, cet isotherme délimite sa zone de culture en latitude (entre 22 et 45° dans l'hémisphère nord et de l'équateur au 37ème parallèle dans l'hémisphère sud) (**Baldy, 1990**).

**1.4.2. Températures**

L'olivier est un arbre thermophile, caractéristique des régions tempérées, malgré son aptitude à supporter les températures élevées de l'été (avec alimentation hydrique), les températures supérieures à 40°C causeront des brûlures, endommageant l'appareil foliacé ainsi que la chute des fruits (**Loussert et Brousse, 1978**). L'olivier ne supporte pas beaucoup le froid ; en effet, les températures négatives (-5 à -6°C) peuvent être dangereuses, surtout si elles surviennent brutalement au cours du repos végétatif. Les dégâts se manifestent suite à l'impuissance du système racinaire à pomper l'eau ainsi que les nutriments vers la partie aérienne ce qui provoquerait le dessèchement de cette partie (**Baldy, 1990**).

Quelques critères thermiques concernant l'olivier au cours de son cycle de développement :

**Tableau 1** : Différents stades de développement avec leurs températures optimales (**Loussert et Brousse, 1978**).

Stade de développement	Températures
Repos végétatif hivernal (risque de gel)	-10 à -12 °c
Réveil printanier (risque de gel)	-5 à -7°c
Zéro de végétation	9 à 10°c
Développement des inflorescences	14 à 15°c
Floraison	18 à 19°c
Fécondation	21 à 22°c
Arrêt de végétation	35 à 38°c
Risque de brûlure	≥ 40°c

### **1.4.3. Eau**

Les besoins hydriques de l'olivier dépendent du climat et du type de sol de la région, ainsi que de la réserve d'eau disponible à la fin de l'hiver.

L'olivier est un arbre typique du climat méditerranéen. Etant assez résistant à la sécheresse, il est traditionnellement cultivé en sec. Toutefois, sa production augmente considérablement lorsque des apports d'eau viennent compléter les pluies, en particulier dans les zones de faible pluviométrie. Dans le cas de la conduite en sec et dans les conditions méditerranéennes, l'olivier ne peut s'adapter à l'irrégularité du régime hydrique qu'en puisant en profondeur du sol le peu d'humidité qu'il peut contenir (**Loussert et Brousse, 1978**).

### **1.4.4. Lumière**

Avec une bonne exposition au soleil, l'olivier présente un meilleur développement et donne de meilleurs rendements. La lumière est un facteur déterminant au cours de la floraison. Selon **Daoudi (1994)**, l'évolution florale est inhibée sur les arbres qui ne reçoivent pas assez de lumière.

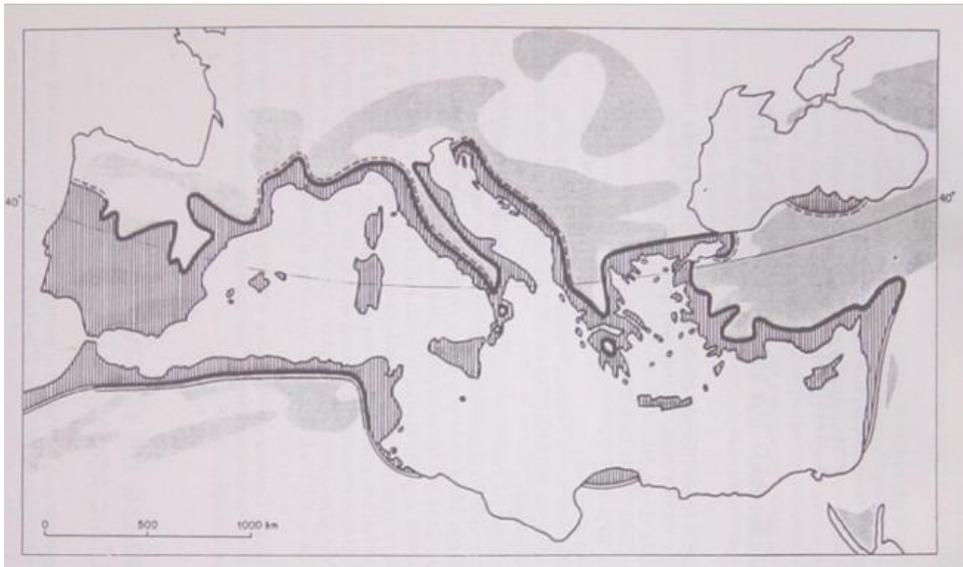
### **1.4.5. Exigences pédologiques**

L'olivier est réputé comme étant une espèce peu exigeante en qualité de sol. Il s'adapte à une large gamme de types de terres à condition qu'ils ne soient pas très compacts ou mal drainés (**James et al., 1985**). Dans les régions peu pluvieuses, l'olivier ne donne de bons résultats que s'il est planté dans des sols profonds et sablonneux où le système racinaire peut se développer verticalement et horizontalement.

## **1.5. Répartition géographique de l'olivier**

Dans le monde, il y'a environ 840 millions d'oliviers (Fig. 5) qui produisent selon les années entre 2 et 2.5 millions de tonnes d'huile et 700 000 tonnes d'olives de table.

Plus des trois quarts des oliveraies (650 millions d'oliviers) sont plantées en Europe, dans les pays du pourtour méditerranéen: Espagne, Italie, Grèce, Portugal, France, Turquie (**DSA, 2007**).



**Figure 5 : Répartition de l'olivier dans la Méditerranée (Amouretti, 1989)**

Limites dues :

Au froid ———

À l'humidité - - - -

À la sécheresse — · —

### **En Algérie :**

En 2008, la culture de l'olivier en Algérie occupait une superficie de 309500 hectares (Figure 6).

L'oléiculture est présente sur l'ensemble du territoire d'est en ouest et du nord au sud (jusqu'à Tamanrasset). La surface oléicole est répartie dans quatre régions :

- Le Centre avec 56 % de la superficie totale soit 148 385 ha ;
- L'Est avec 23 % soit 60 010 ha ;
- L'Ouest avec 19 % soit 50 193 ha, dont la plupart est destinée à la production d'olive de table,
- Le Sud, 2% avec une superficie de 4 764 ha.

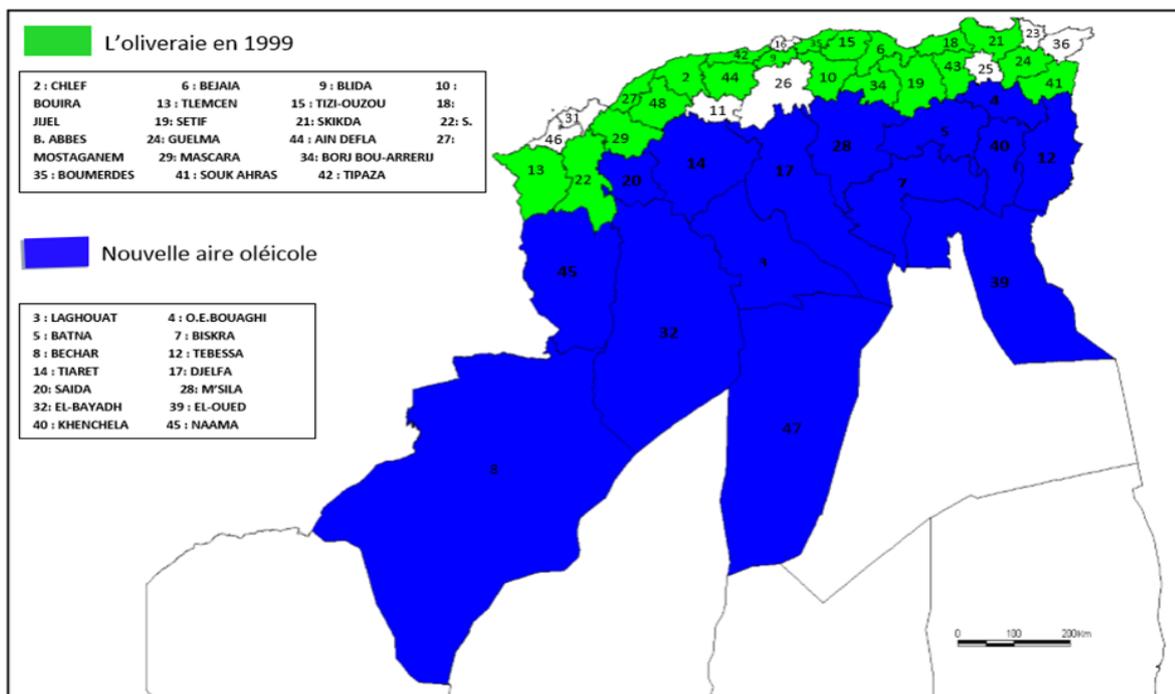


Figure 6 : Carte oléicole d'Algérie (Source : Institut Technique des Arbres Fruitiers ITAF, 2008)

La wilaya de Tlemcen, considérée comme une région oléicole, possède 923.815 oliviers répartis sur une superficie de 6.839 Ha. Les variétés qui se trouvent à Tlemcen sont : Sigoise, Verdal, Conicabra, Sevillane et Chemlal.

Le nombre d'arbres en production est de 788.334 dont 214.979 en isolé et 571.555 en masse. Le rendement à l'hectare pour 2011/2012 est estimé à 25 quintaux. En superficie plantée en oliviers, c'est la région de Maghnia (1.63 ha) qui se taille la part du lion, suivie de Remchi (1.083 ha), Sabra (1.060 ha), Beni-Snous (548 ha), Chetouane (441 ha), Bensekrane (319 ha), Fellaoucène (310 ha), Mansourah (304 ha), Ouled Mimoun (260 ha), Hennaya (255 ha), Bab El Assa (163 ha) et Aïn Tellout (116 ha) (DSA, 2013).

## 2. Bioagresseurs de l'olivier

Les maladies et les prédateurs de l'olivier sont très courants dans les régions septentrionales de la Méditerranée ; la mouche de l'olive étant son pire ennemi. Lors des périodes estivales, elle dévore les fruits et fait augmenter l'acidité de l'huile. Très redoutés, les étourneaux n'hésitent pas à dépouiller entièrement l'arbre de ses fruits. Les autres prédateurs sont la teigne et la cochenille noire. Des champignons attaquent aussi l'olivier, la présence du *Cyclonium* ou « œil de paon »

entraîne une défoliation importante ; pour les combattre efficacement, l'oléiculteur doit constamment surveiller ses arbres (Bonnier, 1990).

**Tableau 2 : Principales maladies de l'olivier Selon Argenson et al. (1999)**

Les maladies	Les causes	Les symptômes et dégâts
<i>Capnodium oleaginum</i> Fumagine ou noir de l'olivier	La fumagine (complexe des Champignons).	-L'ensemble du végétal recouvert d'une sorte de poussières noires. -La fonction chlorophyllienne des feuilles peut être stoppée
( <i>Cycloconium oleaginum</i> ) Eil de paon	Entraînées par le vent et la pluie, les conidies (organes microscopiques qui permettent la diffusion de la maladie) émettent des zoospores qui provoquent la maladie.	-La défoliation peut compromettre non seulement la récolte de l'année mais également la vie de l'arbre -Provoque la chute des fruits. -Provoque la chute des feuilles.
<i>Saissetia oleae</i> Bern Cochenille noire	Forte population de cochenilles	-Affaiblit l'arbre.
<i>Prays oleae</i> Bern. La Teigne de l'olivier	La teigne	-La consommation des organes floraux rend toute la fécondation impossible pour les fruits ; les dégâts se manifestent par deux chutes successives.
<i>Verticillium dahliae</i> La verticilliose	Champignon pathogène du sol	-Les feuilles s'enroulent longitudinalement en gouttière vers la face inférieure, leur coloration vert gris brillant vire au gris terne. - feuilles sèches et cassantes
Pourridié <i>Armillariella mellea</i>	Champignon dont le mycélium forme un réseau de fils blancs	-Maladie mortelle pour l'olivier -un réseau de fils blanc-crème ressemblant à des racines, s'installe entre l'écorce et le bois des racines et du collet.

**Principal ravageur :**

	La mouche de l'olivier	-Perte de récolte par la chute des fruits -Diminution du rendement en huile et détérioration de la qualité de l'huile par augmentation de son acidité.
--	------------------------	---

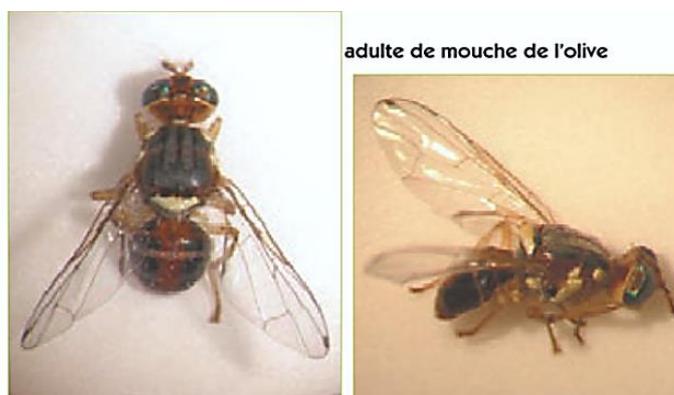
## II. La mouche de l'olive *Bactrocera oleae* Gmel.

La mouche de l'olive est le principal ravageur de l'olivier. Cet insecte peut causer des dégâts considérables, jusqu'à 100% d'olives abîmées et inutilisables. La période la plus critique se situe en septembre-octobre, mais la mouche est présente dès le mois de juin dans les vergers en zones précoces et réalise 4 à 5 générations, jusqu'à la fin octobre et parfois la mi-novembre. Il n'existe pas de solution unique de lutte contre ce ravageur, les techniques s'orientent vers une alternance des produits, l'utilisation de produits préventifs ou la conjugaison de plusieurs méthodes.

### 1. Description

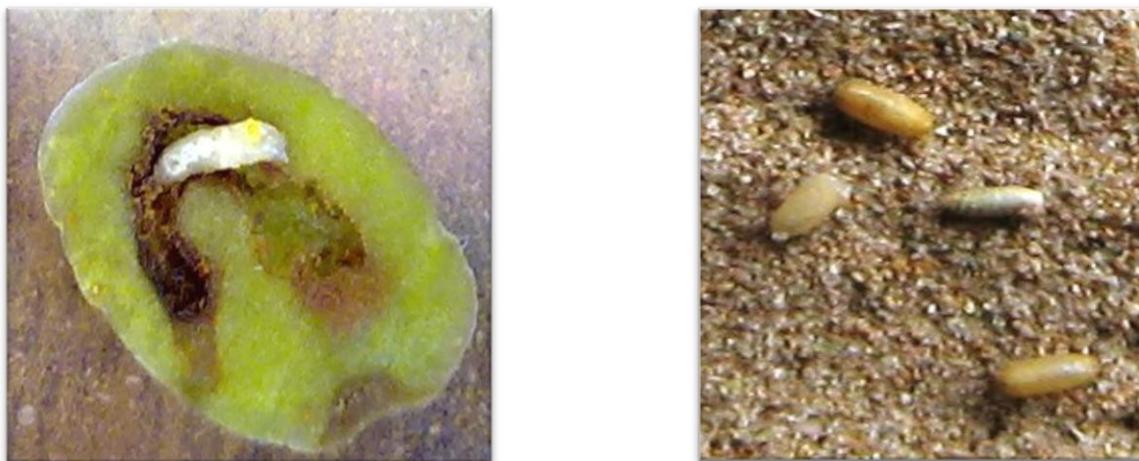
La mouche de l'olive *Bactrocera oleae* fait partie de la classe des insectes, de l'ordre des Diptères et de la famille des Tephritidae. Dans cette famille, on trouve bon nombre de mouches, ravageuses de fruitiers : la mouche de la cerise (*Ragoletis cerasi*), la mouche méditerranéenne des fruits (*Ceratitis capitata*), la mouche du brou du noyer....etc...

- L'adulte mesure 4 à 5 mm de long. La tête est orangée avec des yeux à facettes bleu-vert. Le thorax est noir avec des bandes grisâtres sur le dos et se termine par un triangle blanc-crème. Les pattes sont orangées. L'abdomen est également orange avec des taches noires. Les ailes sont transparentes, avec un point noir à leur extrémité, caractéristique de l'espèce (Figure 7). Le mâle et la femelle ont la même taille. La femelle possède seulement un abdomen un peu plus large et un ovipositeur de ponte à l'extrémité de celui-ci (Figure 7). La durée de vie est de 30 à 90 jours.



**Figure 7:** Stades adultes de la mouche *Bactrocera oleae* /source ([www.afidol.org](http://www.afidol.org)).

- L'asticot mesure à la fin de son développement jusqu'à 7 mm de long, il est de couleur blanche. La puppe (ou nymphe) est de couleur crème à brun doré et mesure entre 3 et 4 mm de long sur 2 mm de large (Figure 8).



**Figure 8 :** Larve et pupes de *Bactrocera oleae*

## 2. Biologie et cycle de développement

A notre latitude, la mouche de l'olive passe l'hiver sous forme de puppe, dans les cinq premiers centimètres du sol. Au printemps, les adultes émergent et 4 ou 5 générations peuvent se succéder du début de l'été jusqu'au mois d'octobre à basse altitude et dans les zones précoces ; 3 à 4 générations, voire moins, dans les zones plus tardives et en altitude.

Après l'accouplement, la femelle va déposer un œuf sous l'épiderme de l'olive. La piqûre de ponte à la surface du fruit est petite (1 à 2 mm). Elle pond un œuf par fruit et a une fécondité moyenne de 300 à 400 œufs. Après quelques jours, un asticot éclot et commence à se nourrir de la pulpe de l'olive. En grossissant, cette larve crée des galeries de plus en plus importantes ; à la fin de son développement, le ver se transforme en puppe dans l'olive (nympheose). Après une dizaine de jours, un nouvel adulte émerge de la puppe (**Gaouar M., 2004**).

A l'automne, quand la larve termine son développement et que l'olive devient très mûre, elle tombe au sol et se pupéfie (Figure 9). Cette puppe est assez tolérante au froid (température minimale létale autour de 0°C) et aux produits de traitements.

Une génération dure entre 25 et 30 jours en été, depuis la ponte de l'œuf jusqu'à la maturité sexuelle des femelles adultes. Cette durée de développement augmente en automne et explique en partie le chevauchement des générations observé en septembre et octobre (**Gaouar, 1995**).

Le vol des adultes, observé par piégeage, marque le début du risque de ponte. On va ainsi distinguer 3, 4 ou 5 vols de mouche ; le premier vol en début de saison (juin-juillet) correspondant



est long, chaud et caniculaire (comme ce fut le cas en 2015), la mouche se développe peu. De même, si l'hiver est long et très froid, avec beaucoup de gelées, peu de pupes survivront et les populations seront réduites. **Les zones précoces** : elles sont souvent soumises aux conditions climatiques favorables citées ci-dessus. Il s'agit du littoral et de certains bassins connaissant un microclimat particulier. En général, les zones supérieures à 300 m d'altitude, moins précoces et au climat plus rude, sont moins propices au développement important de ce ravageur.

- **irrigation** : l'apport d'eau aux oliviers permet d'obtenir des fruits plus gros, moins flétris et donc plus attirants. Par ailleurs, la mouche a besoin d'eau pour vivre ; l'irrigation lui permet de s'abreuver.

#### 4. Dégâts

Les dégâts engendrés par la mouche de l'olive sont d'ordre quantitatif et qualitatif. Le développement de la larve à l'intérieur de l'olive (Figure 10) affecte directement l'alimentation du fruit, sa maturation et sa force d'attachement au pédoncule, provoquant ainsi une chute accélérée de l'olive atteinte. Par ailleurs, en mettant la pulpe du fruit au contact de l'air lors de la sortie de l'adulte (Figure 11) et des déjections de la larve, les attaques de mouche conduisent à une altération de la qualité de l'huile, provoquant une augmentation des taux d'acidité et de l'indice de peroxyde (Madjdoub, 2011).



**Figure 10:** Galerie et piqûres de ponte      **Figure 11 :** Trou de sortie d'une pupe ou d'un adulte

#### 5. Lutte contre *Bactrocera oleae*

Afin d'assurer un contrôle adéquat des ennemis de l'olivier, on optera pour une approche globale illustrée ci-dessous :

- Connaissance de la morphologie, de la biologie et de l'écologie du ravageur ;
- observations visuelles et suivi quotidien des ravageurs ;
- installation des pièges et Monitoring du ravageur ;
- traçabilité et enregistrement des données de suivi ;
- observation des fruits au moment de la récolte.

**a. Lutte intégrée (IPM)**

La lutte contre les ravageurs de l'olivier se fera par une lutte intégrée. Ainsi, le recours à la lutte chimique n'aura lieu que si les seuils d'intervention ont été dépassés. Le monitoring et le contrôle permettront d'intervenir dès les premiers vols par :

- des lâchers d'auxiliaires (lutte biologique). Cette intervention empêche l'accouplement et la fécondation des femelles par des mâles ;
- des traitements localisés (traitement d'un tiers du verger) avec de faibles bouillies et faibles quantités en produits chimiques en intervenant dès l'apparition des ravageurs.

Ces deux interventions contribueront sensiblement à la préservation de la faune auxiliaire et à la réduction des populations des ennemis de l'olivier.

**b. Lutte chimique**

L'utilisation des traitements insecticides contre les mouches de fruit pour les désinfestations est un complément de contrôle (**kapatos, 1989**). Parmi ces traitements utilisés contre la mouche de l'olive *B. oleae* on distingue :

**❖ Lutte préventive**

La lutte préventive est réalisée dès l'apparition des premiers adultes de chaque génération (date donnée par les avertissements agricoles ou par piégeage dans la parcelle). Le principe repose sur l'utilisation d'un attractif, généralement un hydrolysate de protéine, mélange destiné à éliminer les adultes de *B. oleae*. Ce traitement présente l'avantage d'être économique et utilisable même en zone d'accès difficile ou dans les régions pauvres en eau.

Par ailleurs, les femelles ont besoin de protéines pour leur maturation sexuelle et le développement de leurs œufs ; de ce fait, l'utilisation de l'attractif protéinique dans la solution d'insecticide augmente son efficacité (**Rosler, 1989 ; Aversenq, 2000**).

**❖ Lutte curative**

Elle a été largement utilisée lorsque l'apparition des insecticides de synthèse chlorés puis organophosphorés a permis un développement de la protection phytosanitaire en oléiculture. Ces traitements se font par pulvérisation d'insecticides qui tuent les adultes par contact et les larves dans le fruit par effet semi systémique. Ils tendent à régresser actuellement en raison de leurs effets secondaires soit au niveau de l'olivier, quand ils sont utilisés par voie terrestre, soit au niveau de toute la zone oléicole traitée y compris le sol, lorsqu'ils sont réalisés par voie aérienne.

Ce traitement curatif présente l'inconvénient de détruire l'intégralité de la faune utile (**Aversenq et Pinatel, 2000**).

### III. Les huiles essentielles

Une huile essentielle ou essence végétale est un corps gras volatil et odorant obtenu par la distillation des plantes aromatiques. L'huile essentielle est présente dans les feuilles, les fleurs, l'écorce et les racines de certains végétaux. Parmi les huit cent mille espèces du monde végétal, seulement dix pour cent sont capables de synthétiser une essence (**Adlercreutz et al., 2003**).

Afin de réduire l'utilisation des insecticides et fongicides chimiques de synthèse dans les produits alimentaires, plusieurs traitements alternatifs ont été étudiés. Les métabolites produits par les plantes sont une alternative prometteuse parce que les plantes produisent une grande variété de composés, soit dans le cadre de leur développement ou en réponse à un stress ou une attaque pathogène. Au cours des dernières années, ils ont suscité de plus en plus l'intérêt, en raison de leur statut relativement sûr; ils sont facilement décomposés, respectueux de l'environnement et non phytotoxiques. Il a été prouvé que les extraits de plantes obtenus avec différents solvants et les huiles essentielles sont riches en composés potentiellement bioactifs, tels que les phytoalexines. Beaucoup sont connus pour avoir une activité antimicrobienne pour la protection des végétaux, y compris des alcaloïdes, des flavonoïdes, isoflavones, des tanins, des coumarines, des glucosides, terpènes, phénylpropanes et des acides organiques.

Les huiles essentielles sont des liquides huileux aromatiques, obtenus par hydrodistillation de matériel végétal et sont généralement des mélanges de plusieurs composants. Les huiles essentielles et extraits de plantes ont l'avantage potentiel d'être bioactifs dans leur phase vapeur, une caractéristique qui les rend attrayants comme fumigènes possibles pour la protection des produits stockés.

L'huile essentielle de *Chenopodium ambrosioides* a inhibé la croissance du mycélium de deux souches d'*Aspergillus flavus* à 100 µg/ml. Cette huile a également inhibé la croissance de *Aspergillus fumigatus*, *Botryodiplodia theobromae*, *Fusarium oxysporum*, *Phythium debaryanum* et *Sclerotium rolfsii* (**Kumar et al., 2007**). L'huile essentielle de *Peumus boldus* est active contre *Aspergillus niger*, *Aspergillus flavus* et *Fusarium* spp. (**Souza et al., 2005**). Les extraits aqueux de *Anthemis nobilis* L. et *Malva sylvestris* L. à 0,92 et 0,6 g / ml, ont respectivement inhibé la croissance de quatre champignons testés, *Aspergillus candidus*, *Aspergillus niger*, *Penicillium* sp., et *Fusarium culmorum*, *Malva sylvestris* étant la plus efficace, car une plus faible concentration a été requise pour l'inhibition fongique (**Magro et al., 2006**).

**Jasso de Rodríguez et al. (2007)** ont évalué l'activité antifongique de trois espèces de *Flourensia* ; *Flourensia microphylla* a inhibé *Alternaria* sp. de 42,5% à une concentration de 10 µl/l, atteignant 76,8% d'inhibition à 100 µl/l. l'inhibition atteint 100% à 1000 µl/l pour *Flourensia cernua* et *Flourensia retinophylla*, mais pour *Flourensia microphylla*, elle a été atteinte à 1500 µl/l.

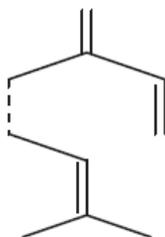
### 1. Composition chimique des huiles essentielles

Sur le plan chimique, les huiles essentielles sont des mélanges de structures extrêmement complexes, pouvant contenir plus de 300 composés différents. Ces substances sont des molécules très volatiles appartenant pour la grande majorité à la famille des terpènes comme les monoterpènes et les sesquiterpènes (**Croteau et al., 2000**).

Il y a parfois des traces de diterpènes dans les huiles essentielles à quatre unités d'isoprène, mais les triterpènes (six unités d'isoprène) sont des cires et ne se retrouvent pas dans les huiles essentielles distillées à la vapeur, car elles ne sont pas assez volatiles (**Bowles, 2003**).

#### 1.2. Les monoterpènes

Les monoterpènes contiennent deux unités d'isoprène (C<sub>10</sub>), montre un exemple de myrcène, un monoterpène commun dans les huiles essentielles (Fig. 12). La molécule de myrcène suit la règle de l'isoprène qui stipule que les unités isoprènes sont généralement jointes «tête à queue» pour constituer les squelettes carbonés des molécules de terpénoïdes (**Bowles, 2003**).



**Figure 12.** Monoterpène alpha-myrcène

#### 1.3. Les sesquiterpènes

Les sesquiterpènes contiennent trois unités d'isoprène (C<sub>15</sub>), montre le sesquiterpène (E)-bêta-farnésène, un sesquiterpène à chaîne ouverte (Fig.13). L'une des caractéristiques des sesquiterpènes est qu'ils subissent facilement des réactions créant des structures moléculaires à anneaux fermés, les formes moléculaires formées par les anneaux fermés peuvent être classées en sous-groupes de sesquiterpènes (**Bowles, 2003**).

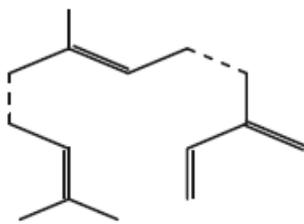


Figure 13. Sesquiterpène : (E) -bêta-farnésène.

#### 1.4. Phénols et phényles propanoïdes

Les phénols ont un groupe hydroxyle (-OH) lié au cycle et généralement une queue isopropyle. Les propanoïdes phényliques ont généralement un groupe fonctionnel méthyl éther attaché au cycle, et une queue propényle (chaîne à 3 atomes de carbone avec un C = C lié au cycle par une extrémité) (Bowles , 2003).

#### 1.5. Molécules aliphatiques non terpénoïdes

Le mot « aliphatique » décrit des molécules constituées de chaînes carbonées en ligne droite et n'ayant pas de cycle fermé ou aromatique. Des exemples de molécules aliphatiques sont les aldéhydes C<sub>8</sub>, C<sub>9</sub> et C<sub>10</sub> à odeur âcre que l'on trouve en petites quantités dans les huiles d'agrumes et les composés C<sub>6</sub> à odeur de feuilles vertes que l'on trouve dans certaines huiles florales telles que Jasmin et Rose. Les molécules aliphatiques ne se trouvent généralement qu'en quantités infimes dans les huiles essentielles, mais s'ils ont des groupes fonctionnels oxygénés, leurs odeurs sont néanmoins perceptibles (Bowles , 2003).

La notion de synergie entre les systèmes antioxydants et antibactériens est aussi une alternative très importante ; voire un procédé incontournable pour mieux sécuriser les produits vis-à-vis des germes pathogènes et contre les phénomènes d'oxydation lipidique (Sillankorva et al., 2004). De nombreux auteurs (Smith-Palmer et al., 2001 ; Pintore et al., 2002 ; Lin et al., 2004 ; Fisher et Phillips, 2006 ; Oussalah, 2006 ; Caillet et Lacroix, 2007) ont rapporté que les huiles essentielles peuvent être ajoutées pratiquement à tous les aliments.

Les substances naturelles qui présentent un large spectre d'action en pharmacologie, comme bactéricides, fongicides, acaricides, nématocides, etc., peuvent aussi être utilisées comme insecticides de remplacement. La lutte biologique prend diverses formes, mais celle qui attire l'attention des chercheurs à l'heure actuelle est la lutte biologique par l'utilisation de substances naturelles d'origine végétale comme insecticides (Boutaleb Joutei, 2010).

### 3. Activité antioxydante des huiles essentielles

Les antioxydants ont été largement utilisés pour la conservation des aliments, des antioxydants synthétiques tels que l'hydroxy anisole butylé (BHA), l'hydroxy toluène butylé (BHT), ont été couramment utilisés comme antioxydants dans divers produits.

Les préoccupations des consommateurs au sujet des effets néfastes potentiels des antioxydants synthétiques sur la santé (**Kahl et Kappus, 1993 ; Pokorn, 2007**) ont incité l'industrie à rechercher des solutions naturelles à l'oxydation et à prolonger la durée de conservation des produits alimentaires.

Les épices et les herbes sont utilisées traditionnellement depuis l'antiquité par de nombreuses cultures, non seulement comme agents aromatisants, mais également comme agents de conservation des aliments. Ils sont reconnus comme étant sûrs en raison de leur utilisation traditionnelle sans impact négatif documenté et ils sont également peu coûteux, montrent une meilleure tolérance du patient et sont facilement disponibles pour une population à faible niveau socio-économique (**Heo et al., 2007 ; Ravit et al., 2009**).

Les huiles essentielles, en tant que sources naturelles de composants phénoliques, incitent les chercheurs à évaluer leur activité en tant qu'**antioxydants** ou agents **anti-radicaux libres**.

Par exemple, les huiles essentielles de *Thymus mastichina*, *Thymus camphoratus* et *Thymus caespititiua* ont montré une activité antioxydante qui, dans certains cas, était égale à celle de l' $\alpha$ -tocophérol (**Miguel et al., 2004 ; Mimica-Dukic et al., 2004**).

### 4. Activité antifongique et antibactérienne des huiles essentielles

Les HEs peuvent représenter l'un des produits naturels les plus prometteurs pour l'inhibition fongique. Les fongicides chimiques sont largement adoptés dans les pratiques agricoles pour protéger les cultures contre les maladies ; cependant, leur utilisation a récemment suscité de plus en plus d'attention car ils sont hautement toxiques. Ils peuvent provoquer une contamination de l'environnement et/ou la présence des résidus de fongicides dans les produits alimentaires, induisent un agent pathogène résistant (**Moenne-Loccoz et al., 1998**).

Les HEs sont utilisées comme agents de protection dans le domaine phytosanitaire et agro-alimentaire contre les champignons phytopathogènes et les microorganismes envahissant les denrées alimentaires (**Lis-Balchin et al., 2002**).

L'activité antimicrobienne ou antifongique de l'huile essentielle pourrait être due aux propriétés des terpènes/terpénoïdes qui, en raison de leur nature fortement lipophile et de leur faible poids

moléculaire, sont capables de perturber la membrane cellulaire, provoquant la mort des cellules ou inhibant la sporulation et la germination des cellules (Nazzaro et al., 2017).

### 5. Effets synergiques, additifs et antagonistes des mélanges alimentaires sur les capacités antioxydantes et antifongiques totaux

Les extraits de plantes en tant que huiles essentielles et leurs composants ont fait l'objet de nombreuses recherches en tant que source potentielle de molécules bioactives. De nombreux chercheurs se sont intéressés à leur activité antioxydante pour une utilisation éventuelle comme alternative aux additifs synthétiques moins souhaitables pour la protection des produits cosmétiques et alimentaires contre l'oxydation. De nombreux aliments à base de plantes sont de bonnes sources d'antioxydants phytochimiques uniques, susceptibles d'exercer des effets bénéfiques pour la santé (Adlercreutz, 2003). Une combinaison de différents aliments à base de plantes peut présenter des effets **additifs, synergiques** ou **antagonistes**.

Un effet additif fait référence à une combinaison d'aliments qui fournit la somme des effets des composants individuels, un effet synergique se produit lorsque l'effet est supérieur à la somme de composants individuels et un antagonisme se produit lorsque la somme des effets est inférieure à la somme des composants individuels (Winefield et al., 2009)

De nombreuses propriétés naturelles des huiles essentielles en font des agents conservateurs très prometteurs pour l'industrie alimentaire. Il est bien établi que les composés phénoliques et les métabolites secondaires à doubles liaisons conjuguées présentent des propriétés antioxydantes importantes (Lee et al., 2001). La plupart des huiles essentielles sont dominées par des monoterpènes oxygénés tels que les alcools (*Achilleafili pendulina*), les aldéhydes (*Galagania fragrantissima*), les cétones (*Anethum graveolens*). *Artemisia scoparia* et *Artemisia absinthium* contiennent principalement des hydrocarbures monoterpènes, alors que les terpénoïdes phénoliques, tels que le thymol ou le carvacrol, caractérisent *Origanum tyttanthum* et *Mentha longifolia*, ce qui expliquerait pourquoi les deux plantes manifestaient généralement l'activité antioxydante la plus forte. Le thymol et le carvacrol, qui sont prédominants dans *Origanum tyttanthum*, sont également responsables de l'activité antioxydante de plusieurs autres huiles essentielles, telles que *Mentha longifolia* (Koh et al., 2002).

Le travail sur des agents de protection naturels en tant qu'alternative aux fongicides chimiques est en cours de développement alors que très peu d'études sur les activités antifongiques des mélanges des huiles essentielles ont été étudiées (Sriwattanachai et al., 2017). L'huile essentielle de thym et le surnageant dépourvu de cellules de *Lactobacillus plantarum* (LCFS) ont montré une activité

antifongique remarquable contre *Penicillium spp* (**Shin et Kang, 2003**) ainsi que la combinaison de l'estragole avec l'huile essentielle de *A. rugosa* qui exerçait une activité inhibitrice synergique sur la croissance de *Penicillium* presque identique à la référence, le kétoconazole (**Nikkhah et al., 2016**).

Les combinaisons les plus efficaces, y compris thym/romarin et thym/cannelle ont montré un effet synergique contre *B. cinerea*, alors que les combinaisons de thym/marjolaine et cannelle/marjolaine ont montré des effets additifs. La combinaison de cannelle avec le thym et le romarin, a eu des effets synergiques contre *P. expansum*. La triple combinaison de cannelle, de romarin et de thym a montré un effet synergique sur *B. cinerea* et *P. expansum*, alors que la combinaison de cannelle, la marjolaine et le thym ont montré un effet additif et synergique contre *P. expansum* et *B. cinerea* respectivement (**Sriwattanachai et al., 2017**).

## IV. Les plantes étudiées

### 1. *Ammoïdes verticillata*

#### 1.1. Présentation de la plante

*A. verticillata* est une plante odorante qui pousse dans le nord de l'Afrique ainsi qu'en Asie. On la trouve généralement dans les pelouses, les montagnes et dans les forêts (Quezel et Santa, 2017). Il s'agit d'une plante médicinale et aromatique appartenant à la famille des Apiaceae. Espèce annuelle grêle, à tiges très ramifiées de 10 à 40cm de haut (Figure 14), elle connaît un cycle dynamique tardif allant de mai à juillet (Felidj et al., 2010).



Figure 14 : *Ammoïdes verticillata* (16 /03 /2020)

#### 1.2. Caractéristiques générales des Apiacées

Les Apiacées sont généralement des plantes herbacées annuelles, parfois bisannuelles ou vivaces. La famille compte aussi des arbres et arbustes.

La tige est souvent creuse et porte à l'extérieur des sillons dans le sens de la longueur. Les feuilles sont alternes, sans stipules, le plus souvent composées de folioles finement découpées, mais certaines espèces ont des feuilles entières (buplèvre par exemple). Souvent les pétioles sont élargis à leur base, engainant la tige.

L'inflorescence typique des Apiacées, justement appelées ombellifères, est l'ombelle qui peut être simple ou composée d'ombellules. Les ombelles sont souvent munies à leur base d'un involucre formé de bractées.

Les fleurs, petites, à symétrie pentamère, sont le plus souvent blanches ou jaunâtres, quelquefois rougeâtres comme la fleur centrale de l'ombelle de carotte. Elles comptent 5 pétales et 5 étamines et ont au centre un ovaire infère à deux carpelles. Les sépales sont absents ou très réduits du fait que le calice est presque complètement soudé à l'ovaire. Parfois, les fleurs périphériques de l'ombelle sont irrégulières, avec des pétales externes nettement plus grands, contribuant à faire de l'ombelle une simili-fleur. L'ovaire porte deux styles qui s'élargissent à la base en un disque ou coussinet nectarifère (stylopode).

Les fruits, secs, sont des schizocarpes (diakènes) qui se scindent en deux à maturité, chaque partie contenant une graine. Ils sont très diversifiés par leur forme externe : présence de crochets ou d'épines, de protubérances ou de poils, parfois d'ailes, qui sont importants à observer pour la détermination des espèces.

### 1.3. Nom scientifique

La désignation scientifique est *Ammoides verticillata*, en Algérie, elle est appelée Nounkha ou Nûnkha tirée du nom Perse «Nankhah» qui est utilisée comme aromate dans le pain (**Baytop et Sütlüpınar, 1986**).

### 1.4. Composition chimique

Les plantes possèdent des métabolites dits 'secondaires' par opposition aux métabolites 'primaires' que sont les protéines, les glucides et les lipides. Ces composés diffèrent en fonction des espèces, il est cependant clair qu'ils interviennent dans les relations qu'entretient la plante avec les organismes vivants qui l'entourent (**Krief, 2003**).

Les résultats du screening phytochimique confirment la richesse de cette plante en composés terpéniques (saponosides, stéroïdes, stérols, triterpènes et huiles essentielles), en composés azotés (alcaloïdes), ainsi qu'en antioxydants (caroténoïdes) et en composés phénoliques (polyphénols, flavonoïdes, flavonoïdes libres (flavones), coumarines, anthocyanes et quinones libres) (**Daira et al., 2016**).

### 1.5. Utilisation thérapeutique

L'enquête réalisée auprès des herboristes a montré que cette espèce aide à guérir de nombreuses maladies. Elle est utilisée en décoction ou en infusion pour la fièvre typhoïde, comme

antipyrétique, antispasmodique, dépuratif pour les affections rénales ; aussi, avec le citron pour la migraine et les céphalées. Le mélange de la plante broyé avec du miel traite l'asthme et les douleurs gastriques. L'inhalation de la vapeur dégagée lors de l'ébullition de la plante traite la fièvre, le rhume et la grippe ainsi que les maladies broncho-pulmonaires.

Des études antérieures ont montré une forte activité antioxydante de l'huile essentielle de cette plante qui est due à sa contenance en composés phénoliques comme le thymol et le carvacrol qui servent à traiter les infections bactériennes, virales, cutanées, les infections ORL (oto-rhinolaryngologie) et le rhumatisme (**Knobloch et al., 1989**).

## 2. *Curcuma longa*

### 2.1. Présentation de la plante

Le curcuma est une plante à fleurs de la famille du gingembre (Zingiberaceae) dont les racines sont utilisées en cuisine (**Loap, 2008**). La plante est une herbacée, vivace et rhizomateuse, elle est originaire du sous-continent indien et de l'Asie du Sud-Est. Elle a besoin d'une température comprise entre 20 et 30 °C et d'une pluviométrie annuelle considérable pour se développer.

les plantes sont cueillies chaque année pour leurs rhizomes, certaines pour la multiplication la saison suivante et d'autres pour la consommation (**Turmeric processing, 2015**).



**Figure 15.** *Curcuma* poudre et rhizome. (16 /03 /2020)

Les rhizomes sont cuits à l'eau pendant environ 45 minutes, puis séchés dans des fours chauds. Ils sont ensuite broyés en une poudre jaune-orange foncée, couramment utilisée comme colorant et aromatisant, ainsi que pour la teinture (**Brennan, 2012**). La poudre de curcuma a une saveur

chaude et amère, semblable à celle du poivre noir et un arôme terreux (**Brennan, 2012 ; Turmeric, 2017**).

## **2.2. Nom scientifique**

*Curcuma longa*, Linn en anglais *Turmeric*, en arabe *kourkoum* et appelé parfois en France *safran des indes* (**Negi et al., 1999**).

## **2.3. Composition chimique**

La poudre de curcuma contient environ 60-70% de glucides, 6-13% d'eau, 3-7% de minéraux alimentaires, 6-8% de protéines, 5-10% de matières grasses, 2-7% de fibres alimentaires, 3-7% d'huiles essentielles et 1 à 6% de curcuminoïdes (**Nelson et al., 2017**). Les composants phytochimiques du curcuma comprennent les diarylheptanoïdes, une classe comprenant de nombreux curcuminoïdes tels que la curcumine, la déméthoxycurcumine et la bisdéméthoxycurcumine (**Nelson et al., 2017**). La curcumine constitue jusqu'à 3,14% des échantillons commerciaux de poudre de curcuma testés (la moyenne était de 1,51%) (**Hu et al., 2014**).

## **2.4. Utilisation thérapeutique**

Le curcuma dont la composante majoritaire est la curcumine, connu depuis longtemps en médecine traditionnelle en Inde, en Chine et en Iran, a été utilisée contre plusieurs maladies telles que le diabète, les maladies du foie, les maladies rhumatoïdes, l'athérosclérose, les maladies infectieuses et le cancer (**Noorafshan et Esfahani , 2013 ; Ammon et Wahl M, 1991**).

L'ar-Turmèrone, est le composé majoritaire de l'huile essentielle de curcuma, il présente une activité anti oxydante et aussi une forte activité d'agrégation antiplaquettaire in vitro, antimutagène, anti-inflammatoire puissant et neuroprotecteur, il possède aussi des activités insectifuges, antihépatotoxiques, antiarthritiques et il possède également une forte activité antibactérienne et antifongique (**Dosoky et Setzer , 2018**).

## **3. *Allium sativum***

### **3.1. Présentation de la plante**

L'ail est une plante médicinale appartenant à la famille des *Amaryllidaceae* (**Block, 2010**) ; la hauteur de la tige et de la fleur est en moyenne 40 cm, sa floraison est en mois du juin à août, il se caractérise par une odeur particulière forte provenant de l'allicine, un composé organo-sulfuré. Il est utilisé par les médecins de l'Inde ancienne (**Colin, 2016**).



**Figure 16 :** ail *Allium sativum*(16 /03 /2020)

### 3.2. Nom scientifique

**Ail**, en anglais **garlic** et *A. sativum* comme désignation botanique (**Block, 2010**).

### 3.3. Composition chimique

*A. sativum* est caractérisé par la présence de l'alicine (sulfoxyde), de liquide incolore, des composés soufrés, d'eau, des glucides, des minéraux tels que potassium, soufre, calcium, phosphore, chlore, magnésium, sodium, fer, zinc, sélénium, manganèse et des vitamines ; il contient aussi des oligo-éléments (**Colin, 2016**).

### 3.4. Utilisation thérapeutique

Suite à une enquête thérapeutique réalisée dans la région de Tlemcen, on a constaté que l'ail protège contre de nombreuses maladies telles que le cancer (**Saidi et Ali Belhadj, 2016**) ; l'ail minimise les risques du cancer du côlon et du cancer de l'estomac aussi il réduit les taux du cholestérol et des triglycérides (**Steinmetz et al., 1994**).

L'ajoène (extrait de l'ail) remplace un médicament fongique (le terbinafne) pour traiter le tinea pedis une infection qui se trouve dans les lieux humides et chauds (**Ledezma, 2000**). Concernant les propriétés de l'huile essentielle de l'ail, elle se caractérise par la présence des composés soufrés comme le disulfure de diallyle, le trisulfure de diallyle qui lui attribuent une activité antioxydante puissante. L'ail permet de réguler le taux de cholestérol et contrôle la tension artérielle, luttant ainsi contre le risque des maladies cardiovasculaires. Il serait efficace contre les vers intestinaux du fait de sa composition soufrée contribuant à l'activité antimicrobienne et anti-infectieuse (**Dieumou et al., 2009**).

## V. Micro-encapsulation des huiles essentielles

### 1. Définition de l'encapsulation

L'encapsulation est définie comme un processus visant à piéger une substance (un agent actif) dans une autre substance (matériau de la paroi). La substance encapsulée, à l'exception de l'agent actif, peut être appelée le noyau, le fil, la phase active, interne ou la charge utile. La substance qui encapsule est souvent appelée le revêtement, la membrane, l'enveloppe, la capsule, le matériau de support, la phase externe ou la matrice (**Wandrey et al., 2009; Fang et Bhandari, 2010**)

C'est une technologie spécifiquement adaptée à fournir des composés à haute valeur ajoutée, capable de stabiliser et de contrôler la libération de composés extraits à partir des fruits, des légumes ou des déchets (c'est-à-dire des composés bioactifs antioxydants, des vitamines, des acidulants, des parfums, des arômes, des enzymes, des cellules microbiennes et autres). C'est une pratique courante dans la conservation ou l'amélioration de la bioactivité des extraits naturels (**Nikmaram et al., 2017**).

L'encapsulation des huiles peut être définie comme un processus dans lequel les gouttelettes de l'huile bioactive sont entourées d'un matériau d'enrobage, ou noyées dans une matrice homogène ou hétérogène, pour donner de petites capsules ayant de nombreuses propriétés utiles (**Sagalowicz et Leser, 2010**).

### 2. Intérêt de l'Encapsulation

L'objectif de l'encapsulation est de préserver la stabilité des composés bioactifs pendant le traitement et le stockage, d'empêcher les interactions indésirables avec la matrice alimentaire, et de ralentir les processus de dégradation (par ex. l'oxydation ou l'hydrolyse) jusqu'à ce que le produit soit libéré aux sites désirés (**McClements et Lesmes, 2009**), ces ingrédients alimentaires et surtout les huiles étant très sensibles à l'environnement, au traitement et / ou les conditions gastro-intestinales.

Aussi, elle peut fournir une barrière entre les matériaux bioactifs sensibles et l'environnement, et permettre de masquer le mauvais goût ou haleine, et augmenter leur biodisponibilité.

Selon **Desai et Park (2005)**, l'encapsulation a un bénéfice pour la modification des caractéristiques physiques du produit original afin de :

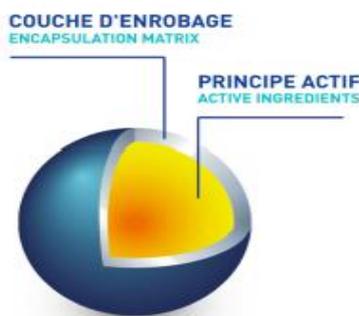
- (a) faciliter la manipulation ;

- (b) aider à séparer les composants du mélange qui réagirait autrement entre eux ;
- (c) fournir une concentration adéquate et une dispersion uniforme d'un agent actif

### 3. Les formes galéniques obtenues

Les propriétés des produits encapsulés dépendent en grande partie de la taille de la capsule, des matériaux d'enrobage, des ingrédients actifs et des techniques de production. En tant que tel, un meilleur produit encapsulé est destiné pour la livraison nutraceutique par exemple, peut être avec les petites capsules, composées d'un matériau enrobant de qualité alimentaire et préparé en utilisant une technique qui n'affecte pas le composé actif. Cette information révèle la valeur qualitative du produit encapsulé.

De façon globale, les particules consistent en un matériau de noyau, qui est appelé phase interne ou remplissage et une paroi appelée revêtement, enveloppe ou membrane (fig.17). Le matériau de mur détermine la stabilité des microparticules, l'efficacité du processus et le degré de protection du noyau. Les matériaux de mur couramment utilisés pour l'encapsulation des huiles comprennent les polymères synthétiques et les biomatériaux naturels (habituellement les glucides et les protéines).



**Figure 17:** Structure du matériau encapsulé (huile) et encapsulant.

(<http://www.capsularis.com/microencapsulation/>)

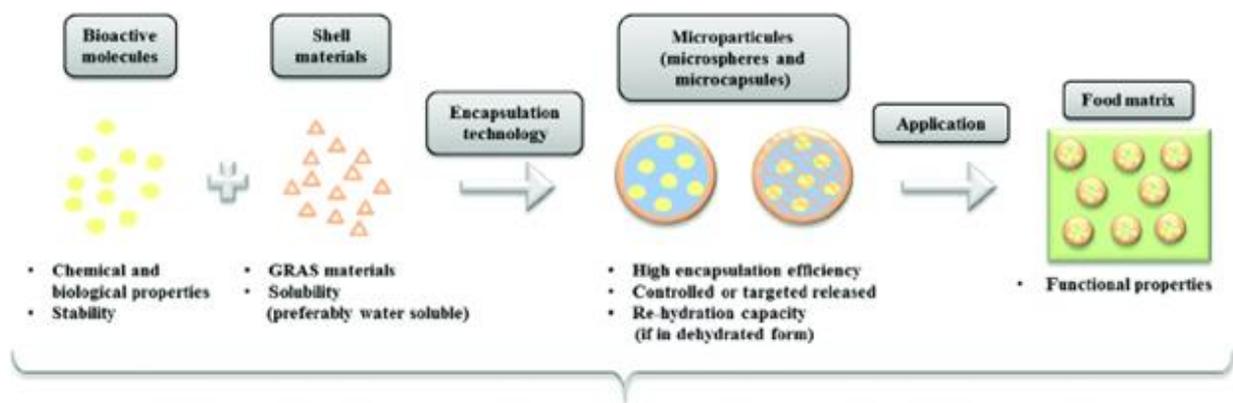
La taille et la forme des particules formées dépendent spécifiquement des matériaux de la paroi et des méthodes utilisées pour les préparer. De plus, les techniques de composition de paroi et d'encapsulation peuvent également déterminer les propriétés fonctionnelles et les applications potentielles des composants encapsulés.

Les 'structures' créées par encapsulation (particules, capsules, billes...) ayant un effet bien défini, sont capables de transporter une charge avec un mécanisme programmé de relargage dans un environnement donné. A l'intérieur de ces structures, la substance encapsulée peut rester en forme

de solution, de suspension ou d'une émulsion. Elle peut correspondre à des molécules simples ou à des structures plus complexes comme des cellules. Dans le domaine de la santé, la fonctionnalité est un des éléments clés du développement des systèmes de délivrance des molécules avec une activité thérapeutique.

#### 4. Techniques de Micro-encapsulation de l'huile essentielle

De nombreuses techniques ont été utilisées, notamment pour encapsuler les huiles marines, végétales et essentielles. Les plus couramment utilisées sont: l'émulsification, le séchage par pulvérisation, le système d'électro-spray coaxial, la lyophilisation, la coacervation, la polymérisation in situ, l'extrusion, l'enrobage en lit d'air fluidisé et la technologie des fluides supercritiques



**Figure 18** : Représentation schématisée du principe général d'une technique de microencapsulation.

(<http://pubs.rsc.org/en/content/articlelanding/2015/fo/c4fo01175a/unauth#!divAbstract>)

## 5. Coacervation

### 5.1. Principe

La coacervation implique l'attraction électrostatique entre deux biopolymères de charges opposées ; la formation de coacervats se produit dans un intervalle étroit de pH. Dans cette technique, la phase liquide (huile) se sépare de la phase riche en polymère (coacervat). Le processus de coacervation est classé en coacervation simple et complexe. En coacervation simple, le polymère est relargué par l'action d'électrolytes tels que le sulfate de sodium, ou désolvaté par l'addition d'un solvant non miscible à l'eau, ou en augmentant et diminuant la température. Ces conditions favorisent les interactions macromolécule-macromolécule (**Ocak et al., 2011**).

La coacervation complexe (figure 19) est un processus dans lequel deux ou plusieurs polymères de charges opposées sont impliqués.

La première étape d'encapsulation d'une huile par ce processus implique l'émulsification de l'huile dans une solution aqueuse contenant deux polymères différents (le plus souvent un polysaccharide et une protéine), à une température et un pH généralement au-dessus du point isoélectrique et de gélification de la protéine.

La deuxième étape est la séparation de la phase liquide et de la phase insoluble riche en polymères en raison de l'attraction électrostatique entre les charges opposées du polymère, causés par l'abaissement du pH de la solution au-dessous du point isoélectrique de la protéine.

La troisième étape consiste à la formation de la membrane en raison du dépôt de la phase riche en polymères autour des gouttelettes hydrophobes (huile), suivie d'un refroidissement contrôlé au-dessous de la température de gélification. Dans la dernière étape, le durcissement des microcapsules est obtenu par l'ajout d'un agent de réticulation (**Piacentini et al., 2013**).

## 5.2. Usage

La coacervation est l'une des techniques d'encapsulation les plus anciennes et les plus utilisées. Le processus de coacervation est largement utilisé dans l'alimentation (**Leimann et al., 2009 ; Yang et al., 2014**) le domaine pharmaceutique (**Leimann et al., 2009 ; Ocak et al., 2011**), la cosmétique (**Xiao et al., 2014**) et l'industrie des pesticides (**Solomon et al., 2012**).

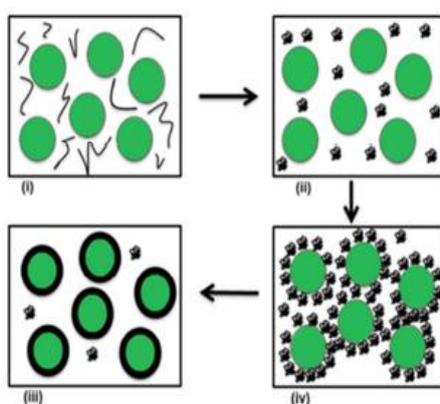
La coacervation simple a été utilisée pour encapsuler l'huile de poisson, de basilic, de citronnelle et de théier (**Leimann et al., 2009**). Elle permet facilement la production de microcapsules contenant des substances hydrophobes, comme des huiles marines, végétales et essentielles.

Elle offre des avantages importants par rapport à la coacervation complexe grâce à sa technique moins coûteuse et flexible. Pour induire une phase de séparation, la coacervation simple utilise des sels inorganiques bon marché, tandis que la coacervation complexe est plus sensible à même d'un petit changement de pH. De plus, la coacervation complexe utilise relativement des hydrocolloïdes coûteux (**Sutaphanit et Chitprasert, 2014**)

La technique de coacervation complexe a également été utilisée pour encapsuler des huiles de poissons, des microalgues, des graines de lin, des olives, des clous de girofle, de tournesol, de menthe poivrée, d'orange douce, de vétiver, d'huiles de graines de Neem, de lavande, de vanille et de *Zanthoxylum limonella* et du camphre (**Yang et al., 2014**).

La technique de coacervation complexe produit des microcapsules avec une faible surface d'huile, une teneur et une stabilité supérieures de celles des émulsions produites par séchage par pulvérisation (Fig. 19). Aussi, les microcapsules produites par coacervation possèdent d'excellentes caractéristiques de libération contrôlée et de résistance à la chaleur (Wang et al., 2014).

L'avantage majeur de la coacervation complexe sur d'autres méthodes est son taux d'encapsulation (99%). De plus, cette méthode est simple, évolutive, de faible coût par rapport au séchage par pulvérisation, sans solvant et reproductible. Par conséquent, la coacervation complexe peut être utilisée pour la fabrication de microcapsules à l'échelle industrielle (Xiao et al., 2014).



**Figure 19:** Exemple de coacervation complexe (Abdellaoui, 2018)

Impliquant une émulsification de l'huile dans une solution aqueuse contenant deux polymères différents, (ii) une coacervation initiale des polymères après l'abaissement du pH de la solution au-dessous du point isoélectrique de la protéine, (iii) le dépôt des polymères sur la surface de l'huile, et (iv) le durcissement de la paroi par l'addition d'un agent de réticulation (Bakry, 2016) chimiquement instables et sensibles à la dégradation.

L'encapsulation est un outil efficace et important pour la préparation de produits bénéfiques pour la santé dans diverses industries afin d'améliorer leur stabilité chimique, oxydative et thermique. Les huiles encapsulées ont été appliquées avec succès dans divers aliments et produits pharmaceutiques, en textiles, et dans les produits antiparasitaires.

# *CHAPITRE II :*

---

## **MATERIEL ET METHODES**

---

## PRESENTATION DE LA ZONE D'ETUDE

### 1. Situation géographique

#### 1.1. Situation géographique de la wilaya de Tlemcen

La wilaya de Tlemcen occupe une position de choix au sein de l'ensemble national. Wilaya à la fois frontalière et côtière, avec une façade maritime de 70 km, elle s'étend sur une superficie de 9017,69 Km<sup>2</sup>. Le Chef-lieu de la wilaya est située à 432 km à l'ouest de la capitale, Alger. La wilaya est limitée par (Fig. 20):

- La Mer Méditerranée au nord ;
- La wilaya de Ain Témouchent à l'est ;
- La wilaya de Sidi Bel Abbès à l'est-sud-est ;
- La wilaya de Naâma et le Maroc à l'ouest.



Figure 20 : situation géographique de la wilaya de Tlemcen

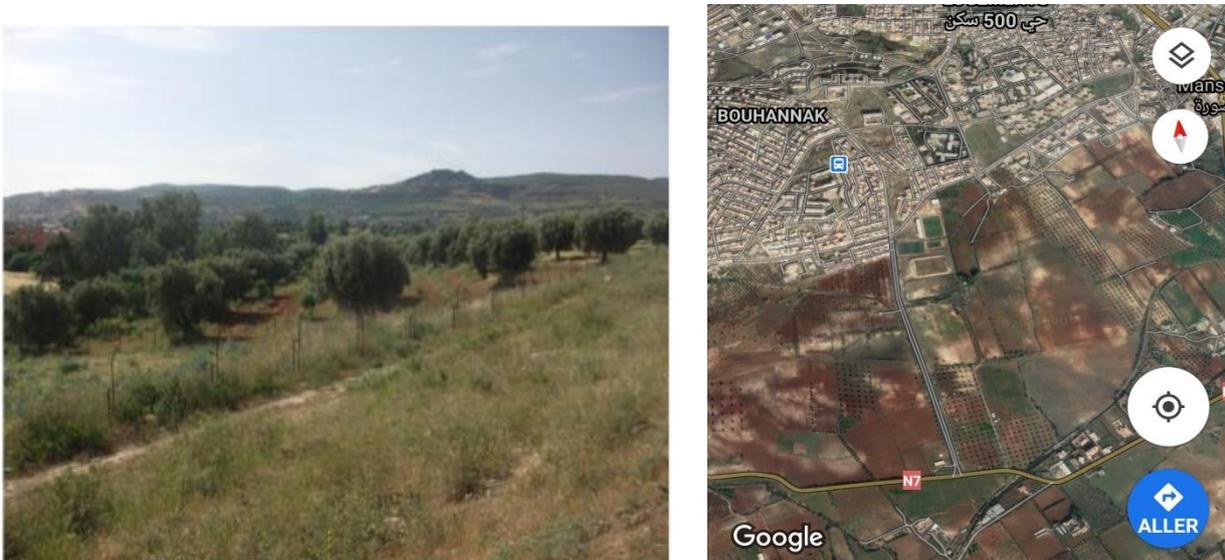
<https://www.google.com/maps/place/Wilaya+de+Tlemcen>.

### 1.2. Situation géographique de la station d'étude

La station de Bouhanak est située dans la commune de Mansourah, à 3 km à l'ouest de la ville de Tlemcen, entre 34° et 35° 40' de latitude nord et 0° 30' et 2° 30' de longitude ouest.

La station est limitée à l'est par une autoroute, au sud par des habitations, à l'ouest et au nord par des parcelles abandonnées en jachère ; elle se compose de plusieurs parcelles dont celle située dans sa partie Est est laissée en jachère et utilisée occasionnellement par des nomades pour l'élevage ovin. Dans sa partie ouest, l'olivier domine, il est à noter la présence de quelques jujubiers (Figure 21).

Dans ce site nous distinguons deux groupes d'oliviers, l'un est représenté par des arbres en alignement situés en face de l'I. T. M. A. (Institut Technologique Moyen Agricole) et l'autre est un verger propriété de l'I. N. P. V. de Tlemcen (Institut National de la Protection des Végétaux), à proximité du premier. Ces deux vergers ont une altitude de 780 m et une superficie de 3,5 ha dominés par la variété « Sigoise ». Ils sont caractérisés par un relief recevant une tranche pluviométrique de 350 mm (I.N.P.V, 2005). Les arbres ont le même âge, 35 ans en moyenne ; ils sont vigoureux, présentant une cime globuleuse bien remplie de feuillage vert. Les branches mortes sont rarement observées et le tronc est généralement droit à légèrement sinueux.



**Figure 21:** Station de Bouhanak

## 2. Etude bioclimatique

Le climat joue un rôle fondamental dans la répartition et la vie des êtres vivants (Guyot et Mamy, 1999). Il se définit par l'action combinée de plusieurs facteurs : la température, les précipitations, l'humidité, l'évaporation, le vent, la lumière et la pression atmosphérique. Il varie en fonction du

relief (altitude) et de l'éloignement par rapport à la mer (Claude et al., 1998; Ramade, 2003). La température et la pluviosité sont les deux éléments principaux du climat (Dajoz, 2006).

L'étude climatique a pour but de déterminer l'étage bioclimatique du site d'étude à partir du climagramme pluviothermique d'Emberger (1971) et la détermination de la période sèche par l'utilisation du diagramme ombrothermique de Bagnouls et Gausson (1953).

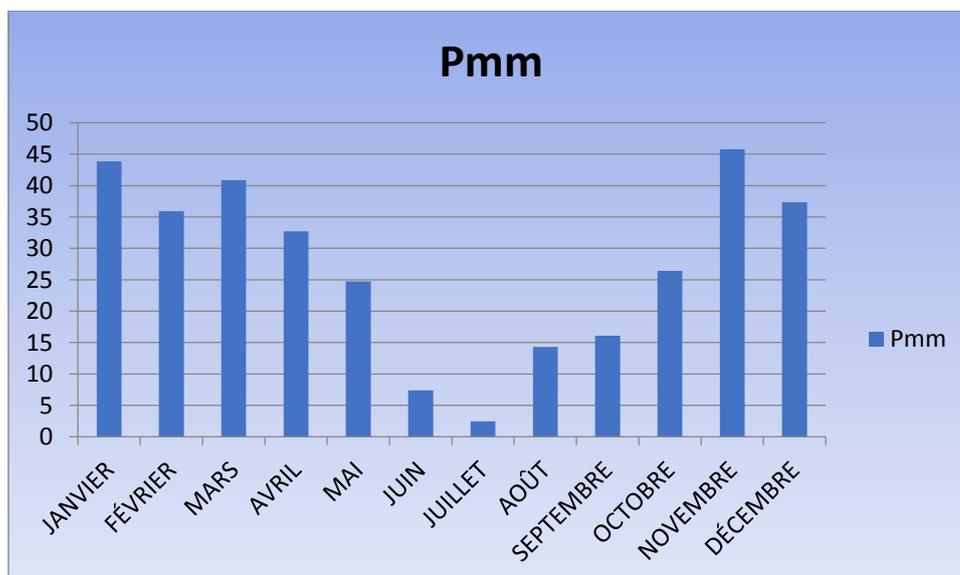
Cette étude a été effectuée à partir des données météorologiques, des températures et des précipitations, de la station météorologique de Zenata durant la période 1989-2018.

## 2.1. Paramètres climatiques

### 2.1.1. Précipitations

La pluviométrie constitue un facteur écologique fondamental, non seulement pour le fonctionnement et la répartition des écosystèmes terrestres mais aussi pour certains écosystèmes aquatiques (Ramade, 2003). Elle est considérée comme un facteur bénéfique pour l'abaissement des niveaux de la pollution (Chovin et Roussel, 1973).

La tranche pluviométrique diffère d'une région à une autre en fonction du relief ; la pluviométrie donne à la végétation sa caractéristique et au sol sa typologie » (Gaouar A., 1986). Les valeurs moyennes mensuelles de la pluviométrie sur 30 cycles sont présentées par la figure 22.



**Figure 22 :** Moyennes mensuelles et annuelles des précipitations de la station de Zenata (1989-2018).

L'analyse des précipitations pendant la période 1989-2018 montre que novembre est le mois le plus arrosé, juillet étant le mois le plus sec.

### 2.1.2. Températures

La température est un facteur écologique fondamental et un élément vital pour les formations végétales. Ce facteur a été défini comme une qualité de l'atmosphère et non une grandeur physique mesurable.

Les critères thermiques utilisés en climatologie intéressent les extrêmes qui se caractérisent par les variables suivantes :

- Les températures moyennes mensuelles  $[(M+m)/2]$

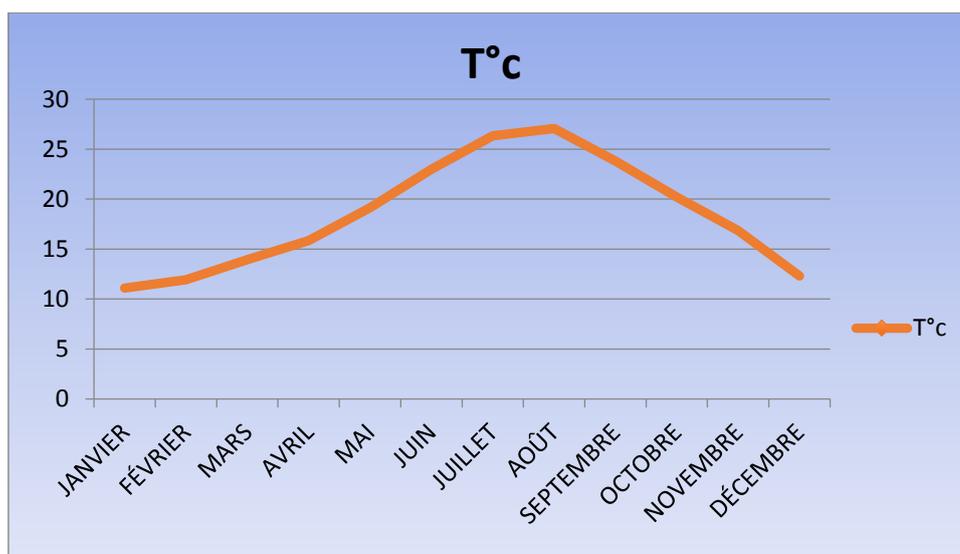
Le mois de janvier représente la température moyenne la plus basse avec  $11,1\text{ °C}$  ; le mois d'août comporte la température moyenne la plus élevée à  $27,06\text{ °C}$ .

- Les températures maximales M

L'analyse des données climatiques montre que les températures les plus élevées sont enregistrées généralement au mois d'août.

- Les températures minimales m

L'examen des températures (Figure 23) nous a permis de relever que le mois le plus rigoureux est celui de janvier.



**Figure 23:** Moyennes mensuelles et annuelles des températures de la station de Zenata (1989-2018).

**2.2. Synthèse bioclimatique**

La synthèse climatique est une étape indispensable pour tout projet relatif à l'environnement. Les paysages végétaux sont cependant bien répartis par les phénomènes climatiques : la température et la pluviosité.

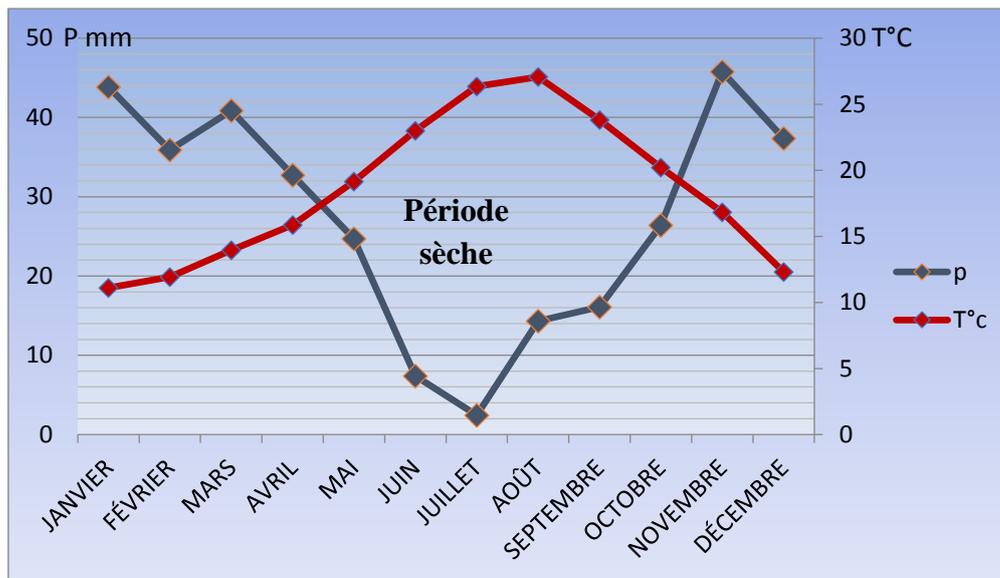
L'estimation de ces paramètres permet d'aboutir à une interprétation efficace des indices, d'où l'intérêt de ces derniers dans la détermination du type de climat ainsi que pour la distribution de la végétation.

**2.2.1. Diagramme ombrothermique de Bagnouls et Gaussen (1953)**

Bagnouls et Gaussen (1953) ont établi un diagramme qui permet de dégager la durée de la période sèche en s'appuyant sur la comparaison des moyennes mensuelles des températures en degrés Celsius (°C) avec celles des précipitations en mm ; en admettant que le mois est sec lorsque « P est inférieur ou égal à 2T ».

Le principe de cette méthode consiste à porter sur un même graphe la température et la pluviométrie, de sorte que l'échelle des températures soit le double des précipitations (1°C=2mm) ; en considérant la période de sécheresse lorsque la courbe des précipitations passe en dessous de la courbe de la température. Ce diagramme nous permet de connaître également l'évolution des températures et des précipitations.

L'analyse des différents diagrammes permet de visualiser une période pluvieuse qui s'étend généralement de la fin octobre à la fin avril et une période sèche pour le reste de l'année. Les mois de juin, juillet et août demeurent les mois les plus secs. La durée de la saison sèche est de six mois par an, elle dure de mai au début octobre, coïncidant avec la période estivale ; le reste de l'année est relativement humide (Figure 24).



**Figure 24 :** Diagramme ombrothermique de Bagnouls et Gausson de la station de Zenata (1989-2018).

### 2.2.2. Quotient pluviothermique d’Emberger

En 1955, Emberger proposa de définir des sous-classes dans le bioclimat méditerranéen sur la base de l’humidité globale du climat et sa rigueur hivernale(Emberger, 1955; Emberger, 1971; Dajoz, 1976). Cela est caractérisé par le quotient pluviothermique Q2:

$$Q_2 = 100p / M^2 - m^2$$

Avec :

P : précipitations moyennes annuelles (mm).

M : Moyennes des maximas du mois le plus chaud (°C).

m : Moyennes des minimas du mois le plus froid (°C).

Après le calcul de Q<sub>2</sub> (Tableau 3), la lecture du climagramme pluviothermique montre que notre site d’étude se situe dans l’étage bioclimatique semi aride à hiver tempéré (Figure 24).

**Tableau 3 :** Synthèse des données climatiques de la station de Zenata

station	Période	P	M	M	M2	m2	Q2
Zenata	1989-2018	327,78	33,79	5,41	1141,76	29,26	29,46

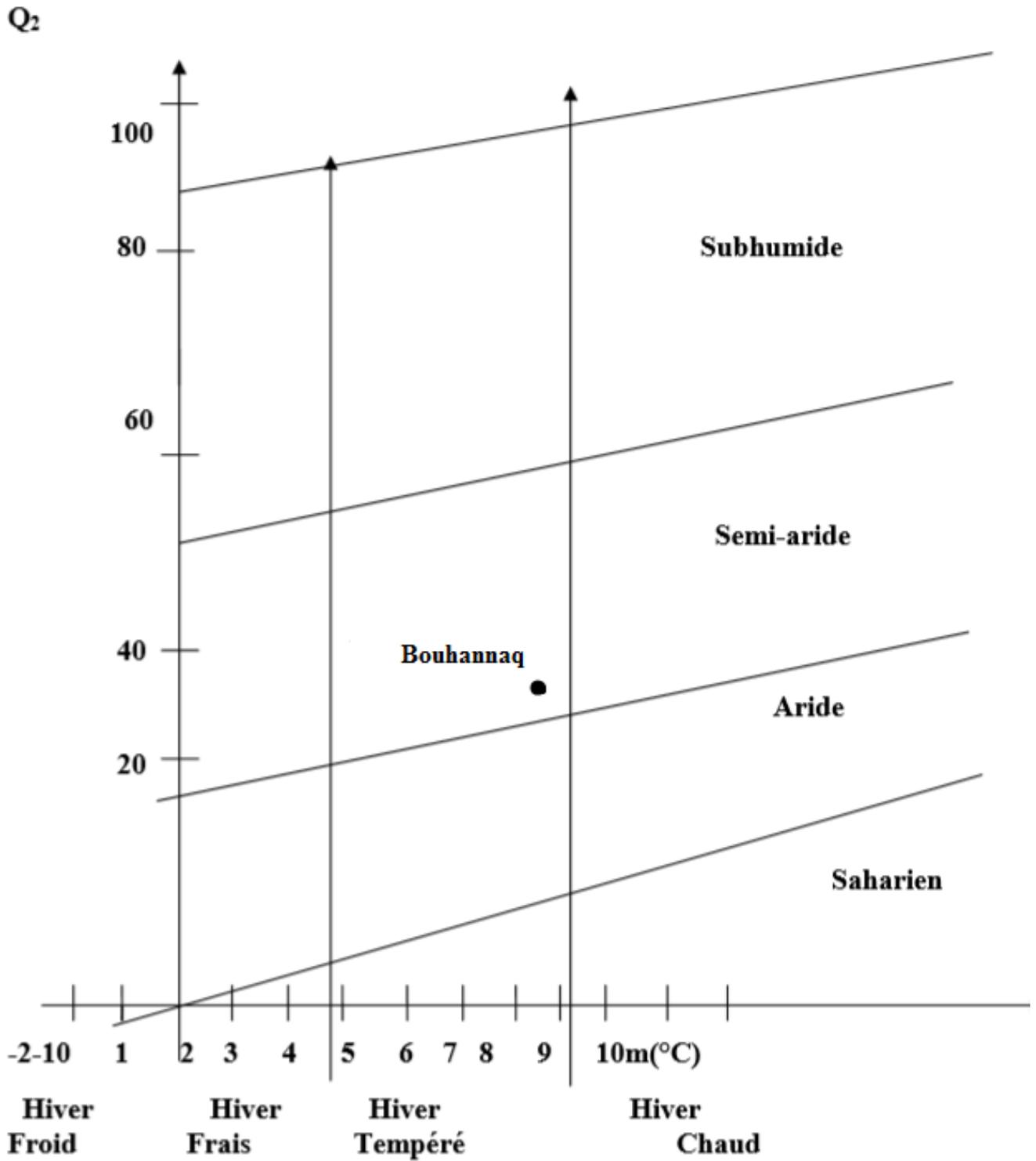


Figure 24: Climagramme d'Emberger de Zenata (Période allant de 1989 à 2018).

### **3. Etude entomologique**

Nos travaux ont été effectués sur des échantillons de fruits d'oliviers de la variété « Sigoise », prélevés dans la station de Bouhanak, choisie pour sa proximité par rapport à l'Université.

#### **3.1. Echantillonnage des olives**

Pour choisir les vergers dans lesquels nous avons effectué nos prélèvements, nous nous sommes basés sur les critères suivants :

- Un nombre important d'oliviers par verger ;
- Un nombre élevé des fruits par arbre ;
- La présence de la variété Sigoise, choisie pour notre étude en raison de sa prédominance dans notre région ;
- Un verger non traité.

Les prélèvements ont été effectués au niveau de notre verger selon un échantillonnage aléatoire. Les fruits ont été récoltés au hasard des arbres, avec un nombre de 20 olives par arbre. Les échantillons (olives) ont été prélevés des oliviers à partir des quatre points cardinaux pour éviter l'influence de l'orientation.

Les prélèvements ont été effectués durant une période qui s'étale sur trois mois, les fruits étaient destinés au dénombrement des piqûres et des trous de sortie, servant à l'estimation des taux d'infestation ainsi qu'à l'isolement des champignons dont l'installation est favorisée par les piqûres du ravageur *Bactrocera oleae*.

Les principaux caractères étudiés sont :

- les taux d'infestation de l'olive par le phytophage *Bactrocera oleae*;
- isolement et identification des principaux champignons infectant nos olives ;
- étude des activités antiparasitaires et antifongiques par les huiles essentielles et les hydrolats des deux plantes étudiées.

Les arbres improductifs qui ne répondaient pas au principe du prélèvement des fruits et qui se trouvaient dans le lot de l'échantillonnage ont été remplacés par ceux de la ligne ou de la colonne la plus proche.

### 3.2. Estimation du taux d'infestation

Les olives ont été rapportées au laboratoire, puis examinées et disséquées pour dénombrer les piqûres et les trous de sortie des larves.

Le taux d'infestation peut être estimé soit par :

- le nombre moyen des piqûres ;
- le nombre moyen de trous de sortie.

**Rq** : Les nombres d'œufs et de larves n'ont été comptabilisés que pour les olives prélevées à Bouhanak et destinées à la dissection.

**Tableau 4 : Nombre des piqûres et de trous de sortie pour 10 arbres**

Nb d'arbres	Nb des olives	nb des piqûres	Nb des trous de sortie
10	200	483	203

### 3.3. Analyse statistique des données

Les résultats obtenus à partir de la dissection des olives prélevées à différentes dates ont été testés par les analyses de variance et les corrélations linéaires.

#### 3.3.1. Analyse de variance et autres tests utilisés

Ces analyses ont été utilisées pour tester l'influence de la date sur le nombre de piqures et de trous de sortie. Une analyse de variance (Anova) et le test de Tukey (HSD) test ( $p < 0,05$ ) ont été utilisés pour comparer les moyennes des générations de différentes mois et / ou des années. Bien que les données aient été transformées pour l'analyse statistique, les moyennes et les erreurs-types basées sur les données originales sont présentées dans les figures. Les calculs ont été effectués à l'aide du Minitab 15.

#### 3.3.2. Corrélation et régression

##### ➤ Coefficient de corrélation linéaire

Pour savoir s'il existe une dépendance entre la date et les nombres de piqures, et des pupes (représentées par les trous de sortie) des olives infestées, nous avons calculé les coefficients de corrélation linéaire.

**Principe** : pour établir une relation d'indépendance entre deux variables X et Y, il suffit de calculer le coefficient de corrélation :

$$r = \frac{\sum(x - \bar{x})(y - \bar{y})}{n\sigma_x \times \sigma_y} = \frac{\text{Cov}(X, Y)}{\sigma_x \times \sigma_y}$$

r est compris entre -1 et +1

-si r=0 il n'y a pas de corrélation linéaire entre les variables X et Y ;

-si r>0 il existe une liaison positive entre les deux variables ;

-si r<0 il existe une liaison négative entre les variables ;

-si les deux variables suivent une loi normale, on peut tester le coefficient de corrélation par rapport au zéro en calculant la quantité  $t = \frac{r\sqrt{n-2}}{\sqrt{1-r^2}}$  qui est distribuée, sous l'hypothèse  $H_0$  selon loi de Student à (n-2) ddl.

Si  $t > t$  théorique, la corrélation entre les deux variables est jugée significative ; il existe alors une dépendance statistique entre elles.

#### ➤ **Droite de régression**

S'il existe une corrélation significative entre les variables X et Y, on peut établir une droite de régression. Elle permet d'estimer les valeurs de Y connaissant certaines valeurs de X, ce qui nous permet de prédire l'évolution ou l'effectif de l'un des stades en connaissant ceux de l'autre, si  $r^2$  est positif.

#### **4. Etude mycologique**

Nous avons utilisé un milieu nutritif favorable au développement d'un grand éventail de champignons. Il s'agit d'un milieu PDA (Potato Dextrose Agar) qui est le meilleur support pour la croissance de nombreux champignons, bactéries et certaines levures (**Harold, 1998**).

Dans des conditions aseptiques, les fragments des olives infestées ont été découpés séparément en petits morceaux à l'aide d'un scalpel stérile. Les fragments ont été déposés dans des boîtes de Pétri

stériles contenant le milieu PDA ou bien un milieu Sabouraud. Les boîtes ont été mises à incuber sous une température de 28°C pendant 3 à 7 jours.

#### **4.1. Purification des souches fongiques isolées**

La purification a été réalisée par des repiquages successifs des différents aspects de colonies, obtenues après la première mise en culture dans des boîtes contenant le milieu de culture PDA, à une température de 28°C pendant 3 à 7 jours, jusqu'à l'obtention des colonies pures. Ces dernières ont été reprises sur des tubes de PDA inclinés et incubés à 25±1°C, pendant une semaine ou plus, puis ont été conservés à 4°C.

Pour éviter la contamination bactérienne, le milieu PDA a été acidifié jusqu'à pH de 4,5 à 5 en y ajoutant 1 ml d'acide lactique à 25 % par flacon.

#### **4.2. Identification des moisissures**

L'identification des isolats fongiques est basée sur des études macroscopiques et microscopiques (**Rappily, 1968**), en se référant aux guides d'identification des champignons de (**Barnett et Hunter, 1972**) et (**Rieuf, 1985**). Les caractères macroscopiques sont les suivants : texture et couleur du thalle, couleur du revers de la boîte de pétri, présence d'un pigment diffusible et l'odeur.

Les caractères microscopiques ont été observés grâce à la méthode de microculture de **Harris, (1989)** :

Afin de prélever des spores et des filaments mycéliens de la souche fongique à identifier, un morceau de papier adhésif (scotch) a été mis sur la culture puis déposé sur une lame contenant une goutte de bleu coton qui a permis de gonfler les filaments du mycélium et donner une meilleure observation (Fig.25). L'observation microscopique a permis la visualisation de la forme du mycélium et les spores caractéristiques des champignons pathogènes.

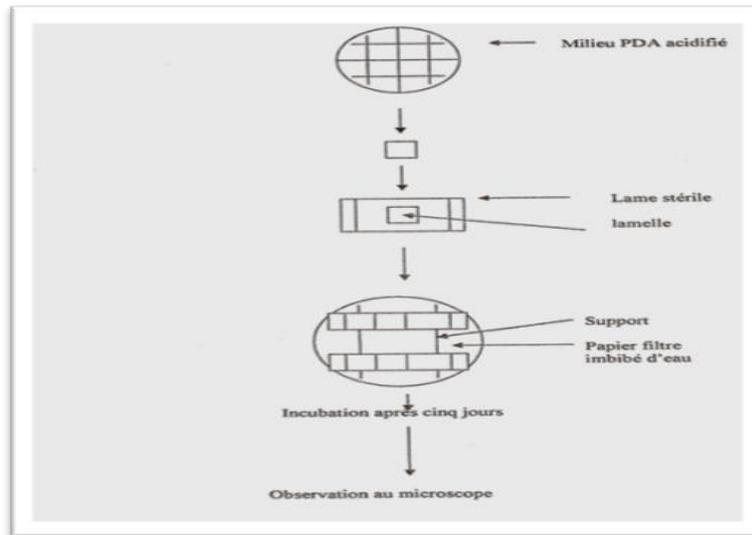


Figure 25: Technique de microculture (Harris, 1989)

## 5. Matériel végétal

### 5.1. Choix des plantes

Les plantes étudiées ont été choisies essentiellement sur la base de leur intérêt thérapeutique et les activités antioxydantes de leurs essences végétales.

### 5.2. Collecte du matériel végétal

*Ammoides verticillata* et *Allium sativum* ont été collectées aux mois d’avril, Mai et Juin de l’année 2018. *Curcuma longa* a été acheté auprès d’un herboriste. Les parties des plantes étudiées et les sites de récolte sont présentés dans le tableau 5.

Tableau 5 : Paramètres géographiques des sites des espèces récoltées.

Plantes	Sites de Collecte	Période de récolte	Parties Etudiées
<i>A. verticillata</i>	TERNI (TLEMEN)	Avril-Mai (2018)	Parties aériennes
<i>A. sativum</i>	Beni-Snous (Tlemcen)	Mai-Juin (2018)	Bulbes
<i>C. longa</i>	Commerce (Tlemcen)	Février (2019)	Rhizomes

### 5.2.1. Procédés d'extraction des huiles essentielles

Les huiles essentielles ont été obtenues par hydrodistillation dans un appareil de type Clevenger (Fig. 26) pendant 5h.



Figure 26 : Montage d'hydrodistillation type Clevenger

### 5.2.2. Conservation des huiles essentielles

Les échantillons ont été conservés au réfrigérateur (4°C) dans des piluliers bruns bien fermés, pour éviter tout risque de dégradation de l'huile essentielle.

### 5.2.3. Détermination du rendement en huiles essentielles

Le rendement des huiles essentielles (Rmt) est défini comme étant le rapport entre la masse de l'huile essentielle obtenue et la masse végétale sèche traitée (Carrée et al., 1953)

**Rmt:** rendement en huile essentielle exprimé en pourcentage (% p/p).

**P1:** poids en (g) d'HE.

**P0:** poids en (g) de la matière végétale sèche traitée.

$$Rmt = P1 * 100 / P0$$

**5.3. Analyse des huiles essentielles****5.3.1. Chromatographie en phase gazeuse (CPG)**

Les analyses par chromatographie en phase gazeuse ont été réalisées à l'aide d'un chromatographe Perkin Elmer Clarus 600 (Walton, MA, Etats Unis), équipé d'un injecteur split/splitless, de deux colonnes capillaires Rtx-1 (polydiméthyl-siloxane, 60 m x 0,22 mm d.i., épaisseur du film de phase stationnaire : 0,25  $\mu\text{m}$ ) et Rtx-WAX (polyéthylène glycol, 60 m x 0,22 mm d.i., épaisseur du film de phase stationnaire : 0,25  $\mu\text{m}$ ) et de deux détecteurs à ionisation de flamme. Le gaz vecteur utilisé est le dihydrogène, la pression en tête de colonne est de 25 psi avec un débit de 1 ml/mn, la température de l'injecteur et des détecteurs est de 280°C. La programmation de la température consiste en une élévation de 60 à 230°C à 2°C/mn puis en un palier de 35 mn à 230°C. L'injection se fait en mode split 1/50. Le volume injecté des échantillons (huiles essentielles et fractions) est de 0,2  $\mu\text{l}$ . Pour chacun des composés, les indices de rétention polaire et apolaire sont calculés par extrapolation linéaire à partir des temps de rétention d'une gamme d'étalon d'alcanes.

**5.3.2. Conditions CPG-SM**

Les analyses ont été réalisées à l'aide d'un chromatographe Perkin Elmer Autosystem XL (Walton, MA, Etats Unis), doté d'un injecteur automatique et de deux colonnes (60 m x 0,22 mm d.i. ; épaisseur du film de la phase stationnaire : 0,25  $\mu\text{m}$ ) polaire (Rtx-Wax) et apolaire (Rtx-1), couplées à un détecteur de masse Perkin Elmer Turbo Mass. Les molécules sont bombardées par un faisceau électronique de 70eV. L'injection se fait par mode split avec un rapport de division de 1/80. La quantité injectée est de 0,2  $\mu\text{L}$ .

Les spectres de masse obtenus par impact électronique ont été acquis sur la gamme de masse 35-350 Da. La température de la source est de 150°C. Les conditions chromatographiques (programmation de température, gaz vecteur, etc.) sont identiques à celles décrites précédemment (Cf. 5.3.1).

**5.3.3. Identification des composés**

L'identification de chaque composé des mélanges a été réalisée par comparaison :

- (i) des indices de rétention calculés respectivement sur colonnes polaire et apolaire avec ceux des composés standards (bibliothèque laboratoire) ou ceux rapportés dans la littérature ;
- (ii) des spectres de masse (impact électronique) avec ceux des composés standards (bibliothèque laboratoire) ou ceux présents dans les banques informatisées.

## 6. Activité antioxydante

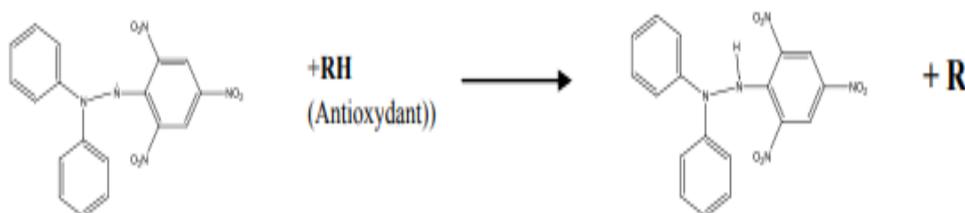
La capacité antioxydante des HEs extraites (*A. verticillata*, *C. longa* et *A. sativum*) peut être influencée par un grand nombre de facteurs et ne peut pas être complètement évaluée par une seule méthode ; il est nécessaire de réaliser plus d'un type de capacité antioxydante. Dans ce travail on a choisi la technique de piégeage du radical libre DPPH• (Blois, 1958).

- **Piégeage du radical libre DPPH• (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl)**

L'un des premiers radicaux libres exploité pour évaluer l'activité antioxydante est le radical libre (DPPH•) (Blois, 1958)

### Principe :

Le radical DPPH• possède un électron non apparié sur un atome du pont d'azote (figure 27). En raison de cette délocalisation, les molécules du radical ne forment pas de dimères mais restent dans leur forme monomère relativement stable à température ambiante. La mesure de l'efficacité d'un antioxydant se fait par l'observation de l'intensité de la coloration violette du DPPH•, en solution alcoolique qui vire vers le jaune pâle après sa réduction par une substance donneuse de protons, se traduisant par une diminution de l'absorbance à 517 nm.



**Figure 27 :** Réaction entre le radical libre DPPH• et l'antioxydant.

**Procédure :** 0,003g de DPPH• ont été dissouts dans 100 mL d'éthanol 96% (v/v), puis recouverts de papier aluminium et conservés dans le réfrigérateur pendant 30 min. Pour chaque huile de *A. verticillata*, *C. longa* et *A. sativum*, nous avons utilisé des concentrations comprises entre 0,015 et 7,5mg/mL préparées à partir d'une solution-mère (15mg/mL). Les différentes solutions ont été ajustées à un volume de 1mL par de l'éthanol, en ajoutant 1mL de la solution éthanolique de DPPH•.

Le tout est incubé durant 30min à l'obscurité et à température ambiante ; le contrôle négatif était constitué uniquement de 1mL d'éthanol et 1mL de DPPH•. Les absorbances ont été mesurées à une longueur d'onde de 517nm par un spectrophotomètre ultraviolet contre le blanc (l'éthanol). L'évaluation de l'activité antioxydante permet de déterminer la concentration qui correspond à 50% d'inhibition (CI50), ce qui exprime l'efficacité des huiles (**Takao et al., 1994**).

**Procédure des mélanges croisés :** Pour l'étude des mélanges croisés des trois huiles, nous avons utilisé la méthode du piégeage du radical libre DPPH•. Les concentrations utilisées étaient de 15mg/mL pour les associations double et triple des huiles essentielles. Des ratios de 1 :1 ont été préparés pour la préparation des concentrations de chaque mélange. Le pourcentage d'inhibition de l'activité antioxydante a été calculé suivant la formule :

$$\% = [(A0 - A1)/A0] \times 100$$

Avec :

%; pourcentage d'inhibition.

A0 : absorbance du contrôle négatif.

A1 : absorbance de l'échantillon après 30 min.

## **7. Activité Antimicrobienne**

L'activité antimicrobienne des huiles essentielles a été évaluée contre des souches de référence (Tableau 6) gracieusement fournies par le Laboratoire des Produits Naturels, Département de Biologie, Université Abou Bekr BELKAID, Tlemcen.

Deux méthodes de vérification in vitro de l'activité antimicrobienne ont été utilisées :

- la méthode de diffusion en disque sur milieu gélosé pour évaluer l'activité en contact ;

-la méthode de micro-dilution sur microplaque pour la détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI) et des concentrations minimales bactéricides (CMB).

Par ailleurs nous avons attribué à chaque huile essentielle son indice aromatique, pour cela l'activité antimicrobienne a été réalisée sur un échantillon de quatre souches phytopathogènes qui se présentent comme suit :

Tableau 6: les souches microbiennes utilisées

Microorganismes	
Bactéries	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
	<i>Staphylococcus aureus</i>
	<i>Bacillus cereus</i>
Levure	<i>Candida albicans</i>

### 7.1. Méthode de disques

L'activité antimicrobienne des huiles essentielles a été testée selon la méthode de diffusion de disque selon les normes du Comité National pour les Normes de Laboratoire Clinique (NCCLS, 2001), en utilisant 100 µl de suspension microbienne, contenant  $2 \times 10^8$  UFC / ml pour les bactéries et  $1 - 5 \times 10^6$  UFC / ml pour *Candida albicans*. La gélose Mueller-Hinton et la gélose Sabouraud stérilisées ont été distribuées dans des boîtes de Pétri stérilisées de 9 cm de diamètre, après solidification, elles ont été inoculées avec les microorganismes testés. Des disques de papier filtre (6 mm de diamètre) imprégnés de 10 µl d'huile ont été ensuite placés sur les géloses. Les boîtes de Pétri ont été maintenues à 4 ° C pendant 2 h, puis incubées à 37 ° C pendant 24 h pour les bactéries et à 30°C pendant 24 et 48 h pour la levure.

Les diamètres des zones d'inhibition (mm) ont été mesurés, y compris le diamètre des disques. Tous les tests ont été réalisés en double.

Les huiles essentielles seront ainsi classées selon l'échelle de **Ponce et al. (2003)** en :

- HE non active (-): si le diamètre d'inhibition ne dépasse pas 8mm ;
- HE active (+) : si  $9 < \text{diamètre} < 14\text{mm}$  ;
- HE très active (++) : si  $15 < \text{diamètre} < 19\text{mm}$  ;
- HE extrêmement active (+++) : si le diamètre dépasse 20mm.

## **7.2. Détermination des CMI et CMB**

La méthode de microdilution sur microplaque en utilisant du Mueller Hinton liquide a été utilisée pour la détermination des Concentrations Minimales Inhibitrices (CMI) et les Concentrations Minimales Bactéricides (CMB) des huiles essentielles actives (diamètre  $\geq 9$  par la méthode de disques), selon la technique publiée par le Comité national des Normes du Laboratoire Clinique (NCCLS, 2001).

Les huiles essentielles ont été dissoutes dans du diméthylsulfoxyde (DMSO) à 1% à la concentration la plus élevée, puis une gamme de dilution de demi en demi a été préparée dans le bouillon Mueller Hinton, préalablement distribué dans les cupules, puis ont été ajoutés les inoculats microbiens à des concentrations finales de  $5 \times 10^5$  UFC/ml pour les bactéries et  $2.5 \times 10^6$  UFC/ml pour la levure *C. albicans*.

La CMI est définie comme la plus faible concentration de l'huile essentielle qui ne montre aucune croissance bactérienne visible (pas de trouble visuel) après une incubation de 24h à 37°C.

Pour déterminer la CMB, des aliquotes de 10 ul sont prélevées à partir de cultures, au niveau des puits ne présentant pas de turbidité visible, etensemencées sur des milieux gélosés et incubées pendant 24h à 37 °C, la CMB est la plus faible concentration qui inhibe toute culture visible sur gélose après la période d'incubation.

Le rapport CMB / CMI a également été calculé pour mettre en évidence la nature de l'effet antimicrobien de l'huile essentielle testée. Lorsque le rapport est inférieur à 4, l'huile essentielle est considérée comme étant bactéricide et lorsque le ratio est supérieur à 4, elle est considérée comme une huile essentielle bactériostatique (Lakhdar et al., 2016)

## **8. Procédé d'encapsulation par coacervation complexe**

### **8.1. Matériel et produits chimiques**

Le protocole de coacervation est une adaptation du brevet WO2014057202A1 (Ollagnier, 2014)

#### **a) matière active**

- Huile essentielle d'*Ammoides verticillata*.

#### **b) Produits chimiques**

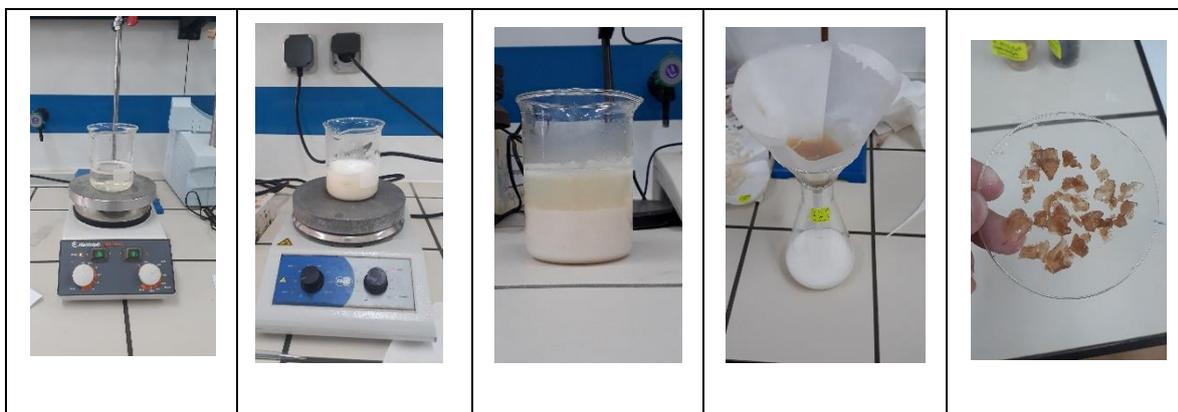
- Gélatine (protéine)
- Gomme arabique (polysaccharide)

- Trans glutaminase/ glutaraldehyde/Tween 80 (agent de durcissement)
- Hydroxyde de Sodium
- Acide chlorhydrique

## 8.2. Mode opératoire

Le mode opératoire adopté comprend les étapes suivantes :

- 1) Préparation de la solution S1 ( $V_1=100$  ml) de gélatine 43% (g/g) : 57 ml d'eau et 43 g de gélatine sont mélangés dans un bécher. La solution est agitée à une température de 50°C pour faciliter la dissolution de gélatine dans l'eau (bain d'eau chaude à 50°C) ;
- 2) préparation de la solution S2 ( $v_2=100$ ml) de gomme arabique GA (57% (g/g)) : 43 ml d'eau et 57 g de GA sont mélangés dans un bécher ;
- 3) la solution S1 et la solution S2 sont mélangées sous agitation à 50°C (S3 200ml),
- 4) l'huile essentielle est ajoutée goutte à goutte (1, 2, 4 ou 8 g) à la solution S3 et homogénéisée dans un homogénéisateur pendant 3 min (10 000 rpm) ;
- 5) dans un bain-marie à 40°C, un volume de 1200 ml d'eau déionisée à 40°C est ajouté à la solution S3. la solution S4 (S3+1200 ml d'eau) ;
- 6) le PH de la solution S4 est ajusté à 3,8 par l'ajout de l'acide chlorhydrique avec agitation (400 rpm) pendant 10 mn ;
- 7) la solution S4 est refroidie jusqu'à 15°C dans un bain de glace ;
- 8) le PH de la solution S4 est ajusté à 6 par l'ajout de l'hydroxyde de sodium ;
- 9) le transglutaminase (agent durcisseur), est ajouté à la solution S4 (15u/g de gélatine) sous agitation ;
- 10) après 12h, les microcapsules formées, sont séchées, filtrées et rincées par l'eau distillée.



**Figure 27.** Procédé de coacervation complexe utilisant de la gélatine et de la gomme arabique comme polymères.

Le pH et les proportions de chaque polymère (gélatine et gomme arabique) sont déterminés à partir de dosage pH-métrique et conductimétrique.

#### **4.1. Calcul du rendement d'encapsulation (%)**

La formule du rendement d'encapsulation est présentée ci-dessous :

$$\text{Rendement d'encapsulation (\%)} = (\text{Masse PA} / \text{Masse PAE}) \times 100$$

Calcul du pourcentage de rendement d'encapsulation

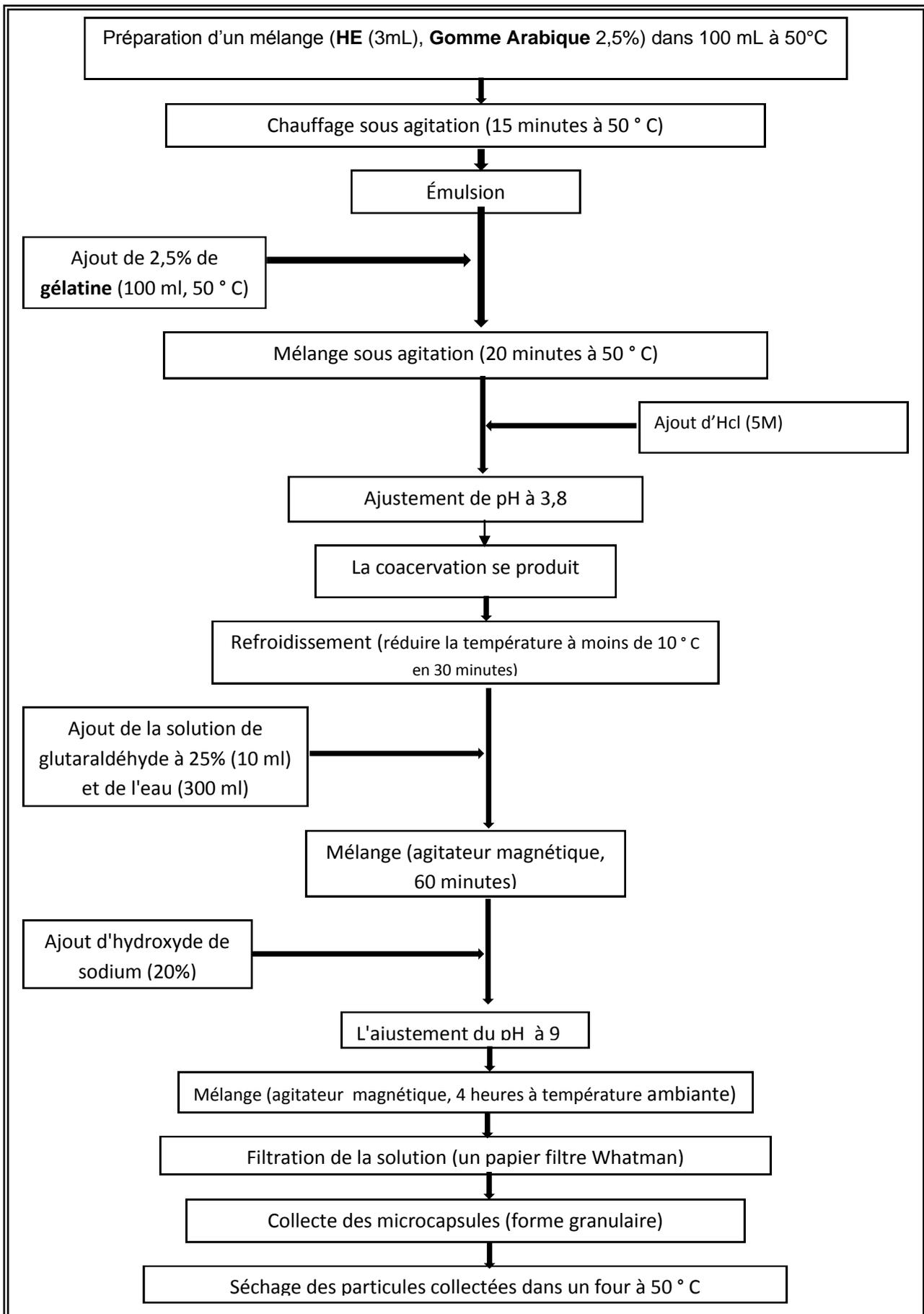
Avec :

**Masse PA** : Masse du produit encapsulé

**Masse PAE** : Masse du produit à encapsuler

Le protocole expérimental est représenté dans la **figure 28** suivante :

Figure 28 : protocole expérimental



## *CHAPITRE III :*

---

# **RESULTATS ET DISCUSSION**

---

Les attaques de *Bactrocera oleae* ont été étudiées en 2017 dans la station de Bouhanak durant trois mois, d'octobre à décembre (12 sorties).

L'infestation des olives par *Bactrocera oleae* a été évaluée selon la date de prélèvement, étroitement liée à la saison et aux conditions climatiques qui sévissent à cette période.

L'étude mycologique de nos olives a montré une diversité des genres présents. Par ailleurs l'étude phytochimique nous a permis d'identifier les principaux composés ayant des effets insecticides, fongicides et bactéricides, confirmant ainsi le pouvoir des huiles essentielles des plantes étudiées à l'encontre des bioagresseurs de l'olivier.

## 1. Etude Entomologique

Comme tous les êtres vivants, dont principalement les insectes, la mouche de l'olive a une biologie qui dépend de tous les facteurs écologiques.

La biologie de l'insecte est conditionnée pour une bonne part par les facteurs climatiques, notamment les températures. En effet, au-dessous de 12°C et au-dessus de 30°C, l'activité reproductrice des femelles est totalement arrêtée.

Au niveau de cette étude, nous nous sommes intéressés particulièrement à l'incidence de la date d'observation, avec ses particularités climatiques, sur les attaques du phytophage *B.oleae*, qui nous renseigne sur la répartition temporelle ou cinétique des attaques.

Nous avons analysé l'incidence de ce facteur sur le nombre de piqûres et de trous de sortie qui déterminent le degré d'infestation des olives par ce phytophage.

### 1.1. Effet de la date

Il existe des variations du degré d'infestation suivant les dates d'observation. Celles-ci s'expliquent par le degré de maturation donc de réceptivité du fruit et par les variations climatiques qui évoluent au cours du temps.

En effet, **Jerraya et al. (1982)** ont démontré que l'infestation est liée à un stade de croissance bien défini, lequel peut être observé à des dates fort différentes selon les années et les régions considérées.

L'estimation du taux d'infestation a été réalisée à partir des nombres de piqûres et de trous de sortie. Ces derniers étant les deux facteurs les plus représentatifs des infestations.

1.1.1. Effet de la date en fonction des piqûres

Les valeurs moyennes calculées par date sont représentées dans la figure 29, il existe une variation hautement significative du nombre de piqûres d'une sortie à l'autre. Le taux de piqûres a varié significativement en fonction de la date d'observation avec  $F_{obs} = 2.84$  pour  $P = 0,002$ .

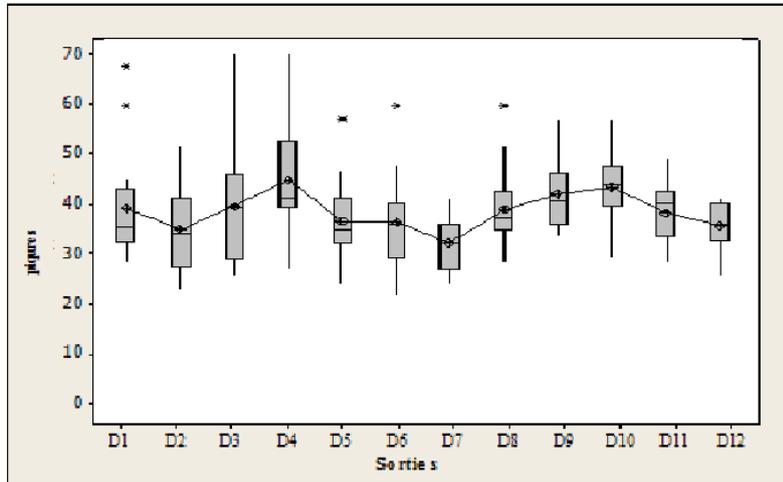


Figure 29: Variation du nombre moyen de piqûres en fonction des dates

Limites de confiance = 95 % distinctes pour la moyenne en fonction de l'écart type regroupé  
 Ecart type regroupé = 6,557

1.1.2. Effet de la date en fonction des trous de sortie

D'après la figure 30, le nombre moyen de trous de sortie a subi des variations hautement significatives en fonction des dates avec un  $F_{obs} = 38,82$  pour  $P = 0,000$

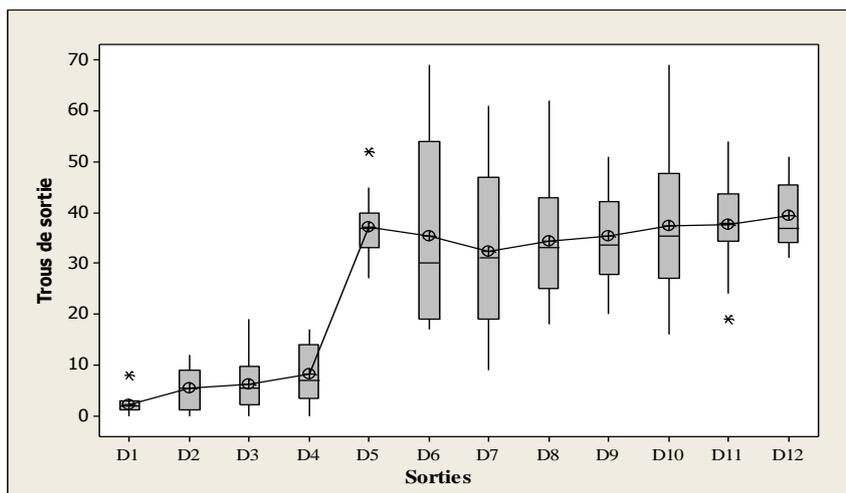


Figure 30 : Variation du nombre moyen de trous de sortie en fonction des dates

Limites de confiance = 95 % distinctes pour la moyenne en fonction de l'écart type regroupé,  
 Ecart type regroupé = 9,787

### 1.2. Corrélations entre les caractères liés à l'infestation de l'olive et la date

La relation entre les caractères liés à l'infestation de l'olive par *B. oleae* et la date d'observation a été analysée par la recherche de corrélations linéaires.

Les résultats ont montré une absence totale de corrélation linéaire entre les piqures et la date (Tableau 7) alors que les trous de sortie présentent une corrélation de plus de 50% avec la date ; ce qui signifie qu'il existe une relation positive entre les trous de sortie et les dates de prélèvement. Nous pouvons donc prédire le nombre de trous de sortie en fonction des dates d'observation.

**Tableau 7** : corrélations linéaires des piqures et trous de sortie en fonction des dates

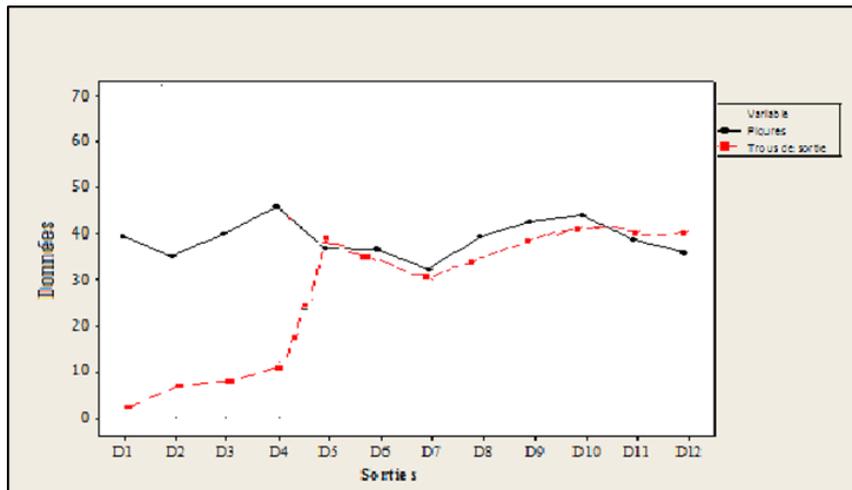
Valeur de p = 0,401	Valeur de p = 0,000
---------------------	---------------------

L'absence de corrélation entre les nombres de piqures et les dates de prélèvements est principalement due à un grand nombre de piqûres stériles, à la chute des fruits fortement infestés et/ou à l'inhibition de la ponte si la surface des fruits a des propriétés défavorables qui sont perçues par les récepteurs antennaires et tarsiens (Haniotakis et Voyadjoglou, 1978).

### 1.2. Cinétique des populations de *B. oleae* dans la station de Bouhanak

La figure 31 montre l'évolution des différents stades du phytophage *Bactrocera oleae* au cours de la période d'étude, dans la région de Bouhanak.

Cette figure confirme l'indépendance des variables. Elle présente deux courbes qui présentent la même allure avec un léger décalage correspondant au développement larvaire qui précède la sortie des pupes. Les deux variables ont présenté chacune un seul pic important, correspondant à l'apparition d'une nouvelle génération durant la période d'étude, à la quatrième date D4, à la fin du mois de septembre où les conditions climatiques sont favorables d'une part aux pupes pour sortir du fruits et d'autre part à l'apparition d'une nouvelle génération d'adultes.



**Figure 31** : Fluctuations du nombre moyen des piqures et de trous de sortie par date

La figure 31 confirme la prédominance des piqures sur les trous de sortie et leurs fluctuations au cours des différentes dates d'observation, ce qui implique qu'un bon nombre de piqures étaient stériles (sans dépôt d'œufs).

## 2. Etude phytochimique

Les huiles essentielles HEs sont très utilisées en cosmétique, parfumerie et dans les industries agroalimentaires. Elles sont également connues pour leurs propriétés biologiques comme dépuratives et régénérantes. Elles sont recommandées pour stimuler et régénérer l'organisme (Burt, 2004).

Dans cette partie de notre travail, nous nous sommes intéressés à l'étude de trois plantes très utilisées en Algérie pour leurs vertus médicinales. Il s'agit dans ce travail d'examiner les compositions chimiques des HEs, de leurs parties aériennes et leurs activités biologiques.

### 2.1. Caractéristiques des huiles essentielles extraites

Les caractéristiques des trois huiles sont représentées dans le **tableau 8**.

De nombreuses différences et similitudes liées à leurs propriétés organoleptiques ont été observées.

**Tableau 8** : Propriétés organoleptiques des trois huiles essentielles

Huiles essentielles	Couleur	Aspect	Odeur
<i>A. verticillata</i>	Jaune	Liquide huileux	Aromatique Forte et épicée
<i>A. sativum</i>	Jaune foncé	Liquide huileux	Forte et piquante
<i>C. longa</i>	Jaune pale	Liquide huileux	Aromatique acre, Forte et piquante

### 2.2. Rendement en huiles essentielles des plantes étudiées

Les rendements (en %) des différentes plantes étudiées sont présentés dans le Tableau 9.

**Tableau 9** : Rendements en huiles essentielles des plantes étudiées

Plantes	Rendements %
<i>A. verticillata</i>	2,6%
<i>C. longa</i>	1,15%
<i>A. sativum</i>	0,18 %

Le rendement en huile essentielle extraite de la partie aérienne de *Ammoides verticillata* était de 2,6%, suivi de celui de l'huile essentielle de *Curcuma longa* (1,15%) alors que le plus faible rendement a été observé pour l'huile essentielle de *Allium sativum* (0,18%).

A titre comparatif, le rendement de notre huile essentielle de *A. verticillata* a été sept fois supérieur à celui rapporté par **Laouer et al. (2003)** dans la région de Sétif. D'autre part, le rendement en huile essentielle de *C. longa* obtenu dans notre étude a été deux fois inférieur à celui trouvé par **Singh et al. (2010)**, alors que pour *A. sativum*, un rendement identique a été obtenu par **Prabodh Satyal et al. (2017)** aux Etats-Unis.

### 2.3. Composition chimique des huiles essentielles étudiées

Les huiles essentielles obtenues à partir des trois plantes par la méthode d'hydrodistillation ont été analysées à l'aide des techniques de chromatographie en phase gazeuse (GC) et de chromatographie en phase gazeuse couplée à une spectrométrie de masse (GC-MS).

La composition chimique des huiles essentielles est présentée dans le tableau 10.

**Tableau 10: Composition chimique des huiles essentielles**

No. <sup>a</sup>	Composés	IR <sub>a</sub> <sup>b</sup>	IR <sub>a</sub> <sup>c</sup>	Pourcentages			Identification <sup>d</sup>
				A. <i>verticillata</i>	A. <i>sativum</i>	C. <i>longa</i>	
1	Diallyl disulfide	846	847	-	3,9	-	RI, MS
2	Allyl methyl disulfide	908	906	-	4,4	-	RI, MS
3	Methyl trans-propenyl disulfide	926	1536	-	0,8	-	RI, MS
4	$\alpha$ -Thujene	932	925	0,1	-	-	RI, MS
5	$\alpha$ -Pinene	931	932	0,6	-	-	RI, MS
6	Dimethyl trisulfide	948	953	-	2,2	-	RI, MS
7	Sabinene	964	966	0,1	-	-	RI, MS
8	Myrcene	976	982	0,5	-	-	RI, MS
9	p-Cymene	1010	1012	25,2	-	-	RI, MS
10	Limonene	1020	1021	28,1	-	-	RI, MS
11	$\gamma$ -Terpinene	1047	1049	9,6	-	-	RI, MS
12	Terpinen-4-ol	1161	1162	0,8	-	-	RI, MS
13	Diallyl disulfide	1079	1070	-	29,8	-	RI, MS
14	Allyl methyl trisulfide	1126	1119	-	16,8	-	RI, MS

15	1,4-Dimethyltetrasulfide	1238	1240	-	0,5	-	RI, MS
16	Thymol	1266	1269	0.2	-	-	RI, MS
17	Carvacrol	1282	1278	33,2	-	-	RI, MS
18	Diallyl trisulfide	1288	1278	-	31,5	-	RI, MS
19	$\alpha$ -Humulene	1456	1456	0,1	-	-	RI, MS
20	$\gamma$ -Muurolene	1471	1469	0,2	-	-	RI, MS
21	Diallyl tetrasulfide	1482	1509	-	1,6	-	RI, MS
22	$\beta$ -Sesquiphellandrene	1516	1517	-	-	10,5	RI, MS
23	tans-Caryophyllene	1521	1518	-	-	0,3	RI, MS
24	(E)- $\alpha$ -Bisabolene	1532	1536	-	-	0,3	RI, MS
25	cis-Hydrate sesquisabinene	1565	1564	-	-	2,1	RI, MS
26	Germacrene-B	1553	1559	-	-	1,1	RI, MS
27	trans-Sabinene hydrate	1565	1562	-	-	0,4	RI, MS
28	Caryophyllene oxide	1576	1578	-	-	2,1	RI, MS
29	Zingiberenol 1	1599	1599	-	-	0,9	RI, MS
30	Zingiberenol 2	1613	1614	-	-	2,8	RI, MS
31	Ar-Turmerone	1639	1642	-	-	32,1	RI, MS
32	$\alpha$ -Turmerone	1649	1656	-	-	24,5	RI, MS
33	$\beta$ -Bisabolol	1653	1660	-	-	0,4	RI, MS
34	$\beta$ -Turmerone	1680	1685	-	-	15,6	RI, MS
<b>Identification %</b>				<b>98,7</b>	<b>91,5</b>	<b>93,1</b>	
Monoterpene hydrocarbons				39.0	-	-	
Oxygenated monoterpenes				59.4	-	-	
Oxygenated sesquiterpenes				-	-	82.0	
Sesquiterpene hydrocarbons				0,3	-	11,1	
Sulfur compounds				-	91,5	-	
<sup>a</sup> Order of elution is given on apolar column (Rtx-1). <sup>b</sup> Retention indices of literature on the apolar column (IRIa). <sup>c</sup> Retention indices on the apolar Rtx-1 column (RIa). <sup>d</sup> RI: Retention Indices; MS: Mass Spectra in electronic impact mode.							

Douze composants représentant 92,4% ont été identifiés dans l'huile essentielle *de A. Verticillata* (Tableau 10). L'huile essentielle était principalement représentée par les monoterpènes oxygénés (59,4%), suivis des hydrocarbures monoterpéniques (39,0%).

Les principaux composants étaient le carvacrol (33,2%), le limonène (28,1%) et le p-cymène (25,2%).

La recherche bibliographique menée sur la composition des HEs de *A. verticillata* a montré une variation significative dans les pourcentages des constituants majoritaires. En Algérie, *A. Verticillata* a présenté des chémotypes de thymol (**Attou et al., 2019**) et de carvacrol (**Benyoucef et al., 2019**).

**Bekhechi et al. (2010)** ont isolé et identifié, par GC-MS, quatorze composants ; les principaux constituants du stade de floraison étaient l'isothymol, alors que dans d'autres cas, le thymol était prédominant.

A Tlemcen, **Tefiani et al. (2015)**, en Inde (**Bhargava et Hakasas, 1959**), en Egypte (**Balbaa et al., 1973**) et en Turquie (**Chialva et al., 1993**), l'huile de *A. verticillata* était caractérisée par la présence d'un pourcentage élevé en thymol (10,8-61,3%), suivi par le p-cymène (18,1-37,4%) et le  $\gamma$ -terpinène (6,8-25,5%). En revanche, l'huile provenant du Maroc (**El Ouariachi et al., 2011**) était caractérisée par le carvacrol avec un pourcentage de 44,6%, suivi du limonène (18,4%) et le p-cymène (9,4%).

L'huile essentielle de *A. Sativum* n'était représentée que par des composés soufrés avec un pourcentage de 91,5%. Les principaux composants étaient le trisulfure de diallyle (31,5%), le disulfure de diallyle (29,8%) et le trisulfure d'allyle méthyle (16,8%).

La composition de l'huile de notre étude montre des similitudes quantitatives avec les rapports publiés précédemment sur l'huile de l'ail. Dans les travaux précédents, le disulfure de diallyle (27,1-46,8%) et le trisulfure de diallyle (19,9-34,1%) étaient les composants dominants, suivis par le trisulfure d'allyle méthyle (8,3-18,2%) et le disulfure d'allyle méthyle (4,4-12,0). % (**Douiri et al., 2013 ; Mnayer et al., 2014**).

Par exemple, les principaux composants de l'huile essentielle d'ail serbe étaient le trisulfure de diallyle (33,6%), le disulfure de diallyle (28,1%) et le trisulfure d'allylméthyl (17,8%) (**Kocić-Tanackov et al., 2012**). Pour l'huile d'ail française c'était le disulfure de diallyle (37,9%), le trisulfure de diallyle (28,1%) et le trisulfure d'allyle méthyle (7,3%), le sulfure de diallyle (6,6%), le tétrasulfure de diallyle (4,1%) et le disulfure d'allyle méthyle (3,7%) (**Mnayer et al., 2014**).

La composition chimique de l'huile essentielle de *C. longa* se caractérise principalement par des monoterpènes oxygénés tels que l'Ar-turmerone (32,1%), l' $\alpha$ -turmerone (24,5%) et la  $\beta$ -turmerone (15,6%). Notre étude a montré que les principaux composants de l'huile essentielle de *C. longa* étaient l'ar-turmerone, l' $\alpha$ -turmerone et la  $\beta$ -turmerone. Ces résultats concordent avec ceux obtenus précédemment par **Singh et al. (2002)** et **Gounder et Lingamallu (2012)**.

L'huile provenant de l'Inde était caractérisée par la présence d'un pourcentage élevé en  $\alpha$ -turmérone avec un pourcentage de 51,7% à Gorakhpur, 31,1% à Calcutta, 38,6% au Pakistan et de 49,3% au Brésil, suivi d'un pourcentage en  $\beta$ -turmérone de 12,9% au Pakistan, et un pourcentage appréciable en  $\alpha$ -turmérone en Inde (11,9%) et au Pakistan (8,90%) (**Dosoky et Setzer, 2018**).

### 3. Pouvoir antioxydant

#### 3.1. Evaluation des propriétés antioxydantes des trois huiles essentielles

Les plantes aromatiques sont utilisées depuis plusieurs années dans le processus du stress oxydatif (déséquilibre entre la génération des Espèces Réactives dérivées de l'Oxygène (ERO)) et la lutte contre les maladies infectieuses.

L'étude de l'activité d'une huile est à mettre en relation avec sa composition chimique et les possibles effets synergiques entre ses composants et non seulement à ses composés majoritaires (Valnet, 2005).

Les HEs ne sont pas seulement utilisées en monothérapie mais aussi en association depuis de nombreuses années (Miladinović et al., 2015). Elles sont utilisées pour agir en synergie afin d'améliorer encore plus leurs effets. L'effet synergique possible produit par la combinaison d'huiles essentielles de plantes a été considéré comme une stratégie efficace pour inhiber ou réduire le processus naturel d'oxydation des aliments.

#### 3.2. Piégeage du radical libre DPPH•

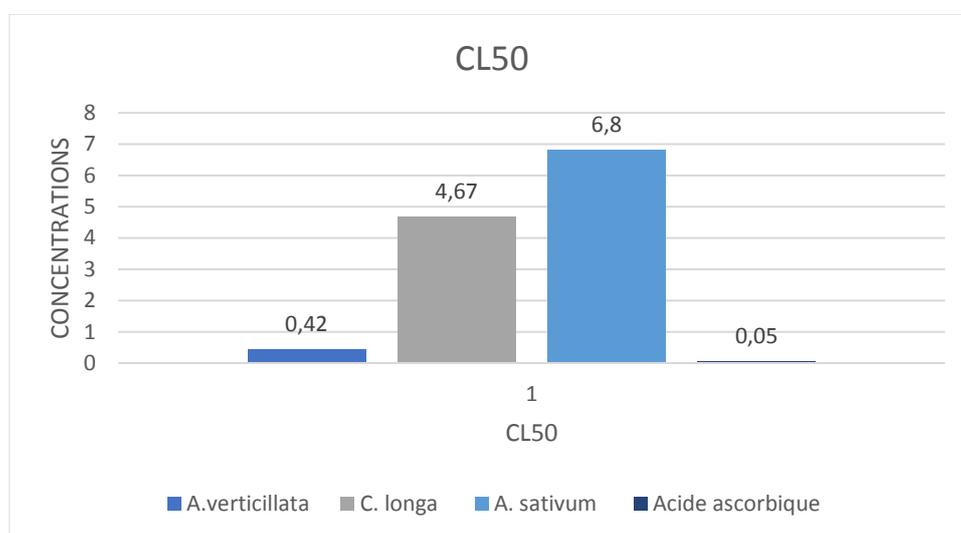
Les résultats du pouvoir antioxydant obtenus lors du test de mesure du piégeage du radical DPPH• sont représentés dans le **Tableau 11**.

**Tableau 11** : Pourcentages d'inhibition du radical libre DPPH• en fonction des concentrations des huiles essentielles de *A. verticillata*, *C. longa* et *A. sativum*.

Huiles essentielles	Concentration (mg/mL)	ACTIVITES ANTIOXYDANTE				
		2,5	2	0,42	0,24	0,1
<b>A. verticillata</b>	Effet du balayage sur le DPPH• (%)	98,2	86,7	50	44,8	43,3
		11,5	<b>4,67</b>	2,3	1,15	/
<b>C. longa</b>	Effet du balayage sur le DPPH• (%)	91,5	50	36,9	27,4	/
		10,9	<b>6,8</b>	1,1	0,54	0,26
<b>A. sativum</b>	Effet du balayage sur le DPPH• (%)	79,8	50	8,2	4,7	2,7
		0,08	0,06	<b>0,05</b>	0,04	/
<b>Acide ascorbique</b>	Effet du balayage sur le DPPH• (%)	97,8	68,5	50	39,04	/

Les résultats de l'activité anti-oxydante ont indiqué que le pourcentage d'inhibition était proportionnel à la concentration des échantillons dans le milieu réactionnel. D'après les valeurs du tableau 11, nous constatons que l'huile de *A. verticillata* avait une meilleure activité inhibitrice du radical DPPH• avec un pourcentage de 98,2% d'inhibition, à une dose de 2,5mg/mL. Alors que celles de *C. longa* et *A. sativum* ont respectivement enregistré des pourcentages de 91,5% et 79,8% à la même concentration.

La CI50 (Concentration inhibitrice) est inversement liée à l'activité antioxydante, car cette valeur exprime la quantité d'antioxydant requise pour diminuer la concentration du radical libre de 50%. Plus la valeur de la CI50 est grande, plus l'activité antioxydante d'un composé est faible.



**Figure 32:** CI50 des huiles essentielles déterminées par la méthode DPPH•

D'après les résultats du pouvoir antioxydant par la méthode du DPPH•, l'HEs qui a possédé le plus fort pouvoir antioxydant était celle de *A. verticillata* avec une concentration de l'ordre de 0,42 mg/mL, suivie par celle du *C. longa* (4,7 mg/mL) puis *A. sativum* (6,8mg/mL).

Dans l'étude réalisée par **Kedia et al. (2015)**, l'huile essentielle de *A. verticillata* a enregistré une CI50 de l'ordre de 0,47 µL/mL. En étudiant l'activité antioxydante de *C. longa*, **Priya et al. (2012)** ont obtenu une CI50 de 3,2mg/mL, et pour l'HEs de l'ail, **Lawrence et al. (2011)** ont obtenu une CI50 de 0,5 mg/mL.

### 3.3. Matrice croisée

Les interactions entre les agents biologiquement actifs sont un sujet important dans le domaine thérapeutique. Dans cette partie, nous avons étudié l'activité antioxydante des mélanges des

huiles essentielles par la méthode de piégeage du radical libre DPPH•, afin d'évaluer leurs effets synergiques, additifs ou antagonistes (**Tableau 12**).

**Tableau 12** : Résultats des combinaisons doubles et triples entre les trois huiles essentielles

<i>A. verticillata</i> mg/mL	<i>C. longa</i> mg/mL	<i>A. Sativum</i> mg/mL	CI50 mg/MI
5	5	5	<b>4,35</b>
7,5	7,5	/	<b>3,54</b>
7,5	/	7,5	<b>3,35</b>
/	7,5	7,5	<b>8,99</b>
<b>0,42</b>	<b>4,7</b>	<b>6,8</b>	<b>CI50 Individuelles</b>

La combinaison des mélanges croisés des huiles essentielles avec différents ratios a montré que le mélange des huiles essentielles présentait des effets antagonistes et additifs pour l'activité antioxydante. En effet, la combinaison des huiles essentielles augmente considérablement les CI50 par rapport aux huiles individuelles. Il est à noter que la combinaison de l'HEs de *A. verticillata* avec celle de *C. longa* et *A. sativum* (CI50= 4,35 mg/mL) présentait un effet antagoniste par rapport à l'huile de *A. verticillata* (CI50= 0,42 mg/mL) et un effet synergique par rapport à l'huile de *C. longa* (CI50= 4,7 mg/mL) et *A. sativum* (CI50= 6,8 mg/mL).

La combinaison de l'HEs de *A. verticillata* avec celle de *C. longa* (CI50= 3,54 mg/mL) présentait un effet antagoniste par rapport à l'huile de *A. verticillata* (CI50= 0,42 mg/mL) et un effet synergique par rapport à l'huile de *C. longa* (CI50= 4,7 mg/mL).

De même, la combinaison de l'huile de *A. verticillata* avec celle de *A. sativum* (CI50= 3,54 mg/mL) présentait un effet antagoniste par rapport à l'huile de *A. verticillata* (CI50= 0,42 mg/mL) et un effet synergique par rapport à l'huile de *A. sativum* (CI50= 6,8 mg/mL). Alors que la combinaison des HEs de *C. longa* et *A. sativum* présentait un effet antagoniste (CI50= 8,99mg/mL).

Un des avantages majeurs de l'utilisation de cette méthode est d'évaluer la capacité antioxydante d'un aliment, contenant des ingrédients qui ont des activités qui sont lentes ou rapides, et qui ne peuvent pas être calculées en même temps, par une prise en charge de l'ensemble des actions antioxydantes, dans la même matrice (**Caldwell, 2000 ; Kohri et al. 2009**).

L'étude de l'activité antioxydante des HE selon la méthode de piégeage du radical libre DPPH a montré que toutes les huiles étudiées possèdent une activité antioxydante modérée et que l'HE de *Ammoides verticillata* a la plus forte activité. Cette étude laisse entrevoir des perspectives

d'application dans les domaines de l'industrie alimentaire, cosmétique et pharmaceutique. Les résultats obtenus pourraient contribuer à la valorisation de ces plantes aromatiques et médicinales.

#### 4. Activité antiparasitaire de L'huile essentielle de *Ammoides verticillata* sur *Bactrocera oleae*

Au cours des dernières années, l'utilisation des huiles essentielles (HE) extraites des plantes aromatiques comme insecticides à faible risque, a augmenté considérablement en raison de leur popularité auprès des producteurs biologiques et des consommateurs soucieux de l'environnement. Les huiles essentielles sont facilement produites par distillation à la vapeur du matériel végétal et contiennent de nombreux terpènes volatils de faible poids moléculaire et des composés phénoliques.

Les résultats sur la toxicité par fumigation de l'huile de *Ammoides Verticillata* contre le stade L3, les pupes et les adultes de *B. oleae* sont résumés dans le tableau 13.

**Tableau 13 :** Activité insecticide de l'huile essentielle de *A. verticillata*

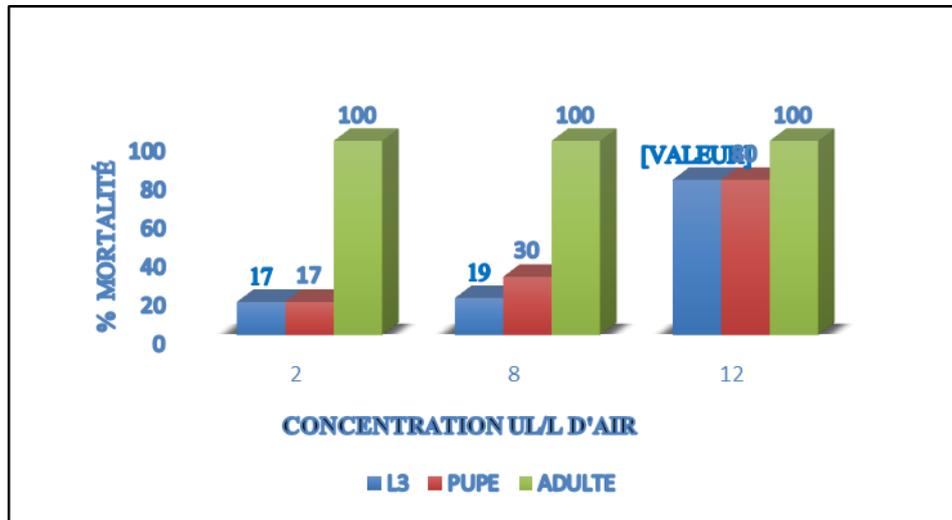
Concentrations ( $\mu\text{L/L}$ air)	% Mortality		
	<i>L3</i>	<i>Pupae</i>	<i>Adults</i>
2.0	$17 \pm 0.1^a$	$17 \pm 0.2^a$	$100 \pm 00^a$
8.0	$19 \pm 0.6^a$	$30,0 \pm 1.1^b$	$100 \pm 00^a$
12.0	$80 \pm 0.1^b$	$80 \pm 00^c$	$100 \pm 00^a$
LC <sub>50</sub>	10.1	7.2	<<2

L'efficacité de l'huile de *A. verticillata* a varié avec sa concentration ; à la concentration la plus faible (2  $\mu\text{L} / \text{L}$  l'air), l'huile essentielle a causé 100% de mortalité des adultes de *B. oleae* après 24 h d'exposition.

À la concentration la plus élevée (12  $\mu\text{L} / \text{L}$  d'air), l'huile a causé une mortalité de 80 ; 80 et 100% contre les stades L3, les pupes et les adultes de *B. oleae* respectivement, après 24 h d'exposition.

Les résultats de l'activité insecticide ont montré une nette corrélation entre la concentration de l'huile et le pourcentage de mortalité des insectes d'essai ; 80 à 100% de mortalité ont été atteints à une concentration d'huile de 12  $\mu\text{L} / \text{L}$  d'air en 24 h.

L'huile essentielle de *A. verticillata* a montré une efficacité prononcée de toxicité par contact (CL50 <à 2 µL / L d'air) pour les insectes adultes, ainsi qu'une bonne toxicité par fumigation pour les pupes (CL50 de 7,2 µL / L d'air) et les stades L3 (CL50 de 10,1 µL / L d'air) (Fig. 33).



**Figure 33 :** Activité insecticide de *Ammoides verticillata* contre les différents stades de la mouche de l'olive *Bactrocera oleae*

La figure 34 en entonnoir a montré que la CL50 de chaque stade de vie de l'insecte était inférieure à 2µl/l d'air pour les adultes, à 7,2µl/l pour les pupes et 10.1µl/l pour les larves L3. Ces résultats suggèrent que l'huile essentielle de *Ammoides verticillata* peut constituer une matière première pour le développement de nouveaux produits bio-insecticides contre l'insecte *Bactrocera oleae*, l'un des principaux ravageurs de l'olive dans toute la région méditerranéenne.



**Figure 34:** CL50 de l'huile essentielle de *A. verticillata* sur L3, pupes et adultes de *Bactrocera oleae*

Cette activité est principalement liée aux composés majoritaires. Le limonène a été étudié et appliqué en tant qu'insecticide (**Sfara et al., 2009**), le carvacrol a montré une puissante activité insecticide et acaricide, à large spectre, contre des ravageurs arthropodes agricoles des produits stockés et une activité forte et sélective contre *Alphitobius diaperinus*, un insecte ravageur cosmopolite des aliments stockés, des produits céréaliers tels que la farine et des installations d'élevage de volailles (**Ahn et al., 1998**).

Par ailleurs, l'ampleur de l'activité insecticide peut être liée à l'effet causé par l'interaction de tous les constituants présents dans l'huile (**Belabbes et al., 2017**). En effet, les terpènes ont montré une toxicité significative contre un panneau d'insectes nuisibles (**Khanikor et al., 2013**).

Le mode d'action de ces composés n'a pas été entièrement élucidé ; cependant, selon **Khanikor et al. (2001)**, les composés terpéniques sont neurotoxiques et modèrent l'action toxique des différentes espèces d'*Aedes* en agissant sur l'acétylcholinestérase et l'octopaminergique système.

L'activité biologique d'une huile essentielle est liée généralement à sa composition chimique. Ainsi, nous pouvons dire que l'ensemble des huiles analysées se distinguent par l'abondance de leurs différents constituants chimiques et parfois même par leur nature bien qu'elles appartiennent toutes à la même famille botanique.

La période d'extraction, les méthodes de séchage et d'analyse, l'origine géographique, l'environnement dans lequel évolue une plante ; l'organe étudié influence considérablement la composition chimique de l'huile essentielle (**Taleb-Toudert, 2015**).

### 5. Activité antibactérienne de l'huile essentielle de *Ammoides verticillata*

L'activité antimicrobienne de l'huile essentielle de *Ammoides verticillata* a été évaluée contre trois bactéries et une levure par la méthode de disque, utilisée pour discriminer les huiles les plus actives d'une part ; et pour calculer les concentrations minimales inhibitrice (CMI) et bactéricide (CMB), par la méthode de microdilution sur microplaque, d'autre part.

#### 5.1. Méthode de disque

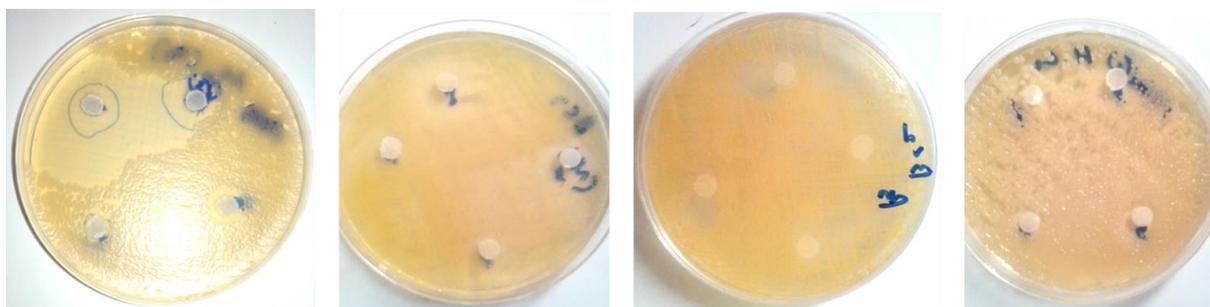
Les résultats des diamètres d'inhibition sont présentés dans le tableau 14 suivant :

**Tableau 14 :** diamètres des zones d'inhibition des différentes huiles essentielles (en mm)

Huile Essentielle	Souches bactériennes			
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Bacillus cereus</i>	<i>Candida albicans</i>
<i>Ammoides verticillata</i>	7,4±0.70	35± 1.40	38± 0.85	45± 1.05

A une concentration de 10 µl/ disque, l'huile essentielle a présenté une activité antibactérienne et anti-levure remarquables ;

- L'HE d'*Ammoides verticillata* est extrêmement active contre les deux souches bactériennes et la levure avec des diamètres d'inhibition dépassant les 35mm ; tandis qu'une faible activité est remarquée contre la souche *Pseudomonas aeruginosa* qui s'est avérée résistante. Cette HE est donc active aussi bien contre les Gram (+) que les Gram (-).



**Figure 35:** Activités antibactériennes de l'huile essentielle de *Ammoides verticillata* contre *Candida albicans* ; *Staphylococcus aureus* ; *Bacillus cereus* et *Pseudomonas aeruginosa*

### 5.2. Méthode de microdilution

Après avoir vérifié l'existence d'une activité antibactérienne à l'aide de la méthode de disque, la méthode de microdilution en milieu liquide a été réalisée pour les souches dont la zone d'inhibition est importante (>9 mm) (Yildirim, 2001).

La concentration minimale inhibitrice CMI est une faible concentration de l'agent antimicrobien qui inhibe toute croissance visible d'un microorganisme, après 24h d'incubation, dans un milieu de culture adéquat. C'est l'approche la plus utilisée pour évaluer *In vitro* l'efficacité d'une substance antimicrobienne (Nejjah et al., 2006).

La CMI est alors la concentration de la première cupule pour laquelle on n'observe pas un trouble à l'œil nu. L'inoculation du contenu des cupules, au-delà de la CMI sur milieu gélosé, est nécessaire pour déterminer la nature de l'activité antimicrobienne (bactéricide ou bactériostatique) et en déduire la CMB.

Pour la détermination de ces valeurs critiques, nous avons utilisé une fourche de concentrations de l'HE de *Ammoides verticillata* dans le DMSO, allant de 0.1 à 100 µl/ml.

Les résultats des concentrations minimales inhibitrices et bactéricides des différentes huiles essentielles sont présentés dans le tableau 15.

**Tableau 15:** Concentrations minimales inhibitrices (CMI) et bactéricides (CMB) de l'huile essentielle de *Ammoides verticillata* en µl/ml et le rapport CMB/CMI

Souches / HE	<i>Ammoides verticillata</i>		
	CMI	CMB	CMB/CMI
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	/	/	/
<i>Staphylococcus aureus</i>	0.8	4	5
<i>Bacillus cereus</i>	0.7	>100	> 128
<i>Candida albicans</i>	0.1	0.4	4

Au vu des résultats obtenus, on peut conclure que :

Les valeurs des CMI viennent confirmer les résultats de la méthode de disque pour l'HE de *Ammoides verticillata* qui a induit des zones d'inhibition importantes. Les CMI n'avaient pas dépassé 0,8 µl/ml ; la levure a été plus sensible avec une CMI de 0.1 µl/ml, *Bacillus cereus* à 0.7 µl/ml et *Staphylococcus aureus* à 0,8 µl/ml.

Les CMB sont aussi remarquables pour l'HE de *Ammoides verticillata* puisque l'effet bactéricide sur *C. albicans* est à 0.4 µl/ml et 4µl/ml pour *Staphylococcus aureus*, tandis qu'il est supérieur à 100 µl/ml pour *B. cereus*.

Le rapport CMB/CMI donne une idée plus précise sur l'effet d'une substance antimicrobienne, en précisant que si ce rapport est inférieur à 4, l'huile essentielle est considérée comme bactéricide, s'il est supérieur à 4, l'HE est ainsi considérée comme bactériostatique.

De ce fait, notre huile de *A. verticillata* (Nounkha) est qualifiée comme **bactéricide** contre la levure *Candida albicans* et **bactériostatique** pour *Bacillus cereus* ainsi que pour *Staphylococcus aureus* avec un résultat très proche de la valeur bactéricide.

L'huile essentielle de cette plante a exercé une très bonne activité antimicrobienne contre toutes les souches testées, Gram (-) et Gram (+) ainsi que sur la levure *C. albicans*, sauf pour la souche *Pseudomonas aeruginosa*.

Les résultats obtenus ont confirmé l'activité antimicrobienne potentielle de l'huile essentielle de *Ammoides verticillata*.

Plusieurs études ont étayé nos résultats :

En Iran, l'huile essentielle de la même espèce a présenté des activités antimicrobiennes contre toutes les bactéries testées pour la dilution 0,05% (v / v) à l'exception pour *P. aeruginosa*. L'huile essentielle a montré une forte activité antimicrobienne contre *Staphylococcus aureus* et *Bacillus subtilis* (CMI, 0,00025% v / v). La valeur de la CMI pour *Escherichia coli* était de 0,0005% (v / v) tandis que contrairement à nos résultats, *C. albicans* semblait être l'un des microorganismes qui ont montré une résistance significative (**Oskuee et al., 2011**).

Ces résultats semblent liés à la composition respective des huiles végétales volatiles, à la configuration structurelle des composants constitutifs de ces huiles, à leurs groupes fonctionnels et aux interactions synergiques possibles entre les composants (**Dorman et Deans, 2000**).

Les structures phénoliques telles que le thymol -composant principal d'*Ammoides verticillata* - et le carvacrol (3,30%) sont très actifs contre les microbes en raison de la présence du groupe hydroxyle. L'effet inhibiteur des phénols s'explique par des interactions avec la membrane cellulaire des microorganismes et est souvent corrélée à l'hydrophobicité des composés (**Ben Arfa et al., 2006**).

Une augmentation de l'activité dépend également du type de substituant alkyle incorporé dans une structure cyclique non phénolique telle que vue dans le limonène (20,19%) et le p-cymène (15,70%).

Malgré les caractéristiques antimicrobiennes du thymol et du carvacrol, **Chamberlain et Dagley (1968)** ont constaté que la souche de *Pseudomonas* était capable de dégrader complètement le thymol et partiellement le carvacrol, ce qui explique sa résistance (**Numpaque et al., 2011**). Mais le thymol a démontré une activité antifongique par sa capacité à modifier la paroi cellulaire et la membrane des levures *Saccharomyces cerevisiae* et *Candida albicans* (**Braun et Cohen, 2015**).

Par ailleurs, *Klebsiella pneumoniae* possède une capsule composée de polysaccharides acides complexes, protégeant les bactéries contre la phagocytose, ou lorsqu'elles sont exposées à des facteurs sériques bactéricides, elles comportent des systèmes enzymatiques complexes qui semblent empêcher les huiles essentielles d'accéder à la fragile membrane interne (**Fournomiti et al., 2015**).

## 6. Activités antifongiques combinatoires des huiles essentielles de *Ammoides verticillata*, *Allium sativum* et *Curcuma longa*

L'utilisation des fongicides s'avère être une pratique ancestrale en Afrique. En effet, de nombreuses plantes sont connues et utilisées pour leurs activités biocides contre un large éventail de ravageurs (Young, 2002). Ils peuvent être utilisés comme extraits de plantes foliaires (Lis-Balchin et al., 1997) ; (Sasaki et al., 2002) ou en combinaison avec d'autres cultures (Blumenthal et al., 2000) ; (Bozin et al., 2006).

Les huiles essentielles ont un spectre d'action très large puisqu'elles inhibent la croissance des bactéries ainsi que celles des champignons et des levures.

### 6.1. Activités antifongiques in vitro des huiles essentielles individuelles et combinées

L'activité antifongique des huiles essentielles a été évaluée contre quatre micro-organismes (*Penicillium expansum*, *Fusarium solani*, *Rhizopus stolonifer* et *Alternaria alternata*); leur puissance a été évaluée par la présence ou l'absence des pourcentages d'inhibition.

#### 6.1.1. Activité antifongique in vitro des huiles essentielles individuelles

Les résultats obtenus présentés dans le tableau 16 ont montré que les pourcentages d'inhibition de la croissance mycélienne augmentent avec la concentration croissante des huiles essentielles, pour toutes les souches testées.

Les huiles essentielles de *A. Verticillata* et *A. sativum* ont montré une très bonne activité antifongique contre *P. expansum*, *F. solani* et *R. stolonifer* par rapport au fongicide de référence Artea 330EC.

À la concentration de 400 µL / L les souches de *P. expansum* (100% et 97,4% d'inhibition), *F. solani* (97,4% et 79,2%) et *R. stolonifer* (71,5% et 73,3%) étaient plus sensibles aux huiles essentielles de *A. verticillata* et *A. sativum*, respectivement. Cependant, *A. alternata* était moins sensible avec des pourcentages d'inhibition de 57,1% et 22,1%, respectivement.

De plus, aucune activité contre *A. alternata* n'a été observée avec les huiles essentielles de *A. Sativum* et de *C. longa* (Tableau 16).

Tableau 16 : Activité antifongique des huiles essentielles individuelles

Microorganismes	Pourcentages d'inhibition (%)									Artea 330EC ( $\mu$ L/L)
	<i>A. verticillata</i>			<i>A. sativum</i>			<i>C. longa</i>			
Concentrations $\mu$ L/L	100	200	400	100	200	400	100	200	400	100% Inhibition
<i>P. expansum</i>	69,3 $\pm$ 3.2	90,7 $\pm$ 2.2	100 $\pm$ 00	46,3 $\pm$ 1.5	60,3 $\pm$ 3.2	97,4 $\pm$ 3.2	24,1 $\pm$ 3.2	35,2 $\pm$ 1.8	59,2 $\pm$ 0.2	512
<i>F. solani</i>	35,9 $\pm$ 2.6	45,9 $\pm$ 5.6	97,4 $\pm$ 1.4	10,4 $\pm$ 0.9	30,0 $\pm$ 0.4	79,2 $\pm$ 2.1	11,1 $\pm$ 0.9	21,5 $\pm$ 0.8	32,6 $\pm$ 0.8	452
<i>R. stolonifera</i>	24,1 $\pm$ 1.2	36,3 $\pm$ 4.1	71,5 $\pm$ 2.7	23,3 $\pm$ 2.1	45,5 $\pm$ 1.6	73,3 $\pm$ 5.1	6,3 $\pm$ 0.5	10,0 $\pm$ 0.2	17,7 $\pm$ 1.7	> 600
<i>A. alternata</i>	11.2 $\pm$ 0.9	25.2 $\pm$ 4.2	37.1 $\pm$ 6.4	00 $\pm$ 00	06.3 $\pm$ 0.5	12.1 $\pm$ 3.1	00 $\pm$ 00	00 $\pm$ 00	00 $\pm$ 00	425

La figure 36 suivante présente les activités antifongiques des huiles essentielles de *A. verticillata*, *A. sativum* et *C. longa* sur les quatre souches fongiques.

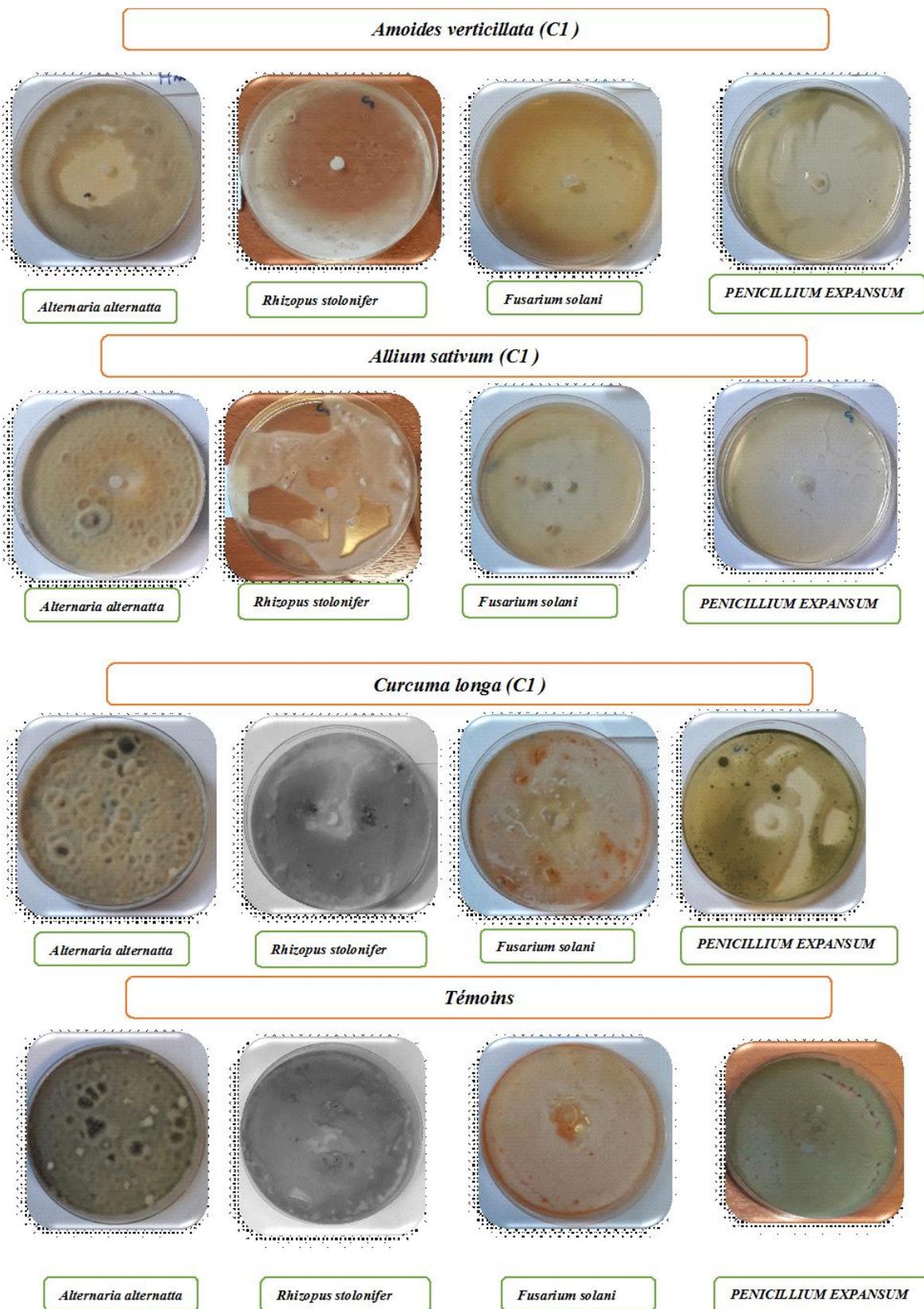


Figure 36 : Activités antifongiques des huiles essentielles de *A. verticillata* , *A. sativum* et *C. longa* sur les quatre souches fongiques

## 6.1.2. Etude de l'effet synergique

L'activité antifongique des mélanges d'huiles essentielles testés dans cette étude est présentée dans le tableau 17.

Parmi ces mélanges, les huiles essentielles combinées de *A. sativum* et *C. longa* ont montré la meilleure activité avec des effets plus importants contre *P. expansum* (100%), *F. solani* (95,2%), *R. stolonifer* (95,1%) et *A. alternata* (58,5%) à une concentration de 400  $\mu\text{L} / \text{L}$  par rapport à d'autres mélanges et huiles essentielles individuelles.

**Tableau 17:** Activité antifongique des mélanges d'huiles essentielles

Microorganismes	Pourcentages d'inhibition (%)												Artea 330EC
	<i>A. verticillata</i> + <i>C. longa</i>			<i>A. verticillata</i> + <i>A. sativum</i>			<i>A. sativum</i> + <i>C. longa</i>			<i>A. verticillata</i> + <i>A. sativum</i> + <i>C. longa</i>			
Concentrations $\mu\text{L}/\text{L}$	100	200	400	100	200	400	100	200	400	100	200	400	100% Inhibition
<i>P. expansum</i>	45,5 ± 2.3	69,2 ± 1.7	99,2 ± 3.1	56,3 ± 6.5	71,8 ± 2.8	99,3 ± 1.5	34,8 ± 0.6	78,8 ± 2.1	100 ± 00	23,3 ± 1.0	45,5 ± 3.2	100 ± 00	512
<i>F. solani</i>	17,7 ± 0.8	23,3 ± 0.9	40,0 ± 0.8	28,9 ± 1.1	45,5 ± 1.6	90,3 ± 1.2	18,4 ± 0.4	34,2 ± 12	95,2 ± 1.7	27,1 ± 0.6	34,1 ± 3.5	50,7 ± 2.1	452
<i>R. stolonifer</i>	13,7 ± 0.6	17,7 ± 1.1	24,1 ± 0.3	11,8 ± 0.6	38,5 ± 3.6	84,4 ± 1.6	17,4 ± 0.2	63,3 ± 3.2	95,1 ± 1.5	3,7 ± 0.2	23,3 ± 1.6	28,5 ± 1.3	> 600
<i>A. alternata</i>	06.5 ± 0.2	10.3 ± 0.5	23.3 ± 1.2	07.5 ± 0.3	22.3 ± 2.9	33.3 ± 0.2	20.3 ± 0.9	32.5 ± 0.8	58.5 ± 2.2	00 ± 00	11.2 ± 0.5	27.4 ± 2.3	425

La deuxième combinaison d'huiles essentielles la plus efficace (400  $\mu\text{L} / \text{L}$ ) était celle de *A. Verticillata* et *A. sativum*, avec des pourcentages de réduction mycélienne pour *P. expansum* (99,3%), *F. solani* (90,3%), *R. stolonifer* (84,4%) et *A alternata* (33,3%).

En revanche, les résultats obtenus ont indiqué que les mélanges d'huiles essentielles de *A. Verticillata* + *C. longa* puis *A. verticillata* + *A. sativum* + *C. longa* étaient moins efficaces à l'exception de *P. expansum* qui a été inhibé avec un pourcentage de 99,2% et 100%, respectivement (Tableau 17). En comparant les résultats des mélanges d'huiles essentielles avec les huiles individuelles, nous avons remarqué que les huiles essentielles combinées de *A. Sativum* et de *C. longa* présentaient le meilleur effet synergique sur l'inhibition de la croissance mycélienne de tous les champignons testés (Tableau 17)

Sur la base des résultats obtenus, il semble que l'association des composés soufrés (91,5%) avec les composés sesquiterpéniques oxygénés comme les turmérone aromatiques (72,2%) et/ou le carvacrol (33,2%) et le p-cymène (25,2%) augmente considérablement l'activité antifongique ; alors que l'association de composés soufrés avec des turmérone aromatiques et des monoterpènes oxygénés, n'a montré aucun effet synergique.

La figure 37 suivante montre les zones d'inhibition mycélienne après avoir exposé les souches aux mélanges des huiles essentielles des plantes médicinales.

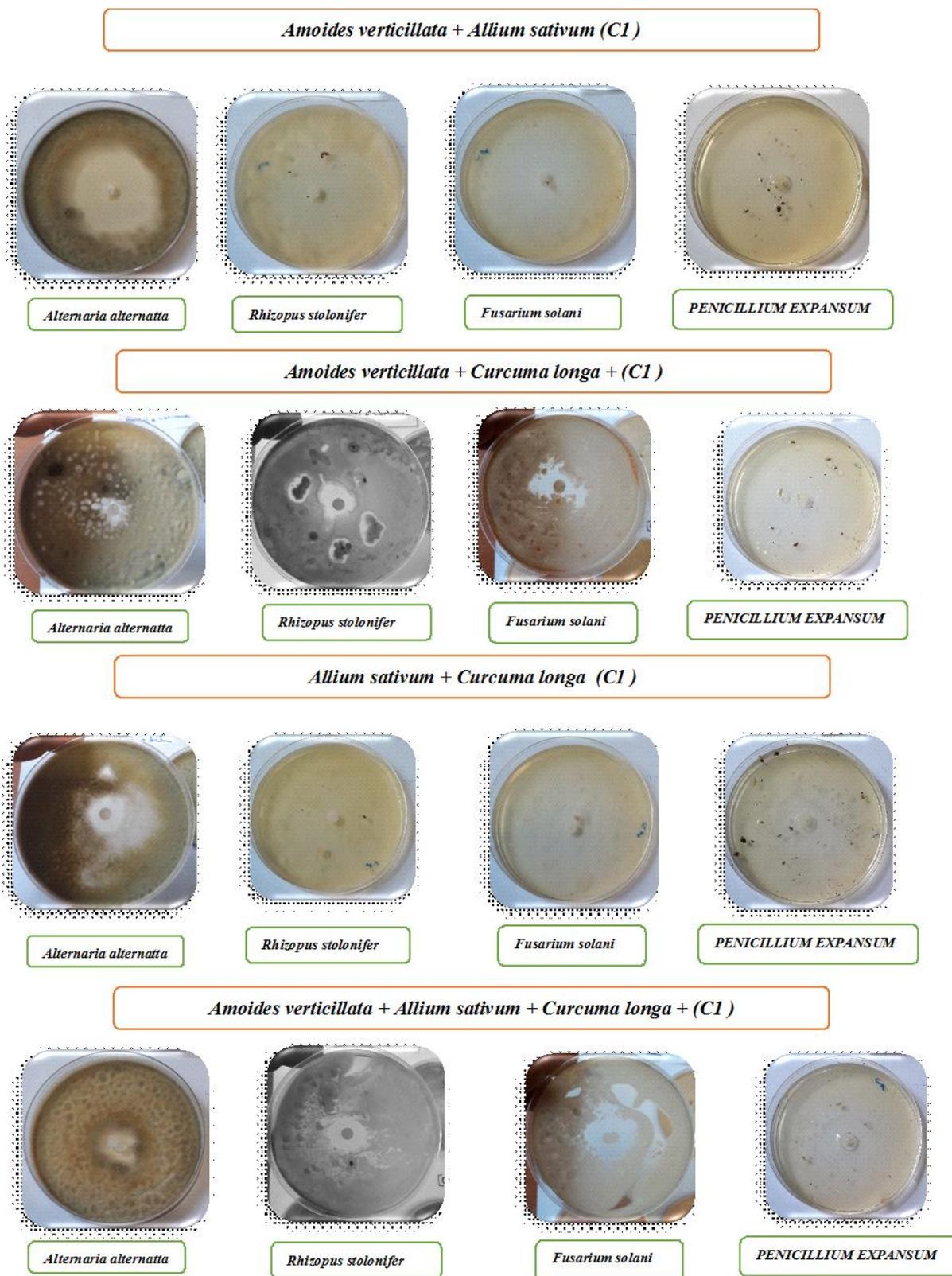


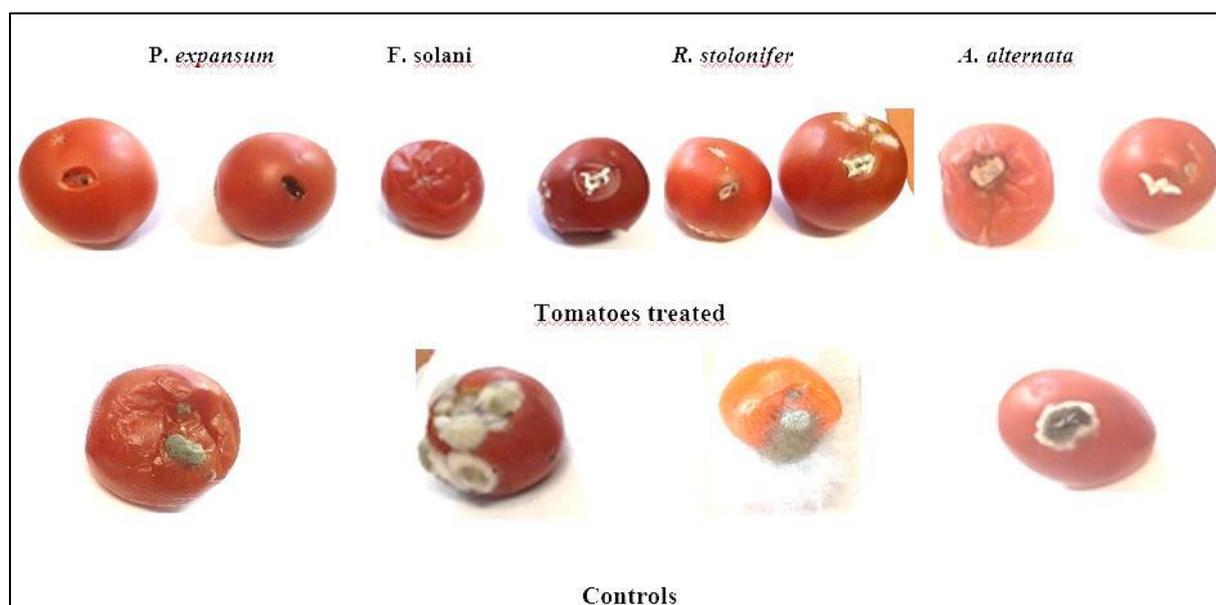
Figure 37 : Activités antifongiques des mélanges d'huiles essentielles

### 6.2. Activité antifongique in vivo des huiles essentielles combinées

En raison des résultats prometteurs des tests in vitro, le mélange d'huiles essentielles *A. sativum* et *C. longa* a été choisi pour déterminer ses effets protecteurs contre les maladies fongiques de la tomate causées par *P. expansum*, *F. solani*, *R. stolonifer* et *A. alternata*.

Selon le tableau 18 et la figure 38, l'activité in vivo a montré que la gravité des infestations causées par tous les champignons était significativement réduite ( $P \leq 0,05$ ).

Le mélange d'huiles essentielles, utilisé à une concentration de 20  $\mu\text{L} / \text{L}$  d'air, a montré un effet protecteur très intéressant sur la tomate jusqu'à dix jours contre *P. expansum* (100%), *R. stolonifer* (90%), *F. solani* (50%) et *A. alternata* (30%) (Tableau 18), par rapport aux témoins qui étaient complètement endommagés (Figure 38).



**Figure 38 :** Les effets protecteurs des huiles essentielles *A. sativum* et *C. longa* se mélangent après dix jours de stockage à  $25 \pm 1 ^\circ \text{C}$

Dans cette partie, nous avons étudié les activités antifongiques des huiles essentielles de trois plantes largement utilisées en médecine traditionnelle, dans l'espoir de trouver de nouveaux antifongiques naturels pour lutter contre les microorganismes qui contaminent les aliments et l'environnement, comme alternative aux nombreux fongicides connus pour leur effet de toxicité et / ou de mutagénicité.

Le tableau 18 présente les résultats de l'effet du mélange des huiles essentielles de *A. sativum* + *C. longa* sur la protection des tomates contre les infections causés par les champignons.

**Tableau 18 :** Effets du mélange d'huiles essentielles *A. sativum* + *C. longa* sur la protection des tomates contre les infections causées par les champignons testés.

Jours	Pourcentages d'inhibition (%)							
	Contrôles				Mélange des HE ( <i>A. sativum</i> + <i>C. longa</i> )			
	<i>P. expansum</i>	<i>F. solani</i>	<i>R. stolonifer</i>	<i>A. alternata</i>	<i>P. expansum</i>	<i>F. solani</i>	<i>R. stolonifer</i>	<i>A. alternata</i>
1th	0	0	0	0	0	0	0	0
2th	10	20	30	0	0	0	0	10
4th	30	50	50	10	0	10	0	30
6th	60	80	60	20	0	30	0	40
8th	100	100	100	50	0	40	0	60
10th	100	100	100	60	5	50	10	70

Notre étude a prouvé que les huiles essentielles de *A. verticillata*, *A. sativum* et *C. longa* possèdent des activités antifongiques intéressantes contre *P. expansum*, *F. solani*, *R. stolonifer* et *A. alternata*. De plus, le mélange d'huiles essentielles de *A. Sativum* et de *C. longa* a montré un effet protecteur des tomates dans les conditions post-récolte contre tous les champignons.

Les propriétés antifongiques de nos huiles essentielles peuvent être liées à leurs profils chimiques, en particulier au pourcentage relativement élevé de monoterpènes tels que le p-cymène, le limonène et le carvacrol pour *A. verticillata* et Ar-turmerone,  $\alpha$ -turmerone et  $\beta$ -turmerone pour *C. longa*. D'autre part, les propriétés de l'huile essentielle de *A. Sativum* sont dues à des pourcentages élevés de composés soufrés.

Les phénylpropènes tels que le p-cymène et le carvacrol sont les principaux composés de nombreuses huiles essentielles de plantes et de nombreuses preuves ont suggéré que ces composants possèdent des activités antibactériennes et antifongiques (**Kaluderović et al. (2015) ; Păunescu et al. (2015).**

De nombreuses recherches sur l'huile essentielle de curcuma ont montré des effets antifongiques, antibactériens, antioxydants et antitumoraux.

L'effet inhibiteur de l'huile essentielle de curcuma contre les micro-organismes a été rapporté par de nombreux auteurs (**Apisariyakul et al. (1995) ; Wilson et al. (2005).**

On sait peu de choses sur les activités antifongiques *in vitro* et *in vivo* des turmerones, cependant, il a été rapporté que ces derniers ont montré dans les tests *in vitro* des effets anti-inflammatoires dans les cellules microgliales (**Park et al., 2012**) et des effets anti-inflammatoires dans les  $\beta$ -amyloïdes stimulées par les microglies (**Park et al., 2012**).

*Allium sativum* L. est un condiment piquant très utilisé en médecine traditionnelle pour ses différentes propriétés ; il a été signalé qu'il possède des activités antioxydantes, antimicrobiennes et antifongiques. Ces propriétés sont principalement dues aux composés organosulfurés comme le trisulfure de diallyle et le disulfure de diallyle connus pour leurs différentes propriétés (**Yin et Tsao , 1999**).

Par ailleurs, le mélange des huiles essentielles de *A. sativum* et *C. longa* a montré une très bonne activité antifongique dans des conditions *in vivo* et *in vitro*.

Cette augmentation d'activité peut être due à l'association entre des composés majeurs tels que l'Ar-turmerone, l' $\alpha$ -turmerone et la  $\beta$ -turmerone avec le disulfure de diallyle, le trisulfure d'allylméthyl et le trisulfure de diallyle ou en raison d'un effet synergique avec tous les composants actifs présents dans les deux huiles.

### **Conclusion**

Le mélange des huiles essentielles de *C. longa* et *A. sativum* avait un niveau élevé de turmerones et de composés organosulfurés. Le mélange a présenté des activités antifongiques *in vitro* élevées contre les souches de *P. expansum*, *F. solani*, *R. stolonifer* et *A. alternata* et des activités antifongiques prometteuses *in vivo* pour contrôler l'infection des tomates.

Le développement d'antifongiques naturels à base de mélanges d'huiles essentielles peut être une proposition intéressante pour diminuer l'effet négatif des fongicides de synthèse.

## 7. Micro-encapsulation de l'huile essentielle de *Ammoides verticillata*

Suivant les domaines et les applications, l'encapsulation a pour but d'assurer la protection, la compatibilité et la stabilisation d'une matière active dans une formulation. Elle permet d'améliorer la présentation d'un produit ou encore de masquer une odeur ou un goût. Enfin, l'encapsulation peut modifier et contrôler le profil de libération d'une substance active pour obtenir, par exemple, un effet prolongé ou déclenché (Akdin, 2016).

Les huiles essentielles sont des composés volatils utilisés dans de nombreux domaines comme le secteur agro-alimentaire, la parfumerie, la cosmétique, l'aromathérapie ou encore la phytopathologie.

Les huiles essentielles participent notamment à la formulation de nouveaux bio-pesticides qui sont actuellement en pleine expansion. Cependant, comme ces composés sont volatils, il faut les stabiliser dans une matrice de façon à faciliter leur relargage lent.

Notre travail a proposé dans un premier temps l'encapsulation de l'huile essentielle, puis l'étude cinétique de son relargage dans diverses conditions ainsi que la modélisation moléculaire permettant de comprendre les différents phénomènes mis en jeu dans ces procédés innovants.

### 7.1. Observation visuelle

L'examen visuel des expériences de l'encapsulation de l'HE atteste de la présence de deux phases dont les volumes varient en fonction du ratio Gélatine G : Gomme arabique GA (Figure 39). Nous avons pu clairement différencier le système G/GA/eau en étudiant le caractère solide ou liquide de la phase inférieure. Dans ce cas, la phase inférieure est un semi-solide gélatineux qui contient l'HE.



Figure 39 : émulsion contenant l'HE, gélatine G et gomme arabique GA

Après séchage de coacervat on obtient un solide sous forme poudre aromatisé (Fig. 40).



**Figure 40** : Microcapsules (contenant l'HE) après séchage

### **7.2. Etapes de la formation des microparticules par coacervation complexe**

La coacervation complexe permet de fabriquer des microcapsules à base de deux polymères de charges différentes qui, en complexant, fixent les composés de l'huile essentielle.

Ces microcapsules sont ensuite emprisonnées dans une enveloppe d'alginate sous forme de billes. Il s'agit d'une double encapsulation.

La figure 41 montre avec images prises par microscopie optique les étapes de la formation des microparticules par coacervation complexe, nous avons fait trois répétitions pour le complexe gélatine/Gomme arabique et gélatine Gomme d'amandier.

### **7.3. Caractérisation des capsules**

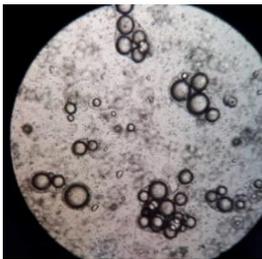
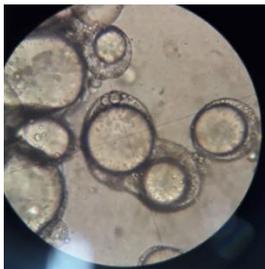
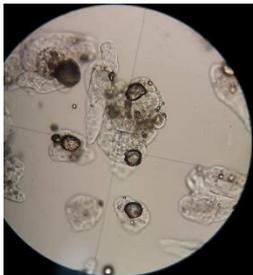
Les techniques de caractérisation des microcapsules fabriquées ont pour but de déterminer :

- la composition des capsules en HE, G et GA ;
- la forme et la taille des capsules ;
- la capacité de rétention et de diffusion de l'huile essentielle par les capsules ;
- la sélectivité de rétention des capsules vis-à-vis de certains constituants de l'huile essentielle.

#### **a) Microscopie optique**

La **figure 41** obtenue par microscopie optique a permis de mettre en évidence que:

- La taille moyenne de ces capsules était autour de 20  $\mu\text{m}$  ;
- la bonne sphéricité des microcapsules et la morphologie macro-sphérique de capsules ;
- l'existence d'une fine paroi autour des capsules contenant l'huile essentielle *d'Ammoides verticillata*.

ETAPES	Par Gomme arabique	Par Gomme d'amandier
Etape 1 : Dispersion de la molécule à encapsuler		
Etape 2 : coacervation induite par ajustement du pH. pH =3,8 T=48° C		
Etape 3 : ajustement par NaOH , pH=6,4. T=20° C		
Etape 4 : adsorption des gouttelettes de coacervat à la surface de la matière active		
Etape 5 : consolidation de l'enrobage par réticulation		

**Figure 41 :** Etapes de la formation des microparticules par coacervation complexe (Photo originale prise par microscope optique G\*40)

Cet enrobage est dû à l'association de la gélatine /gomme d'amandier, et gélatine/ gomme arabique (Figure 42).

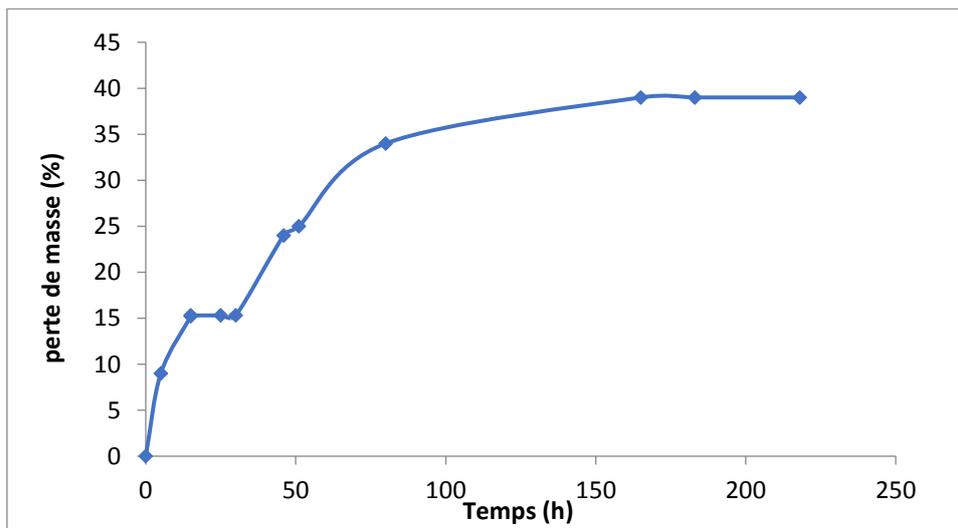


**Figure 42 :** Huile essentielle encapsulée par la gomme arabique et la gomme d'amandier

#### 7.4. Étude du relargage de l'huile de *Ammoides verticillata* à température ambiante

La figure 43 illustre la cinétique de relargage de l'huile essentielle étudiée, à 22 °C, pour la formulation (Gélatine+ Gomme Arabique (G+GA)).

La perte de masse à 22°C a été suivie pendant une dizaine de jours. La figure 43 représente la variation de masse des capsules. La diffusion la plus irrégulière s'observe pour la courbe correspondant à la perte la plus importante.



**Figure 43 :** Relargage de l'HE de *Ammoides verticillata* par les microcapsules à 22°C.

Nous avons remarqué l'existence de trois phases différentes :

- La première phase correspond à une évolution rapide de la cinétique de libération de l'HE qui s'est stabilisée au bout de 20 h ; cette phase peut être associée à l'évaporation de l'HE libre ou retenue à la surface externe des microcapsules ;
- La deuxième phase est caractérisée par la stabilisation de la masse des capsules (entre 20 et 48 h). Cette stabilisation peut être expliquée par la résistance à la diffusion des composés aromatiques à travers l'enrobage des microcapsules ;
- La dernière phase correspond à une cinétique de libération lente et importante de l'HE (environ 150h), suivie par la stabilisation de la masse du produit. Cette étape est relative à la diffusion des composés aromatiques contenus dans la microsphère et les pores internes. C'est donc la phase la plus importante qui correspond à la libération de l'HE réellement encapsulée.

Nous avons constaté aussi qu'une quantité importante de l'HE est restée piégée dans les microcapsules (environ 50%) sous l'effet de l'enrobage. Cette quantité ne pouvait être libérée qu'après la destruction de l'enrobage soit sous l'effet de conditions extérieures (pression, température...) ou bien par dissolution dans l'eau, ou par un autre solvant.

Pour cette dernière courbe, la perte de masse au bout de 240 h (10 jours) représente 38% de la capsule ; donc la diffusion a été très lente à 22°C et n'a pas été complète, ce qui peut être dû aux différents composants de l'huile essentielle de *Ammoides verticillata* qui ont diffusé plus ou moins facilement. On peut retenir qu'en général la paroi est relativement poreuse, l'influence du taux du réticulant permettrait de contrôler cette porosité.

Ces résultats de diffusion ont été confirmés par la bibliographie ; les auteurs avaient testé l'activité des microcapsules de l'huile de sauge, les capsules étaient à base de gélatine et de gomme arabique (**Benali, 2018**).

D'après ces travaux, l'enrobage formé par encapsulation en utilisant un système G/GA permet de limiter la diffusion des principes actifs et de protéger les produits encapsulés (**Himed, 2018**)

### 7.6. Efficacité de l'encapsulation

L'efficacité de l'encapsulation de l'huile essentielle de *Ammoides verticillata* par coacervation complexe sous les conditions indiquées dans la partie précédente a été de l'ordre de 77,13% ; le rendement de l'encapsulation a été donc important.

La réadaptation du brevet WO2014057202 A1 (Ollagnier, 2014) de double encapsulation incluant une coacervation complexe a permis l'élaboration de billes avec un rendement massique élevé d'environ 70 %.

Ce résultat très intéressant a confirmé les rendements annoncés dans la littérature. En effet, des études menées sur la coacervation complexe avaient révélé un rendement d'environ 80% (Ach, 2014) et Kerdudo *et al.* (2015), ou encore un rendement pouvant être compris entre 85 et 95 % (Richard et Benoît, 2000).

### 7.7. Interprétation

La méthode d'encapsulation de l'huile essentielle de *Ammoides verticillata* par coacervation complexe de la gélatine + gomme arabique a été réalisée ; les problèmes de synthèse rencontrés nous ont incités à étudier les diverses conditions d'expérience afin d'obtenir une quantité maximale d'huile encapsulée. Les conditions retenues sont :

- 43% de gélatine et 57% de gomme arabique ;
- 5% de réticulant par rapport à la gélatine (glutaraldéhyde) ;
- la température de formation de l'émulsion et de la coacervation est de 35°C ;
- pH de coacervation  $\approx$  3,8 pour le système G/GA. Cette valeur est déterminée par pHmétrie ;
- Refroidissement progressif jusqu'à 10°C ;
- Agitation : formation de l'émulsion, 1300 à 1500 tr/mn ;
- Agitation : coacervation, 500 à 700 tr/mn.

La nouvelle formulation, produite en utilisant la gomme arabique, présente une meilleure rétention de l'HE de *Ammoides verticillata* ainsi qu'un bon rendement (77,13%).

Ce travail a confirmé donc la possibilité d'encapsuler l'HE de *Ammoides verticillata* par coacervation complexe en utilisant la gomme arabique comme polysaccharide. La nouvelle formulation produite a présenté une meilleure résistance à l'évaporation de l'HE de *Ammoides verticillata* ainsi qu'une bonne efficacité.

**Conclusion**

Nous rappelons que les principaux objectifs visés de ce travail étaient d'effectuer, dans un premier temps, l'extraction des huiles essentielles de nos plantes médicinales par hydrodistillation et l'analyse de leurs composants chimiques par GC-MS et de tester si le pouvoir antioxydant de chaque huile pouvait se combiner l'un avec l'autre. Les activités biologiques insecticides, bactériennes et fongicides in-vivo et in-vitro des HE sur les bioagresseurs pathogènes des olives et plusieurs autres cultures agricoles nous ont donné des résultats très intéressants et encourageants, nous permettant de proposer nos huiles essentielles, individuelles ou combinées, comme biopesticides capables de remplacer les pesticides chimiques jusque-là utilisés.

Les huiles essentielles sont les plus étudiées et ont suscité, ces dernières années, un intérêt croissant dans de nombreux domaines pharmaceutique, agroalimentaire et cosmétique, notamment par leurs propriétés antioxydante et antimicrobienne (**Bakkali et al., 2008**).

La dynamique du marché des huiles essentielles est soutenue par une demande sans cesse croissante en ingrédients naturels, ce qui a poussé les industriels des secteurs agroalimentaire, cosmétique et pharmaceutique davantage à les intégrer dans leurs formulations. Certaines techniques permettent de réduire les dégradations qui conditionnent l'utilisation industrielle de ces huiles, notamment grâce à l'encapsulation.

L'encapsulation est l'une des techniques couramment utilisées, elle permet d'immobiliser les composés volatils des huiles essentielles, de stabiliser ces dernières et de les protéger contre la lumière, l'oxygène et la température ainsi que de moduler leur libération en prolongeant son profil cinétique (**Michael, 2009**). Par conséquent, ce procédé a tendance à protéger et préserver les activités biologiques de ces huiles et mettre en action ces vertus dans le produit alimentaire et dans l'agriculture.

Le projet étant encore dans sa genèse, les résultats obtenus ouvrent des pistes et perspectives d'avenir encourageantes quant au développement de formulations biologique innovantes.

---

# *CONCLUSION*

---

## CONCLUSION

---

L'étude de l'infestation des olives par *Bactrocera oleae* et de la flore pathogène qui lui est associée d'une part ; l'étude phytochimique des huiles essentielles des plantes médicinales *Ammoides verticillata*, *Curcuma longa* et *Allium sativum* d'autre part, ont permis d'obtenir des résultats servant à connaître leurs taux de toxicité contre les bioagresseurs de l'olivier, leurs effets synergiques ainsi que le procédé de micro-encapsulation de l'huile essentielle de *Ammoides verticillata*.

Les taux d'infestation de la mouche représentés par le nombre de piqûres et de trous de sortie montrent des variations significatives aux différentes dates. Les attaques du ravageur dans notre verger fluctuent au cours du temps en raison des facteurs écologiques tels que la température, les précipitations et le vent, dont on connaît l'impact sur la bioécologie de cet insecte phytophage.

L'identification de la microflore pathogène qui provoque des dégâts d'importance économique est nécessaire. L'étude microbiologique a révélé une diversité importante ; nous avons identifié quatre genres de moisissures : *Alternaria alternata*; *Fusarium solani*; *Rhizopus stolonifer* et *Penicillium expansum* ainsi que trois souches bactériennes *Pseudomonas aeruginosa* ; *Staphylococcus aureus* ; *Bacillus cereus* et une levure, *Candida albicans*.

En raison de ces infestations, la recherche de traitements naturels et de solutions alternatives aux pesticides de synthèse, en utilisant des produits d'origine biologique pour lutter contre les ravageurs et les microorganismes nuisibles est devenue indispensable.

Notre travail a été axée sur la connaissance de l'activité antioxydante, antiparasitaire, antifongique et antibactérienne des huiles essentielles HE de *A. verticillata* (Apiéceae) en combinaison avec les HE thérapeutiques de *Curcuma longa* (Zingiberaceae) et *Allium sativum* (Amaryllidaceae).

L'HEs de *A. verticillata* était riche en alcools monoterpéniques comme le carvacrol. Quant à l'HEs de *C. longa*, elle s'est avérée particulièrement intéressante d'un point de vue analytique par la présence d'une série de composés aromatiques : le ar-turmérone (32,1%),  $\alpha$ -turmérone (24,5%),  $\beta$ -turmérone (15,6%) comme constituants majoritaires. L'HE de *A. sativum* était dominée par le trisulfure de diallyle (31,5%), le disulfure de diallyle (29,8%) et le trisulfure de méthyle allyle (16,8%).

## CONCLUSION

---

L'activité antioxydante des trois plantes a été étudiée par la méthode DPPH•. Les résultats des tests effectués par le DPPH• montrent que l'huile de *A. verticillata* avait une meilleure activité inhibitrice du radical DPPH• avec un pourcentage d'inhibition de 98,2% à une dose de 2,5mg/mL ; alors que celles de *C. longa* et *A. sativum* ont respectivement enregistré des pourcentages de 91,5% et 79,8% à la même concentration.

Les mélanges croisés des HEs ont enregistré des effets additifs et antagonistes avec la méthode DPPH•.

L'huile essentielle d'*Ammoides verticillata* présente une toxicité importante contre *B. oleae* avec une mortalité de 100% de l'insecte adulte aux faibles doses de 2µl/L d'air et 80% de mortalité du stade L3 et des pupes à 12µl/L d'air. Cette huile essentielle a montré une toxicité prononcée par contact (CL50 <à 2 µL / L d'air) pour les insectes adultes, ainsi qu'une bonne toxicité par fumigation pour les pupes (CL50 de 7,2 µL / L d'air) et le stade L3 (CL50 de 10,1 µL / L d'air).

Nous avons relevé une très bonne activité antimicrobienne contre toutes les souches testées, Gram (-) ou (+) et même sur la levure *C. albicans* mais pas pour la bactérie *P. aeruginosa*.

De ce fait, notre huile de *A. Verticillata* ou Nounkha est qualifiée comme bactéricide contre la levure *Candida albicans* et bactériostatique pour *Bacillus cereus* et *Staphylococcus aureus* avec un résultat moyen, plus proche des valeurs de « bactéricide » avec un rapport CMB/CMI=5

Les huiles essentielles d'*A. Verticillata* et *A. sativum* ont montré une très bonne activité antifongique contre *P. expansum*, *F. solani* et *R. stolonifer* par rapport au fongicide de référence Artea 330EC.

À la concentration de 400 µL / L, les souches de *P. expansum* (100% pour *A. Verticillata* et 97,4% pour *A. sativum*), *F. solani* (97,4% et 79,2%) et *R. stolonifer* (71,5% et 73,3%), elles étaient plus sensibles aux huiles essentielles d'*A. verticillata* et *A. sativum*, respectivement. Cependant, *A. alternata* était moins sensible avec des pourcentages d'inhibition de 57,1% et 22,1%, respectivement. Aucune activité contre *A. alternata* n'a été observée avec les huiles essentielles d'*A. Sativum* et de *C. longa*

Le mélange des huiles essentielles de *C. longa* et *A. sativum* avait un niveau élevé de turmérone et de composés organosulfurés. Ce mélange a présenté des activités antifongiques élevées in vitro contre les souches de *P. expansum*, *F. solani*, *R. stolonifer* et *A. alternata* et des activités antifongiques prometteuses in vivo pour contrôler l'infection des tomates.

## CONCLUSION

---

Le développement d'antifongiques naturels à base de mélanges d'huiles essentielles peut être une proposition intéressante pour diminuer l'effet négatif des pesticides synthétiques.

L'encapsulation est un outil efficace et important pour la préparation de produits bénéfiques pour la santé dans diverses industries afin d'améliorer leur stabilité chimique, oxydative et thermique.

La durée de conservation, l'activité biologique et fonctionnelle, la libération contrôlée, les propriétés physicochimiques, et la qualité globale des huiles peuvent également être renforcées. Le séchage par pulvérisation et la coacervation sont les techniques les plus utilisées pour l'encapsulation des huiles.

Les HEs étudiées ont eu des activités insecticides, bactéricides, fongicides et antioxydantes fort intéressantes nous permettant de les proposer comme biopesticides aux agriculteurs, protégeant ainsi l'environnement et la santé des citoyens.

La méthode de coacervation complexe de l'huile essentielle *d'Ammoides verticillata*, étudiée pour la première fois dans le cadre de ce travail, permet d'affirmer qu'il est tout à fait possible d'encapsuler cette huile essentielle à des rendements très intéressants même si encore faibles en comparaison aux autres méthodes étudiées.

Cette micro-encapsulation optimisera la conservation et le relargage de cette HEs facilitant ainsi son utilisation par les agriculteurs.

Cependant, cette étude nécessite une recherche complémentaire. Elle n'est qu'une approche initiale à l'étude d'un nouveau système d'encapsulation des huiles essentielles.

---

**REFERENCE**  
**BIBLIOGRAPHIQUE**

---

## REFERENCE BIBLIOGRAPHIQUE

1. **Abdellaoui Rachid .**, 2018. la microencapsulation des huiles : meilleure approche pour la valorisation des produits alimentaires. thèse doctorat en pharmacie. Univ mohammed V, Rabat. Maroc.
2. **Ach D.**, 2014. Microencapsulation par coacervation complexe des protéines du lactosérum et de la gomme d'acacia.
3. **Adams R.**, 2007. Identification of essential oil components by gaz chromatography /mass spectroscopy, 4th éd. Illinois: Allured Publishing, Carol Stream.
4. **Adlercreutz H.**, 2003. Phytoestrogens and breast cancer. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, 83, 113-118.
5. **Ahn YJ., Lee SB., Lee HS., Kim GH.**, 1998. Insecticidal and acaricidal activity of carvacrol and  $\beta$ -thujaplicine derived from *Thujopsis dolabrata* var. *hondai* Sawdust. *J Chem Ecol*, 24(1): 81-90. [<http://dx.doi.org/10.1023/A:1022388829078>].
6. **Akdim Ioubna.** 2016. Comparaison de méthodes d'absorption et d'encapsulation de l'huile essentielle de *Copaifera Officinalis* L. en vue d'une application en cosmétique.
7. **Ammon, H., Wahl M. A.**, 1991. Pharmacology of *Curcuma longa*. *Planta Med.*, 57, 1-7.
8. **Amouretti et Comet.**, 1989. le livre de l'olivier, Edisud.
9. **Apisariyakul A., Vanittanakom N., Buddhasukh D.**, 1995. Antifungal activity of turemeric oil extracted from *Curcuma longa* (Zingiberaceae). *J. Ethnophar.*49, 163-169.
10. **Argenson C., Regis S., Jourdain J.M., Vaysse P., 1999.** L'olivier. Eds .Centre technique interprofessionnel des fruits et légume (Ctifl). Paris. 204 p. 7.
11. **Arvensenq S., pinatel C.**, 2000. les strategies de lutte contre la mouche de l'olive (Infolive). *Bull* (21), comité économique agri. Olivier (CEAO). Paris. 3 p.
12. **Athar M.**, 2005. Infestation of Olive Fruit Fly, *Bactrocera oleae*, in California and Taxonomy of its Host Trees. *Agriculturae Conspectus Scientificus*, Vol. 70 (2005) No. 4 (135-138).
13. **Attou A., Davenne D., Benmansour A., Lazouni H.A.**, 2019. Chemical Composition and Biological Activities of *Ammoides verticillata* Essential Oil from West Algeria. *Phytothérapie.* 17(1), 2-8.
14. **Sanna Sillankorva., Rosário Oliveira., Maria João Vieira., Ian Sutherland., Joana Azeredo., Author Notes.**, 2004. Pseudomonas fluorescens infection by bacteriophage  $\Phi$ S1: the influence of temperature, host growth phase and media. *FEMS Microbiology Letters*, Volume 241, Issue 1, December 2004, Pages 13–20.
15. **Bagnouls F., et Gaussen H.**, 1953. Saison sèche et indice xérothermique. *Edit. Bull. Soc. Hist. Nat. Toulouse* 88 (3-4). 193-239 pp.
16. **Bakkali F., Averbeck S., Averbeck D., et Idaomar M.**, 2008. Biological effects of essential oils. *Food and Chemical Toxicology*, 46: 446 – 475.
17. **Bakry A. M., Abbas S., Ali B., Majeed H., Abouelwafa M. Y., Mousa, A. and Liang L.**, 2016. Microencapsulation of Oils: A Comprehensive Review of Benefits, Techniques, and Applications. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 15: 143–182. doi: 10.1111/1541-4337.12179.
18. **Balbaa S. I., Hilal, S. H., Haggag, M. Y.**, 1973. The volatile oil from the herb and fruits of *Carumcopicum* at different stages of growth. *Planta Medica.* 23, 312–9.

19. **Baldy CH., 1990.** Le climat de l'olivier (*Olea europaea* L.). Volume jubilaire du professeur P. QUEZEL. Ecole. Méditerranée XVI. 113-12 PP.
20. **Barnett H., 1972.** Illustrat genera of imperfect fungi. 3rd edition, Burgess Publishing Co, 273 pp.
21. **Baytop T., Sütlüpinar N., 1986.** Characteristics of « Nanahan» cultivated in Anatolia and its volatile oil. J. Fac. Pharm. Istanbul. 22, 73-76.
22. **Bekhechi C., Boti J.B., Bekkara F.A., Abdelouahid D.E., Casanova J., Tomi, F., 2010.** Isothymol in ajowan essential oil. *Nat. Prod. Commun.*5, 1107-1110.
23. **Belabbes R., Dib MEA., Djabou N., 2017.** Chemical Variability, Antioxidant and Antifungal Activities of Essential Oils and Hydrosol Extract of *Calendula arvensis* L. from Western Algeria. *Chem Biodivers.* 14(5)e1600482.
24. **Belaiche P., 1979.** Traité de Phytothérapie et d'Aromathérapie, Tome L'aromatogramme , Ed: Paris, Maloine.
25. **Ben Arfa A., Combes S., Preziosi-Belloy L., Gontard N., Chalier P., 2006.** Antimicrobial activity of carvacrol related to its chemical structure, *Letters in Applied Microbiology*, 43 (2), p:149-154.
26. **BEN ALI Nejjib., BENDAOUH Houcine., ROMDHANE Mehrez., 2018.** Study of *Asteriscus maritimus* (L.) essential oil encapsulation with almond gum -gelatin by Complex Coacervation Method. Research Unit: MACS, ENIG, Gabes University TUNISIA.
27. **Benrouina B., 2001.** La taille de l'olivier. Cours International « gestion technique des plantations d'olivier en conditions d'agriculture pluviale: Nouvel perspective ». Sfax, Tunisie. Du 22 janvier au 02 février 2001. PP: 2 – 19.
28. **Benyoucef, F., Dib M.A., Tabti, B., Zoheir, A., Costa J., Muselli A., 2019.** Synergistic Effects of Essential Oils of *Ammoides verticillata* and *Satureja candidissima* Against Many Pathogenic Microorganisms. *Anti-Infective Agents.* 2019, DOI: 10.2174/2211352517666190227161811.
29. **Bhargava P. P., Hakasas, C. N., 1959.** Examination of essential oil from ajowan seeds. *Perfum Essent Oil Res.* 959, 50, 204–206.
30. **Block E., 2010.** Garlic and Other Alliums: The Lore and the Science, Royal Society of Chemistry: Cambridge, UK.
31. **Blois M. S., 1958.** Antioxydant determination by the use of stable free radical, *Nature.* 181p.
32. **Blumenthal M., Goldberg A., Brinckmann J., 2000.** Herbal Medicine: Expanded Commission E Monographs. Austin TX: American Botanical Council, Newton MA, Integrative Medicine Communications.
33. **Bonnier G., 1990.** La grande flore en couleur .Ed. Belin. Paris.
34. **Bouktir O., 2003.** Contribution à l'étude de l'entomofaune dans trois oliveraies à Tizi Ouzou et étude de quelques aspects bio écologique de la mouche d'olive *Bactrocera oleae* Gmelin et Rossi 1788 (Diptera - Tephritidae).Thèse. Mag. INA.EL Harrach. 191 p.
35. **Boutaleb Abdelmalek Joutei & Fouzia Bassy ., 2010** Essais de lutte chimique et biologique contre les acariens (*Tetranychus urticae* Koch) et les pucerons (*Myzus persicae* Sulzer) sur cultures maraîchères dans la région du Saïs. Travaux de l'Institut Scientifique, Série Zoologie, Rabat, 2009, n°45.
36. **Bowles E.J., 2003.** The Chemistry of Aromatherapeutic Oils, 3rd Edition Griffin Press.

37. **Bozin B., Mimica-Dukic N., Simin and G., Anackov.,** 2006. Characterization of the volatile composition of essential oils of some Lamiaceae species and the antimicrobial and antioxidant activities of the entire oils. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 54: 1822-1828.
38. **Brag M. E., Leal P. F., Carvalho J. E., Meireles M. A.,** 2003. Comparison of yield, composition, and antioxidant activity of turmeric (*Curcuma longa* L.) extracts obtained using various techniques". *J Agric Food Chem.* 51, 6604–6611.
39. **Brattoli M., Cisternino E., Dambruoso P. R., deGennaro G., Giungato, P., Mazzone A., Palmisani, J., Tutino M.,** 2013. Gas chromatography analysis with olfactometric detection (GC-O) as a useful methodology for chemical characterization of odorous compounds », *Sensors (Basel)*. 13, 16759-16800.
40. **Braun L., et Cohen M.,** 2015. *Herbes & Natural Supplements, An Evidence-Based Guide. Vol 2. 4th Edition.* Elsevier Australia.
41. **Brennan J.,** Turmeric. *Lifestyle. The National.* 2008. Retrieved 13 May 2012.
42. **Breton C., Tersac M., Bervillé A.,** 2006. Genetic diversity and gene flow between the wild olive (oleaster, *Olea europaea* L.) and the olive, several Plio-Pleistocene refuge zones in the Mediterranean basin suggested by simple sequence repeats analysis. *J Biogeography* (in press). [Published article online: 29-Jun-2006 *Journal of biogeography*. doi: 10.1111/j.1365-2699.2006.01544.x].
43. **Burt S.,** 2004. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods – a review. *Int J Food Microbiol.* 94, 223–253.
44. **Caillet S., & Lacroix M.,** 2007. Les huiles essentielles : leurs propriétés antimicrobiennes et leurs applications potentielles en alimentaire. *INRS-Institut Armand-Frappier, (RESALA).*1- 8 pp.
45. **Caldwell B.,** 2000. *Five domains of innovation and abandonment,* routledge.
46. Carrée, P. *Précis de technologie et de chimie industrielle. Tome II.* Ed. Ballière J. B. et fils. 1953, 432 pages.
47. **Chamberlain E.M., et Dagley S.,** 1968. The metabolism of thymol by a *Pseudomonas*. *Biochemical Journal.* 110:755-763.
48. **Chialva F., Monguzzi, F., Manitto P.,** 1993. Essential oil constituents of *Trachyspermum copticum* L. Link fruits. *J Essen Oil Res.* 5, 105–106.
49. **Chovin P., et Roussel A.,** 1973. *Physicochimie et physicopathologie des polluants atmosphériques.* Edition. Masson et Cie Editeur, 299 pp.
50. **Claud F., Christianne F., Paul M., Jean D.,** 1998. *Ecologie approche scientifique et pratique.* 4ème édition. Paris, 43p.
51. **Colin L.,** 2016. *L’ail et son intérêt en phytothérapie .* Thèse de doctorat en pharmacie, sous la direction de Mme Dominique LAURAIN-MATTAR, Nancy, Université de Lorraine. 131p.
52. **Cronquist A.,** 1981. *An Integrated System of Classification of Flowering Plants.* Columbia University Press. New York.
53. **Croteau R., Kutcahn T. M.,** 2000. Natural products. In *Biochemistry and Molecular Biology of Plants* (Buchanan, B., Grissem, W. and Jones, R., eds). Rockville, MD: American Society of Plant Physiologists, pp. 1250-1318.
54. **Daira N., Maazi M., Chefroua A.,** 2016. Contribution à l’étude phytochimique d’une plante médicinale (*Ammoides verticillata* Desf. Briq.) de l’Est Algérien. *Bull. Soc. r. sci. Liège.* 85, 2016, 276 – 290.

55. **Dajoz R.**, 1976. Précis d'écologie. Ecologie fondamentale et appliquée. Edition DUNOD. Paris. P 195.
56. **Daoudi L.**, 1994. Etude des caractères végétatifs et fructifères de quelques variétés locales et étrangères d'olivier cultivées à la station expérimentale de Sidi-Aich (Bejaia). Thèse de magister .Institut. Nat. Agr. El-Harrach. 132p.
57. **Desai K.G.H., & Park H.J.**, 2005. Recent developments in microencapsulation of food ingredients. *Drying Technol.* 23:1361–94.
58. **Dieumou F. E., Tegua A., Kuate J. R., Tamokou J. D., Fonge N. B., Dongmo M. C.**, 2009. Effects of ginger (*Zingiber officinale*) and garlic (*Allium sativum*) essential oils on growth performance and gut microbial population of broiler chickens. *Livest Res Rural Dev.*
59. **Dorman H.J.D., Deans S.G.**, 2000. Antimicrobial agents from plants, Antibacterial activity of plant volatile oils, *J of Applied Microbiology*, 88, p: 308-316.
60. **Dosoky N. S., Setzer W. N.**, 2018. Chemical Composition and Biological Activities of Essential Oils of Curcuma Species. *Nutrients.* 10, 1196.
61. **Douiri L., Boughdad A., Assobhei O., Mounni M.**, 2013. Chemical composition and biological activity of *Allium sativum* essential oils against *Callosobruchus maculatus*. *IOSR J. Environ. Sci. Toxicol. Food Technol.*, 3, 30-36.
62. **Direction des services agricoles, 2007**
63. **Direction des services agricoles.2003**
64. **El Ouariachi E., Tomi P., Bouyanzer A., Hammouti B., Desjobert J. M., Costa J., Paolini J.**, 2010. Chemical composition and antioxidant activity of essential oils and solvent extracts of *Ptychotisverticillata* from Morocco. *Food Chem Toxicol.* 2011, 49, 533-6. doi: 10.1016/j.fct.2010.11.019.
65. **Emberger L.**, 1955. Une classification biogéographique des climats. *Rech. Trav. Lov. Géol. Bot. Zool. Fasc. Sci. Montpellier.* 47 p.
66. **Emberger L., 1971. Travaux de botanique et écologie. Ed. Masson. Paris. 520 p.**
67. **Essential oils.** 2015. Analysis by gas chromatography on capillary columns -- General method, p. 7.
68. **Fang Z., & Bhandari B.**, 2010. Encapsulation of polyphenols – a review. *Trends Food Sci Technol* 2010, 21:510-23.
69. **Felidj M., Bouazza M., Ferouani T.**, 2010. Note sur le cortège floristique et l'intérêt de la plante médicinale *Ammoides pussila* (verticillata) dans le Parc national des Monts de Tlemcen (Algérie occidentale). *Geo-Eco-Trop.* 34, 147–154.
70. **Fisher K., Phillips CA.**, 2006. The effect of lemon, orange and bergamot essential oils and their components on the survival of *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli* O157, *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus* and *Staphylococcus aureus* *in vitro* and in food systems. *J Appl Microbiol.* 2006,101:1232–1240.
71. **Fontanazza G.**, 1990. Comment cultiver en vue de la qualité d'huile. *Olivae* n°24,31-39pp.
72. **Fournomiti M., et al.**, 2015. Antimicrobial activity of essential oil of cultivated Oregano (*Oreganum vulgare*), Sage (*Salvia officinalis*) and Thyme (*Thymus vulgaris*) against clinical isolates of *Escherichia coli*, *Klebsiella oxytoca* and *Klebsiella pneumoniae*. *Microbial Ecology in Health & Disease.* 26, p: 1-7.
73. **Gaouar A.**, 1986. Hypothèse et réflexions, sur la dégradation des écosystèmes forestiers dans la région de Tlemcen. *For.Médit.* 2 (2),131-146 pp.

74. **Gaouar M.**, 2004. Bio-écologie de la mouche de l'olive *Bactrocera oleae* (Gmel.) et sa microflore associée en vue d'une proposition de lutte intégrée. Magister. Université de Tlemcen.
75. **Gaouar N., Debouzie D.**, 1995. Within tree vertical pattern in *Bactrocera Oleae* (Gmel.) (Diptera : Tephritidae) infestation and optimisation of insecticide application. *J. Appl. Ent.*, 119, 262-289 pp.
76. **Giudicelli F.**, 2011. Caractérisation de nouvelles molécules et variabilité chimique de trois plantes du continuum corse Sardaigne: *Chamaemelum mixtum*, *Anthemis maritima* et *Eryngium maritimum*. », thèse de doctorat, Pascal Paoli, Corse. France.
77. **Gounder D.K., Lingamallu J.**, 2012. Comparison of chemical composition and antioxidant potential of volatile oil from fresh dried and cured turmeric (*Curcuma longa*) rhizomes. *Ind. Crop. Prod.*, 38, 124-131.
78. **Guyot, G., Mamy J.**, 1999. Climatologie de l'environnement. 2ème édition. DUNOD. Paris. 505 p.
79. **Halfaoui K., et Kana N.**, 2002. Contribution à l'étude des ressources phylogénétiques algériennes : Caractérisation primaire de la variété « Chemlal » (*Olea europaea* L.) cultivées dans deux régions oléicoles Boghnie (Tizi-Ouzou) et IghzerAmokran (Bejaia). Thèse. ing. Agr. Université de Tizi-Ouzou. 114p.
80. **Hamiche A.**, 2005. Entomofaune dans deux oliveraies de Boudjima et de Maatkas (Tizi Ouzou) , bioécologie de la mouche de l'olivier *Bactrocera oleae* Gmelin et Rossi 1788 (Diptera – Tephritidae). Thèse Magister. INA. El Harrach, 199 p.
81. **Haniotakis G. E., Voyadjoglou A.**, 1978. Oviposition regulation in *Dacus oleae* by various olive fruit characters. *Entomol. exp. appl.*, 24, 387-392.
82. **Harold E.**, 1998. Making Bacteria Media from Potato, 14045 Huff St., Palmyra IN 47164). . . . . PDA.
83. **Harris D.J.**, 1989. laboratory studies on court ships and meeting in the mediterranean fruit fly, *Ceratitis capitata* (Wied), thesis. Université Manchester. 230p.
84. **I. N. P. V.**, 2005. Fiche technique sur *Bactrocera oleae*. Irrigation. Tnst. Nat. Agro. El Harrach- Alger. 2 p.
85. **Heo H. J., Kim Y. J., Chung D., Kim D.**, 2007. Antioxidant capacities of individual and combined phenolics in a model system. *Food Chem.* 104, 87-92.
86. **Louiza HIMED ép. MERNIZ.**, 2018. Évaluation des activités biologiques des huiles essentielles du citron (*Citrus limon* comme agent conservateur à la margarine allégée. Thèse de Doctorat en Sciences Spécialité : Sciences Alimentaires. Université frères mentouri constantine. 86p.
87. **Hong S. L., Lee G. S., Syed Abdul Rahman S. N., Ahmed Hamdi O. A., Awang, K., Aznam Nugroho N., Abd Malek S.N.**, 2014. Essential Oil Content of the Rhizome of *Curcuma purpurascens* Bl. (Temu Tis) and Its Antiproliferative Effect on Selected Human Carcinoma Cell Lines. *Sci World J.* 2014, 1–7.
88. **Hu Y., Kong W., Yang X., Xie L., Wen J., Yang M.**, 2014. GC-MS combined with chemometric techniques for the quality control and original discrimination of *Curcumae longa* rhizome: Analysis of essential oils". *J SepSci.* 2014, 37, 404–11.
89. **ITAF.**, 2013. la culture de l'olivier. DFRV 2013. Tessa El Merdja. Birtouta. Alger.
90. **Jasso de Rodríguez DJ., Hernández-Castillo D., Angulo-Sánchez JL., Rodríguez-García R., Villarreal Quintanilla JA., Lira-Saldivar RH.**, 2017. Antifungal activity in

- vitro of *Flourensia* spp. extracts on *Alternaria* sp., *Rhizoctonia solani*, and *Fusarium oxysporum*. *Ind Crops Prod.* 2007,25:111–116. doi: 10.1016/j.indcrop.2006.08.007.
91. **Jerriya A., Jardak T., Khlif M., Germazi T.,**1982. La mouche de l'olive *Dacus oleae* Orne! (Diptera - Tephritidae) et son impact sur la production oléicole dans la région de Sfax (Tunisie). *Ann. Inst. Nati. Agri. Tunisie*, 1(1) 5 – 54 pp.
  92. **Joulain, D., König, W.,** 1998. The atlas of spectral data of sesquiterpene hydrocarbons. Hambourg. E.B. Verlag.
  93. **Kahl R., Kappus H.,** 1993. Toxicology of the synthetic antioxidants BHA and BHT in comparison with the natural antioxidant vitamin E. *Z Lebensm Unters Forsch.*, 196, 329-338.
  94. **Kaluderović G.N., Krajnović T., Momcilovic M., Stosic-Grujicic S., Mijatović S., Maksimović-Ivanić D., Hey-Hawkins E.,**2015. Ruthenium (II) p-cymene complex bearing 2,2'-dipyridylamine targets caspase 3 deficient MCF-7 breast cancer cells without disruption of antitumor immune response. *J. Inorg. Biochem.*, 153, 315-321.
  95. **Kapatos E.T.,** 1989. Immature stages. In: *Fruit flies. Their biology, natural enemies and control*. Vol. 3B. Ed by Robinson and Hooper. Amsterdam, Elsevier, 185-191 pp.
  96. **Kedia, A., Prakash B., Mishra P. K., Dwivedy A. K., Dubey N K.,** 2015. *Trachyspermum mammi*L. Essential oil as plant-based preservative in food system. *Ind. Crop. Prod.* 69:104– 109.
  97. **Kerdudo A., De O., Antipolis N.S. & Directeur C.,** 2015. Optimisation de la conservation des cosmétiques : impact de la formulation, recherche de nouveaux conservateurs naturels , encapsulation. Thèse doctorat en sciences de l'université de Nice – sophia antipolis.
  98. **Khanikor B., Parida P., Yadav RNS., Bora D.,** 2013. Comparative mode of action of some terpene compounds against octopamine receptor and acetyl cholinesterase of mosquito and human system by the help of homology modeling and Docking studies. *J Appl Pharm Sci*, 3(02): 006-12.
  99. **Khanikor B., Bora D.,** 2011. Toxicity of essential oil compounds against *Exorista sorbillans* (Diptera: Tachinidae), a parasitoid of silkworm. *African Journal of Biotechnology*.10: 19807-19815.
  100. **Knobloch K A., Pauli B., Iberl H., Weigand N., Weis N.,** 1989. Antibacterial and antifungal properties of essential oil components. *J Essen Oil Res.* 1, 119-123.
  101. **Kocić-Tanackov S., Dimić G., Levi J., Tanackov. I., Tepić A., Vujičić B., Gvozdanović-Varga J.,** 2012. Effects of onion (*Allium cepa* L.) and garlic (*Allium sativum* L.) essential oils on the *Aspergillus versicolor* growth and sterigmatocystin production. *J. Food Sci.*, 77, 278-284.
  102. **Koh K J., Pearce A L., Marshman G., Finlay-Jones J.J., Hart P.H.,** 2002. Tea tree oil reduces histamine-induced skin inflammation. *Br. J Dermatol.* 147, 1212–1217.
  103. **Kohri Shunji ., HirotadaFujii ., Shigeru Oowada., Nobuyuki Endoh., Yoshimi Sueishi., Miku Kusakabe., Masashi Shimmei., Yashige Kotake.,**2009 An oxygen radical absorbance capacity-like assay that directly quantifies the antioxidant's scavenging capacity against AAPH-derived free radicals. *Rev- Analytical Biochemistry* Volume 386, Issue 2, 15 March 2009, Pages 167-171.
  104. **Krief S.,** 2003. Métabolites secondaires des plantes et comportement animal: surveillance sanitaire et observations de l'alimentation des chimpanzés (*Pan troglodytes schweinfurthii*) en Ouganda. Activités biologiques et étude chimique de plantes

- consommées. Sciences du Vivant [q-bio]. Museum national d'histoire naturelle - MNHN PARIS.
105. **Kumar GS., Jayaveera KN., Ashok Kumar CK., Umachigi P Sanjay., Vrushabendra Swamy BM., Kishore Kumar DV.,**2007. Antimicrobial effects of Indian medicinal plants against acne-inducing bacteria. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, June, 6 (2): 717-723.
  106. **Lakhdar L., Ennibi O.K., Farah A.,** 2016. Composition pharmacologique de l'origan (huile essentielle) a effet antibacterien sur d'Aggregatibacter actinomycetemcomitans, brevetWO2016076689A1.(<https://www.google.com/patents/WO2016076689A1?cl=fr>).
  107. **Laouer H., Zerroug M., Sahli F., Chaker A N., Valentini G., Ferretti, G, Grande M., Anaya J.,**2003. Composition and Antimicrobial activity of Ammoides pusilla (Brot.) Breistr Essential oil. *JEOR*. 15: 135-138.
  108. **lawrence R., lawrence K.,** 2011. Antioxidant activity of garlic essential oil (*Allium Sativum*) grown in north Indian plains. *Asian Pac J Trop Biomed*. 1(1), S51–S54. doi:10.1016/s2221- 1691(11)60122-6.
  109. **Ledezma E., Marcano K., Jorquera A., De Sousa L., Padilla M., Pulgar M., Apitz-Castro R.,** 2000. Efficacy of ajoene in the treatment of tineapedis: A double-blind and comparative study with terbinafine. *JAM Acta Dermatol*. 2000, 43, 829–832.
  110. **Lee B H., Choi W S., Lee S E., Park B S.,** 2001. Fumigant toxicity of volatile natural products from Korean spices and medicinal plants towards the rice weevil, *Sitophilus oryzae* (L.). *Crop Protect*. 2001, 20, 317-320.
  111. **Leimann FV., Goncalves OH., Machado RAF., Bolzan A.,** 2009. Antimicrobial activity of microencapsulated lemongrass essential oil and the effect of experimental parameters on microcapsules size and morphology. *Mater Sci Eng C-Biomimetic Supramol Syst* 29:430–6.
  112. **Lila M A.,** 2009. Interactions Between Flavonoids that Benefit Human Health. In: Winefield C., Davies K., Gould K. (eds) *Anthocyanins*. Springer, New York, NY. 2009, 10, 305-320.
  113. **Lin, Y., Stormo G.D., Taghert, P.H.,** 2004. The neuropeptide pigment-dispersing factor coordinates pacemaker interactions in the *Drosophila* circadian system. *J. Neurosci*. 24(36): 7951-7957.
  114. **Lis-Balchin M.,** 2002. *Lavender: the genus Lavandula*. Taylor and Francis, London. 2002. 37, 40,50, 155- 200.
  115. **Loap S.,** 2008. Curcuma (partie I). *Phytothérapie*. 6: 22–28. doi : 10.1007/s10298-008-0281-7.
  116. **Lousert R., et Brousse G.,** 1978. *L'olivier technique agricole et production méditerranéenne*. Ed.G.P. Maisonneuve et Larose. 437p.
  117. **Madjdoub K.,** 2011. Stratégie de défense biochimique mise en œuvre par les olives attaquées par le ravageur *Bactrocera oleae* (Diptera-Tephritidae) dans la région d'oudjlida (wilaya de Tlemcen). Thèse Mag. Ecologie et Biologie des populations. Université de Tlemcen.125p.
  118. **Magro A., et al.,** 2007. Assessment of patch quality by ladybirds: relative response to conspecific and heterospecific larval tracks a consequence of habitat similarity? *Chemoecology*, 17, 37-45.

119. **McClements D., Lesmes U.**, 2009. Structure-function relationships to guide rational design and fabrication of particulate food delivery systems. *Trends Food Sci Technol* , 20:448-57.
120. **Michael H.**, 2009. Chemical product engineering- the third paradigm. *Comput chem. Eng.* 33(2009)947-953.
121. **Miguel, G., Simones M., Figueiredo A., Barroso J., Pedro L., Carvalho L.**, 2004. Composition and antioxidant activities of the essential oils of *Thymus caespititius*, *Thymus camphoratus* and *Thymus mastichina*. *Food Chem.* 86, 183–188.
122. **Miladinović D L., et al.**, 2015. In vitro interactions of *Peucedanum officinale* essential oil with antibiotics. *Nat. Prod. Res.* 2015, 29(10): p. 972-975.
123. **Mimica-Dukic N., Bozin B., Sokovic M., Simin N.**, 2004. Antimicrobial and antioxidant activities of *Melissa officinalis* L. (Lamiaceae) essential oil. *J Agric Food Chem.* 52, 2485–2489.
124. **Mnayer D., Fabiano-Tixier A.S., Petitcolas E., Hamieh T., Nehme N., Ferrant C., Fernandez X., Chemat F.**, 2014. Chemical composition, antibacterial and antioxidant activities of six essentials oils from the Alliaceae family. *Molecules.* 19, 20034-20053.
125. **Moenne-Loccoz Y., Powell J., Higgins P., McCarthy J., O’Gara F.**, 1998. An investigation of the impact of biocontrol *Pseudomonas fluorescens* F113 on the growth of sugar beet and the performance of subsequent clover-Rhizobium symbiosis. *Appl. Soil Ecol.* 7, 225– 237.
126. **Moumene F., Benali-Toumi M., Benabderrahman A., Benyamina H., Selem M. M., Dif.** 2016. Chemical composition and antibacterial activity of the essential oils of *Allium vineale* and *Allium sativum* of west Algerian. *Lavoisier.* 2016, doi: 10.1007/s10298-016-1038-3.
127. **Nazzaro F., Fratianni F., Coppola R., Feo V. D.**, 2017. Essential Oils and Antifungal Activity. *Pharmaceuticals*, 2017. 10(4), 86. doi:10.3390/ph10040086.
128. **NCCLS “National Committee for Clinical Laboratory Standards”.**, 2001. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: eleventh informational supplement, M100- S11, Wayne, PA, USA.
129. **Negi P S., Jayaprakasha G. K., Jagan Mohan Rao L., Sakariah K. K.**, 1999. Antibacterial Activity of Turmeric Oil: ABproduct from Curcumin Manufacture. *J Agric Food Chem.* 1999, 47, 10, 4297– 4300.
130. **Nejjah F., Ouhssine M., Srhiri A., El Yahoui M., Hajjaji N.**, 2006. Activité inhibitrice de la N-hexadécylbétaine sur staphylococcus aureu. *Bull. Soc. Pharm. Bordeaux*, 145, 85-90.
131. **Nelson K M., Dahlin J L., Bisson J., et al**, 2017. The Essential Medicinal Chemistry of Curcumin: Miniperspective". *J Med Chem.* 2017, 60, 1620–1637.
132. **Nikkhah M., Hashemi M., Najafi H., Farhoosh R.**, 2017. Synergistic effects of some essential oils against fungal spoilage on pear fruit, *Int. J. Food Microbiol.* 2016, doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2017.06.021.
133. **Nikmaram N., Roohinejad S., Hashemi S., Koubaa M., Barba F. J., Abbaspourrad A., & Greiner R.**, 2017. Emulsion-based systems for fabrication of electrospun nanofibers: Food, pharmaceutical and biomedical applications. *RSC Advances*, 7,28951e28964.

134. **Noorafshan A., Esfahani, S. A.,** 2013. A Review of Therapeutic Effects of Curcumin. *Curr Pharm Des.* 2013, 19, 2032-2046.
135. **Numpaque M.A., Oviedo L.A., Gil J.H., Garcia C.M., Durango D.L.,** 2011. Thymol and carvacrol biotransformation and antifungal activity against the plant pathogenic fungi *Colletotrichum acutatum* and *Botryodiplodia theobromae*. *Tropical Plant Pathology.* 36 (1): 3-13.
136. **Ocak B., Gulumser G., Baloglu E.,** 2011. Microencapsulation of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil by using simple coacervation method. *J Essent Oil Res* 23:58–65.
137. **Ollagnier J.-N.,** 2014. Pharmaceutical capsules obtained by coacervation without the use of toxic cross-linking agents. *PCT Int. Appl.*
138. **Oskuee R.K., Behravan J., et Ramezani M.,** 2011. Chemical composition, antimicrobial activity and antiviral activity of essential oil of *Carum copticum* from Iran, *Avicenna Journal of Phytomedicine*, Vol. 1, No. 2, p: 83-90.
139. **Oussalah Mounia., Stéphane Caillet., Linda Saucier., Monique Lacroix.,** 2006. Antimicrobial Effects of Selected Plant Essential Oils on the Growth of a *Pseudomonas Putida* Strain Isolated From Meat. 2006 Jun;73(2):236-44. doi: 10.1016/j.meatsci.2005.11.019. Epub 2006 Jan 24.
140. **Park S.Y., Jin, M.L., Kim, Y.H., Kim, Y., Lee, S.J.** 2012. Anti-inflammatory effects of aromatic-turmerone through blocking of NF- $\kappa$ B, JNK, and p38 MAPK signaling pathways in amyloid  $\beta$ -stimulated microglia. *Int. Immunopharmacol.*, 2012, 14(1), 13-20.
141. **Park, S.Y., Kim, YOH., Kim, Y., Lee, S.J.,** 2012. Aromatic-turmerone's anti-inflammatory effects in microglial cells are mediated by protein kinase A and heme oxygenase-1 signaling. *Neurochem. Int.*, 2012, 61(5), 767-77.
142. **Păunescu E., Nowak-Sliwinska P., Clavel C.M., Scopelliti R., Griffioen A.W., Dyson P.J.** 2015. Anticancer Organometallic Osmium(II)-p-cymene Complexes. *Chem. Med. Chem.*, 2015, 10, 1539-1547.
143. **Peter K. V.,** 2008. Underutilized and Underexploited Horticultural Crops, NIJS .2008, 2, 341. Retrieved 6 November 2018.
144. **Piacentini E., Giorno L., Dragosavac MM., Vladislavljevic GT., Holdich RG.,** 2013. Microencapsulation of oil droplets using cold water fish gelatine/gum arabic complex coacervation by membrane emulsification. *Food Res Int* 53:362–72.
145. **Pinelli P., Galardi C., Mulinacci N., Vincieri F. F., Cimato A., Romani A.,** 2003. Minor polar compound and fatty acid analyses in monocultivar virgin olive oils from Tuscany. *Food Chemistry*, Vol.80, 331–336 pp.
146. **Pintore G., Usai M., Bradesi P., Juliano C., Boatto G., Tomi F., Chessa M., Cerri R. & Casanova J.,** 2002. Chemical composition and antimicrobial activity of *Rosmarinus officinalis* L. oils from Sardinia and Corsica. *Flavour and Fragrance Journal*, 17: 15-19.
147. **Pokorn J.,** 2007. Are natural antioxidants better-and safer-than synthetic antioxidants? *European J Lipid Sci Tech.* 2007, 109, 629-642
148. **Ponce A.G., Fritz R., del Valle C.E., & Roura S.I.,** 2003. Antimicrobial activity of essential oils on the native microflora of organic Swiss chard. *Lebensmittel-Wissenschaft und -Technologie*, 36: 679-684.
149. **Prabodh Satyal., Sharopov., Farukh ., Mansour Ahmed., William N., Setzer and Michael Wink.,** 2017. "Antioxidant Activity and Cytotoxicity of Methanol Extracts of *Geranium macrorrhizum* and Chemical Composition of its Essential Oil." *Journal of MedicinallyActive Plants* 5, (2):53-58. <https://scholarworks.umass.edu/jmap/vol5/iss2/8>.

150. **Priya, R., Prathapan, A., Raghu, K. G., Menon, A. N.,** 2012. Chemical composition and in vitro antioxidative potential of essential oil isolated from *Curcuma longa* L. leaves. *Asian Pac J Trop Biomed.* 2012, S695-S699.
151. **Priyadarsini K. I.,** 2014. The chemistry of curcumin: from extraction to therapeutic agent". *Molecules.* 2014, 19, 20091–20112.
152. **Quezel P., Santa S.,** 1963. Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales. Tome II. Edition du centre national de la recherche scientifique. Paris France, 1963, 603.
153. **Ramade F.,** 2003. *Elément d'écologie fondamentale*, 3eme édition DUNOD. Paris. 690p.
154. **Rappily F.,** 1968. Les techniques en mycology en pathologie vegetale. *Annuelles des Epiphytes*, vol.19. Institut National de Recherche Agronomique, Paris (France), 102p.
155. **Ravit H., Shlomo G., Margalit B., Mordehai D., Naomi Z.,** 2009. Synergistic activity between a Spanish-derived natural antioxidant (NAO) and commercial antioxidants in a variety of oxidation systems. *Food Res. Int.* 2009, 42, 246-253.
156. **Richard J., Benoit J. P., Thies C.,** 2001. Method for preparing microcapsules comprising active materials coated with a polymer and novel microcapsules in particular obtained according to the method. United States Patent 6183783.(6183783).
157. **Rieuf P.,** 1985. Clé d'identification des champignons rencontres sur les plantes maraichères. Publication INRA, Paris.
158. **Robak J., and Gryglewski R.J.,** 1988. Flavonoids Are Scavengers of Superoxide Anions. *Biochemical Pharmacology*, 37, 837-841.
159. **Rosseler Y.,** 1989. *Fruits flues biology, naturel ennemis and control.* Volume 3 B. Edited by A. S. Robinson and G. Hooper.
160. **Rossini G.,** 1999. *Mémoire de l'olivier*, ed Equinoxe.
161. **Sagalowicz, L., & Leser, M. E.,** 2010. Delivery systems for liquid food products. *Current Opinion in Colloid & Interface Sciences*, 15, 61–72.
162. **Saidi amina., Ali Belhadj.,** 2016. Enquete sur les plantes anti hypertensives de la région de Tlemcen. Thèse pharmacie. Univ Tlemcen.
163. **Sasaki A., Ashikari M., Uegushi-tanaka M., Itoh H., Nishimura A., Swapan D., Ishiyama K., Saito T., Kobayashi M., Kush G. S., Kitano H., & Matsuoka M.** 2002. A mutant gibberellin-synthesis gene in rice. New insight into the rice variant that helped to avert famine over thirty years ago. *Nature* 416, 701-702.
164. **Sasaki T., Matsumoto T., Yamamot K., Sakata K., Baba T., Katayose Y., Wu J., Niimura Y., Cheng ZA., Nagamura Y., Antonio B. A., Kanamori H., Hosokawa S., Matsukawa M., Arikawa K., Chiden Y., Hayashi M., Okamoto M., Ando T., Aoki H., et al.** 2002. The genome sequence and structure of rice chromosome 1. *Nature* 420, 312- 316.
165. **Satyral P., Craft J. D., Dosoky N.S., Setzer W. N.,** 2017. The Chemical Compositions of the Volatile Oils of Garlic (*Allium sativum*) and Wild Garlic (*Allium vineale*). *Foods.* 2017, 5, 6. E63. doi: 10.3390/foods6080063
166. **Schmaus G., Kubeczka K.,** 1985. The influence of isolation conditions on the composition of essential oils containing linalool and linalyl acetate. *Baerheim Svendsen A, Scheffer. JJC*, 1985.
167. **Sfara ., Zerba EN., Alzogaray RA.,** 2009. Fumigant insecticidal activity and repellent effect of five essential oils and seven monoterpenes on first-instar nymphs of *Rhodnius*

- prolixus. *J Med Entomol* 2009, 46(3): 511-5. [<http://dx.doi.org/10.1603/033.046.0315>]-  
[PMID: 19496421]
168. **Shin S., Kang C.A.**, 2003. Antifungal activity of the essential oil of *Agastache rugosa* Kuntze and its synergism with ketoconazole. *Letters in Applied Microbiology*. 2003, 36(2), 111– 115. doi:10.1046/j.1472-765x.2003.01271.x.
169. **Singh G., Kapoor I. P. S., Singh P., de Heluani C. S., de Lampasona M. P., Catalan C. A. N.**, 2010. Comparative study of chemical composition and antioxidant activity of fresh and dry rhizomes of turmeric (*Curcuma longa* Linn.). *Food Chem. Toxicol.* 2010a, 48: 1026-1031.
170. **Singh G., Singh O.P., Maurya S.**, 2002. Chemical and biocidal investigations on essential oils of some Indian *Curcuma* species. *Prog. Cryst. Growth Charact. Mater.*, 2002, 45(1-2), 75-81
171. **Smith-Palmer A., Stewart J., Fyfe L.**, 2001. The potential application of plant essential oils as natural food preservatives in soft cheese. *Food Microbiology*, 18: 463–470.
172. **Solomon B., Sahle FF., Gebre-Mariam T., Asres K., Neubert RHH.**, 2012. Microencapsulation of citronella oil for mosquito-repellent application: formulation and in vitro permeation studies. *Eur J Pharm Biopharm* 80:61–6.
173. **SouzaDe. A., D. García L., Sueiro L., Licea and E., Porrás.**, 2005. Pre-sowing magnetic treatment of tomato seeds: effects on the growth and yield of plants cultivated late in the season. *Spanish Journal of Agricultural Research* (2005) 3(1), 113-122.
174. **Sriwattanachai S., Sadiq M. B., Anal A. K.**, 2017. Synergistic antifungal effects of thyme essential oil and *Lactobacillus plantarum* cell-free supernatant against *Penicillium* spp and in situ effects. *J. Food Process. Preserv.* 2017, 42(1), e13400.doi:10.1111/jfpp.13400.
175. **Steinmetz K. A.**, 1994. Vegetables, fruit, and colon cancer in the Iowa Women's Health Study. *Am J Epidemiol.* 1994, 139, 1-15.
176. **Sutaphanit P., Chitprasert P.**, 2014. Optimisation of microencapsulation of holy basil essential oil in gelatin by response surface methodology. *Food Chem* 150:313–20.
177. **Takao T., Kitatani F., Watanabe N., Yagi A., Sakat K. A.**, 1994. Simple Screening Method for Antioxidants and Isolation of Several Antioxidants Produced by Marine Bacteria from Fish and Shellfish. *Biosci, Biotechnol. biochem.* 1994, 58 1780-1783.
178. **Taleb-Toudert Karima.**, 2015. Extraction et caractérisation des huiles essentielles de dix plantes aromatiques provenant de la région de Kabylie (Nord Algérien). Evaluation de leurs effets sur la bruche du niébé *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera : Bruchidae). Thèse de Doctorat en Sciences biologiques. Université MOULOUD MAMMARI de Tizi-Ouzou.134p.
179. **Tefiani C., Riazi A., Youcefi F., Aazza S., Gagoc C., Faleirod M. L., Pedroe L. G., Barrosoe J. G., Figueiredoe A. C., Megías C., Cortés-Giraldo J., Vioquef J., Miguelt M. G.**, 2015. *Ammoides pusilla* (Apiaceae) and *Thymus munbyanus* (Lamiaceae) from Algeria essential oils: Chemical composition, antimicrobial, antioxidant and antiproliferative activities. *J Essen Oil Res.* 2015, <http://dx.doi.org/10.1080/10412905.2015.1006739>.
180. **Teuscher E., Anton R., et Lobstein A.**, 2005. plantes aromatiques: épices, aromates, condiments et huiles essentielles. Tec et Doc éditions, Paris.
181. **Turmeric processing.** Kerala Agricultural University, Kerala, India. 2013. Retrieved 10 October 2015.

182. **Valnet M.**, 2005. Antibacterial Activity of 11 Essential Oils against *Bacillus cereus* In Tyndallized carrot Broth. *Int J Food Microbiol*, 2005, 85, 73-81.
183. **Wandrey C., Bartkowiak A., & Harding S.E.**, 2009. Materials for Encapsulation In: Zuidam N.J., Nedovic, V.A. (Eds.) *Encapsulation Technologies for Food Active Ingredients and Food Processing*, Springer: Dordrecht, The Netherlands, 2009, p. 31-100.
184. **Wang B., Adhikari B., Barrow C J.**, 2014. Optimisation of the microencapsulation of tuna oil in gelatin–sodium hexametaphosphate using complex coacervation. *Food Chem* 158:358–65.
185. **Wilson B., Abraham G., Manju V.S., Mathew M., Vimala B., Sundaresan S., Nambisan B.**, 2005. Antimicrobial activity of *Curcuma zedoaria* and *Curcuma malabarica tubers*. *J. Ethnopharmacol.*, 2005, 99, 147-151.
186. **Winefield C., Davies K., Gould K.**, 2009. (eds) *Anthocyanins*. Springer, New York, NY. 2009, 10, 305-320.
187. **Xiao ZB., Liu WL., Zhu GY., Zhou RJ., Niu YW.**, 2014. Production and characterization of multinuclear microcapsules encapsulating lavender oil by complex coacervation. *Flavor Fragrance J* 29:166–72.
188. **Yang ZM., Peng Z., Li JH., Li SD., Kong LX., Li PW., Wang QH.**, 2014. Development and evaluation of novel flavor microcapsules containing vanilla oil using complex coacervation approach. *Food Chem* 145:272–7.
189. **Yildirim.**, 2001. The Antioxidant Activity of the Leaves of *Cydonia vulgaris*. *Turk J Med Sci* 31:23-27. Department of Chemistry, Faculty of Kazım Karabekir Education, Atatürk University, Erzurum-TURKEY
190. **Yin M.C., Tsao S.M.**, 1999. Inhibitory effect of seven *Allium* plants upon three *Aspergillus* species. *Int. J. Food Microbiol.*, 1999, 49, 49-56.
191. **Young, I. S., Woodside J. V.**, 2001. Antioxidants in Health and Disease. *J Clin Pathol*. 2001, 54, 176-186.
192. **Zhang, L., Yang Z., Chen F, Su P., Chen D., Pan W., Du Z.**, 2017. Composition and bioactivity assessment of essential oils of *Curcuma longa*, L. collected in China. *Ind Crops Prod*. 2017, 109, 60–73.

## RESEARCH ARTICLE

# *Ammoides verticillata* Essential Oil as Biocontrol Agent of Selected Fungi and Pest of Olive Tree

Hanane Senouci<sup>1</sup>, Nassira Gaouar Benyelles<sup>1</sup>, Mohammed El Amine Dib<sup>2,\*</sup>, Jean Costa<sup>3</sup> and Alain Muselli<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Laboratoire d'Ecologie et Gestion des Ecosystèmes Naturels, Université de Tlemcen, BP 119, 13000, Algérie ;

<sup>2</sup>Laboratoire des Substances Naturelles et Bioactives (LASNABIO), Université de Tlemcen, BP 119, 13000, Algérie ;

<sup>3</sup>Laboratoire de Chimie des Produits Naturels, UMR CNRS 6134, Université de Corse, Campus Grimaldi, BP 52, Corte, 20250, France

**Abstract: Background:** *Ammoides verticillata* Briq is an aromatic and medicinal herb that has been widely used in folk medicine for treatment of several types of pathologies such as respiratory problems, colds, fever, headache, gastric disorders and renal infections

**Objective:** The main objective of this work was to evaluate the chemical composition, and the *in-vitro* and *in-vivo* antifungal, and insecticidal properties of essential oil of *Ammoides verticillata*.

**Methods:** In this work, the air-dried aerial parts of *Ammoides verticillata* were hydrodistilled in a Clevenger-type apparatus. The essential oil isolated was analyzed using gas chromatography (GC) and mass spectrometry (GC/MS). The *in-vitro* antifungal activity of the essential oil was investigated against four plant fungi using radial growth technique. The effect of the essential oil on disease development of olive caused by *Penicillium crustosum* and *Aspergillus niger* in the *in-vivo* conditions. The fumigation test of the essential oil was evaluated against L3 stages, pupas and adults of *Bactrocera oleae* known as the olive fly.

**Results:** The essential oil of *A. verticillata* was characterized mainly by carvacrol (44,3%), limonene (19,3%) and p-cymene (19,2%). The result of *in vitro* antifungal activity of essential oil showed an interesting antifungal inhibition against *Alternaria alternata* and *Fusarium solani* strains with percentage inhibition of 89%. Furthermore, oil of *A. verticillata* has demonstrated promising *in-vivo* antifungal activity to control infections of olives caused by *Aspergillus niger* and *Penicillium crustosum*. In addition, the essential oil exhibited fumigation toxicity against *Bactrocera oleae* with mortality percentage of 100% at 2 µL/L air.

**Conclusion:** The results showed that essential oil of *A. verticillata* has interesting biological activities, which suggests that oil have the potential to be used as biocide to protect olives of pathogenic fungi and pests.

## ARTICLE HISTORY

Received: January 08, 2019  
Revised: May 20, 2019  
Accepted: May 23, 2019

DOI:  
10.2174/2212798410666190619110251

**Keywords:** *Ammoides verticillata*, Essential oil, biocidal agent, *Bactrocera oleae*, olive tree.

## 1. INTRODUCTION

The olive tree, *Olea europaea* is one of the most characteristic trees of the Mediterranean region, a tree laden with symbols: peace, victory, strength and hope. It has great nutritional importance in addition to the social and economic importance for the peoples where it is widely distributed. The olive tree is exposed to a very diverse parasite complex such as pests and fungal diseases.

The whole of the diseases of the olive tree causes considerable falls of yield and represents a threat for the

olive-growing and human health due to mycotoxins [1]. *Bactrocera oleae* is considered one of the most formidable pests among insect pests, attracting the attention of all olive growers, especially in Algeria. This herbivorous also transmits fungi causing fruit rot [2]. Some of the existing pathogens can have serious consequences and their transmission by insects and other vectors makes their control difficult [3,4].

The synthetic pesticides are widely used to control insects and to protect food products against deterioration caused by fungi during production and storage [5-7].

There are many synthetic pesticides that are listed to be possible carcinogens and are still in use. Epidemiological surveys have evoked the involvement of synthetic pesticides in several pathologies, in particular to cause lymphoma, leu-

\*Address correspondence to this author at the Laboratoire des Substances Naturelles et Bioactives (LASNABIO), Université de Tlemcen, BP 119, 13000, Algérie; Tel/Fax: 0021343411189; E-mail [a\\_dibdz@yahoo.fr](mailto:a_dibdz@yahoo.fr)

kemia, breast cancer, asthma, and other immune system disorders [7].

To contribute to a sustainable management of the environment, the establishment of new alternatives of fungal infections control is encouraged. The essential oils are known for their antifungal and insecticidal effects [8]. Essential oils have been tested on different targets in crop protection: insects, microorganisms, weeds and also seed protection [9,10]. Essential oils have a very wide spectrum of action since they inhibit the growth of bacteria as well as those of fungi and yeasts. In many countries, essential oils were studied for their effectiveness as natural preservatives for foods [11].

*Ammoïdes verticillata* (synonyms: *Ptychotis verticillata*, *Trachyspermum Boiss*) is a fragrant plant that belongs to the family Apiaceae. It is a plant that grows spontaneously in northern Algeria, Morocco, Tunisia and northern Asia. *A. verticillata* is a strongly aromatic plant; its smell is very pleasant and intense; strongly balsamic and persistent even after desiccation. The therapeutic investigation carried out of this plant showed that the aerial parts of *A. verticillata* are used as antipyretic and antispasmodic (especially recommended in gastrointestinal spasms). In addition, Ziyat et al. [12] argue that *A. verticillata* is an aromatic plant recommended for influenza and has therapeutic properties against hypertension and diabetes.

To our knowledge, no studies have been conducted to use *A. verticillata* essential oil against olive tree fungi and pests. Therefore, the aims of this study were to study i) the chemical composition *A. verticillata* native to western Algeria, ii) the *in-vitro* and *in-vivo* antifungal activities and iii) the insecticidal properties of essential oil.

## 2. MATERIAL AND METHOD

### 2.1. Plant Material and Essential Oil Isolation

Aerial parts of *A. verticillata* were collected from Beni Snous station near Tlemcen city (Algeria) during the month of June (stage of full bloom). Voucher specimen (AVer.DA.06.2017) was deposited with the Herbarium of the University of Tlemcen. Essential oil was obtained from dry aerial parts by hydrodistillation for 5 h using a Clevenger-type apparatus and yielding 5% of pale-yellow essential oil.

### 2.2. Analysis Conditions

Essential oil was examined by GC and GC/MS. GC analyses were carried out using a Perkin Elmer Auto-system GC apparatus equipped with a single injector FID detector and two fused-silica capillary columns (60 m x 0.22 mm, film thickness 0.25 µm) with different stationary phases: Rtx-1 (polydimethylsiloxane) and Rtx-Wax (polyethylene glycol) programmed from 60°-220°C at 2°C/min.

For GC/MS analysis, the samples were analyzed using a Perkin Elmer TurboMass detector, and the same column and conditions as previously described. Ion source temperature: 150°C; energy ionization: 70 eV; electron ionization mass spectra are acquired over the mass range 35-350 Da. Split: 1/80.

The identification of individual compounds was based on their GC retention indices (RI) on polar and apolar columns, determined relative to the retention time of a series of n-alkanes with linear interpolation with those of authentic compounds, and on computer matching with commercial mass spectral libraries and comparison of spectra with those of our own library. Relative amounts of individual components were performed on the basis of their GC peak areas without FID response factor correction, as previously reported [13,14].

## 2.3. Antifungal Activities

### 2.3.1. Pathogenic Fungal Strains

The fungal isolates, *Alternaria alternata*, *Aspergillus niger*, *Fusarium solani* and *Penicillium crustosum*, causing olive rot, have been isolated directly from fruit in orchards and maintained in potato dextrose agar (PDA, Sigma-Aldrich, USA) in a growth chamber at 23 °C for 14 days in the darkness. Each isolate was purified by a single spore isolation technique and identified based on cultural and morphological characteristics [15,16]. The conidia were obtained from the surface of the agar and suspended in 5 mL of sterile distilled water containing 0.1% v/v Tween 80. Spore suspensions were filtered through four layers of sterile cheesecloth to remove mycelial fragments. The number of spores was calculated with an automated cell counter (Bio-Rad's TC20), Cellometer Vision, and the spore concentration was adjusted to 1 x 10<sup>6</sup> spores/mL with the aid of a haemocytometer prior to use, as previously reported [14].

### 2.3.2. In-vitro Antifungal Assay

The method used was a modification of Tian et al. [17] which was based on a method published by Singh et al. [18]. Aliquots of essential oils dissolved separately in 0.5 ml of 10% (v/v) DMSO were pipetted aseptically to 9 cm glass Petri dishes containing 9.5 ml of molten PDA at a temperature between 45 and 50 °C to procure the requisite concentrations of essential oils (0.06, 0.12 and 0.5 mL/L). After homogenization using a vortex, the contents of the tubes were poured into petri dishes. The boxes were allowed dry for 15 to 20 minutes. A petri dish containing 10 mL of PDA medium without extract was used as a negative control. A mycelial disc of 9 mm of diameter, cut from the periphery of the 5-day pre-culture, was inoculated aseptically into the center of each Petri dish. All Petri dishes were sealed with sterile parafilm and incubated at 28 °C for 9 days. The effectiveness of the treatment was evaluated daily by measuring the average of the two perpendicular diameters of each colony. The percentage inhibition of growth of the two fungi tested, relative to the control, was calculated till the 9th day, using the following formula [19].

$$I\% = (DC - DT/DC) \times 100$$

where DC is the diameter of the mycelial growth of the negative control, DT is the average diameter of fungal colony of treatment. Tests were carried out in triplicate.

### 2.3.3. In-vivo Antifungal Assay

The *in-vivo* antifungal activity of the essential oil on wound-inoculated by *Aspergillus niger* and *Penicillium crustosum*, mainly responsible for diseases of ripe olives, was

carried out using the method of Tian *et al.* [17]. The olives were selected according to their maturity, uniformity and especially the absence of visible symptoms of rot on their surface. Using a cotton-bud,  $10^6$  spore/mL of the fungal inoculum prepared beforehand were scraped on the surfaces of the colonies and was resuspended in distilled water containing 0.5% Tween 80. For testing antifungal *in-vivo* activity against fungi, the essential oil was mixed vigorously with distilled water to obtain a concentration of 0.01 mL/L. 5 mL of the essential oil was sprayed separately on wounded olives. Control experiments were performed without any treatment. Tests were carried out in triplicate.

## 2.4. Insecticidal Activity

### 2.4.1. Rearing of Test Insects

*Bactrocera oleae* flies were caught with chamP traps containing a solution of 3% ammonium phosphate. Identification of flies was realized by Prof. Nassira Gaouar Benyelles (Laboratory of Ecology and Management of Natural Ecosystems of University of Tlemcen Algeria). The flies culture was maintained in the temperature and humidity-controlled chamber in darkness at a temperature of 26-27 °C and 80% relative humidity, as suggested by Kumar *et al.* [20].

### 2.4.2. Fumigation Toxicity of Essential Oil Against *Bactrocera oleae*

To determine the fumigant toxicity of essential oils, appropriate concentrations, viz., 2.0, 8.0 and 12  $\mu$ L essential oil were applied separately on the filter papers (Whatman No. 1,

2 cm diameter) without using any solvent, and the filter papers were attached to the under-surface of lids of plastic jars with 1 L volumes. The lids were screwed tightly on the jars containing separately 10 pupae, adults and L3 stage, all of the same age. These were kept at a temperature of 25-26 °C and 80-85% relative humidity. The control sets received no essential oil. Tests were carried out in triplicate.

Mortality was checked after 24 h from commencement of exposure. The percentage of insect mortality was calculated using the Abbott correction formula [21].

$$\text{Corrected mortality} = (\text{OMT} - \text{OMC}) / (100 - \text{CM}) \times 100$$

Were OMT: Observed mortality in treatment; OMC: Observed mortality in control; CM: Control mortality

$$\text{Percentage mortality} = (\text{Number of dead larvae} / \text{Number of larvae introduced}) \times 100$$

## 2.5. Statistical Analysis

Statistical analysis of variance (ANOVA) was performed using the SAS software and means were separated using the Least Significant Difference (LSD) test at  $P \leq 0.05$ .  $LC_{50}$  values were calculated using probit analysis. Analysis of each test was performed in triplicate.

## 3. RESULTS AND DISCUSSION

### 3.1. Chemical Composition of Essential

The chemical composition of essential oil is represented in the Table 1. The chemical components of essential oil

**Table 1. Chemical composition of *A. verticillata* essential oil.**

No. <sup>a</sup>	Compounds	RI <sub>n</sub> <sup>b</sup>	RI <sub>n</sub> <sup>c</sup>	RI <sub>p</sub> <sup>d</sup>	EO	Identification <sup>e</sup>
1	$\alpha$ -Pinene	931	932	1023	0,8	RI, MS
2	Sabinene	964	966	1118	0,2	RI, MS
3	Myrcene	976	982	1159	0,7	RI, MS
4	p-Cymene	1010	1012	1259	19,2	RI, MS
5	Limonene	1020	1021	1195	19,3	RI, MS
6	$\gamma$ -Terpinene	1047	1049	1237	11,1	RI, MS
7	Neo-Menthol	1156	1157	1637	tr	RI, MS
8	Terpinene-4-ol	1161	1162	1583	1,1	RI, MS
9	Carvacrol	1282	1278	2220	44,3	RI, MS
10	$\alpha$ -Humulene	1456	1456	1665	0,1	RI, MS
11	$\gamma$ -Muuroolene	1471	1469	1679	tr	RI, MS
	Identification %				96,8	
	Monoterpene hydrocarbons				32,1	
	Sesquiterpene hydrocarbons				0,1	
	Oxygenated monoterpenes				1,1	
	Aromatic compounds				63,5	

<sup>a</sup>Order of elution is given on apolar column (Rtx-1). <sup>b</sup>Retention indices of literature on the apolar column (RI<sub>n</sub>) reported from Konig *et al.* [34]. <sup>c</sup>Retention indices on the apolar Rtx-1 column (RI<sub>n</sub>). <sup>d</sup>Retention indices on the polar Rtx-Wax column (RI<sub>p</sub>). <sup>e</sup>RI: Retention Indices; MS: Mass Spectra in electronic impact mode.

isolated from the aerial parts of *A. verticillata* were analyzed by GC and GCMS. 11 compounds which accounted for 96.8% of the total oil were identified. All components were identified by comparison of their EI-MS and GC (RIs) with those of our laboratory-produced 'Aromes' library (Table 1). Among them, 9 monoterpenes and 2 sesquiterpenes were identified. The oil consisting of mainly aromatic compounds (63.5%), followed by monoterpene hydrocarbons (32.1%). The fraction of sesquiterpene hydrocarbons was only 0.1%. The main components were carvacrol (44,3%), limonene (19,3%), p-cymene (19,2%) and  $\gamma$ -terpinene (11.1%) (Table 1).

We note from this study, that sample of *A. verticillata* oil harvested from Beni Snous region was rich in monoterpene compounds such as carvacrol, limonene, p-cymene and  $\gamma$ -terpinene. This study agrees with the works of El Ouariachi et al. [22] who reported carvacrol to be the major component of *A. verticillata* essential oil.

### 3.2. In-vitro Test of the Essential Oil Against Plant Fungi

The effect of essential oil was evaluated against four fungal phytopathogens. Our results indicated that essential oil significantly inhibited fungal growth and exhibited a moderate to high antifungal activity against fungi (Fig. 1). In the presence of essential oil, the fungi tested showed significant sensitivity at a concentration of 0.5 mL/L, the inhibitory effects on the growth of *Alternaria alternata* (89 %), *Fusarium solani* (89 %), *Aspergillus niger* (68%) and *Penicillium crustosum* (50%) were observed (Table 2).

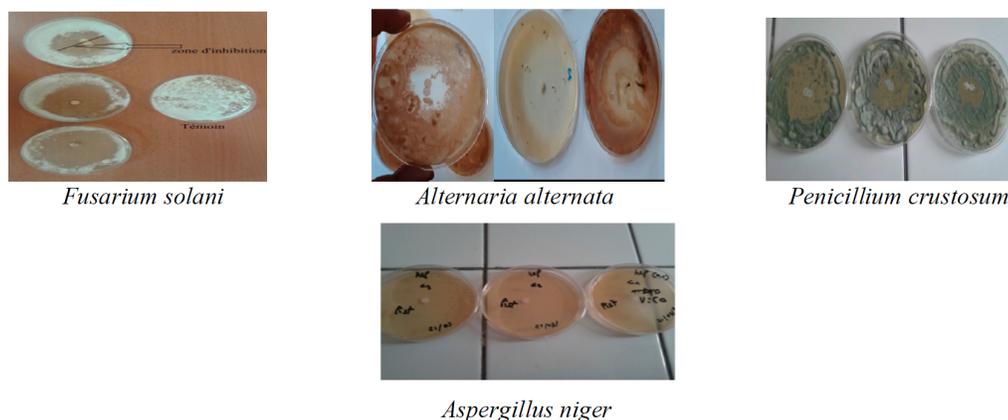


Fig. (1). Inhibitory effects on the growth of *Alternaria alternata*, *Fusarium solani*, *Aspergillus niger* and *Penicillium crustosum*.

Table 2. In vitro antifungal activities of essential oil against phytopathogenic fungi..

Microorganisms	Percentage of Inhibition (mean $\pm$ SE)		
	0.06	0.12	0.5
<i>Alternaria alternata</i>	26 $\pm$ 2,2 <sup>a</sup>	36 $\pm$ 2,4 <sup>a</sup>	89 $\pm$ 4,3 <sup>a</sup>
<i>Aspergillus niger</i>	06 $\pm$ 4,4 <sup>b</sup>	22 $\pm$ 2,3 <sup>b</sup>	68 $\pm$ 3,5 <sup>b</sup>
<i>Fusarium solani</i>	28 $\pm$ 3,3 <sup>a</sup>	44 $\pm$ 3,5 <sup>c</sup>	89 $\pm$ 2,3 <sup>a</sup>
<i>Penicillium crustosum</i>	08 $\pm$ 0,6 <sup>b</sup>	29 $\pm$ 1,5 <sup>ab</sup>	50 $\pm$ 2,5 <sup>c</sup>

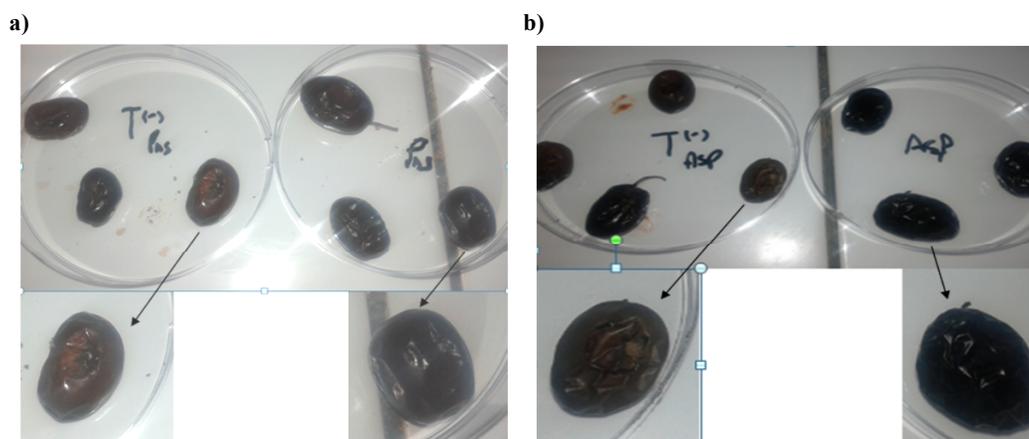
<sup>a-c</sup> Values are mean (n = 3)  $\pm$  standard deviations. Values followed by the same letter in each column are not significantly different in analysis of variance and Duncan's multiple range test (p < 0.05).

### 3.3. In-vivo Protection Effect of Essential Oil Against Olive Infection Caused by *Penicillium crustosum* and *Aspergillus niger*

*Penicillium* and *Aspergillus* species are responsible for diseases of ripe olives and known to produce mycotoxins responsible for many intoxications among consumer. For this purpose, essential oil was chosen to determine protective effect in ripe olive against infection caused by the both fungi [23] (Fig. 2). Unlike *in vitro* activity, the *in vivo* activity showed that disease severity caused by both fungi was totally eliminated (100%) by essential oil (Table 3).

According to Fig. (2) and Table 3, essential oil used with the lowest concentration of 0.01 mL/L, showed a very interesting protective (100%) effect on olives up to 15 days against *Penicillium crustosum* (Fig. 2a) and *Aspergillus niger* (Fig. 2b) compared with the controls, which were completely damaged from the 7<sup>th</sup> day. However, no incidence of the disease was observed during the 1st, 7<sup>th</sup>, 10<sup>th</sup> and 15<sup>th</sup> days for olives treated (Fig. 2, Table 3).

No information on the *in-vivo* and *in-vivo* antifungal properties of this oil is available in the literature. However, Attou et al. [24] studied antimicrobial activity of *A. verticillata* oil against five bacterial strains (*Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, and *Micrococcus luteus*), that showed a powerful antimicrobial activity [24]. Essential oil showed effective antifungal activity against all strains tested. The antifungal activity of this oil may be due to the presence of bioactive compounds such as carvacrol, limonene and p-cymene.



**Fig. (2).** Protective effect of *A. verticillata* essential oil (EO) on olives inoculated with *Penicillium crustosum* and *Aspergillus niger* after fifteen days of storage at  $24\pm 1^\circ\text{C}$ . (a) Olives treated with EO inoculated with *Penicillium crustosum* (right) and control (left) after 15 days of storage. (b) Olives treated with EO inoculated with *Aspergillus niger* (right) and control (left) after 15 days of storage.

**Table 3.** Effect of essential oil of *A. verticillata* on the protective of olives against the infection caused by *Aspergillus niger* and *Penicillium crustosum*.

Days <sup>a</sup>	Essential oil /PDI <sup>d</sup> (%)			
	Positive Control <sup>b</sup>	Protective effect		
		Positive Control <sup>c</sup>	<i>Aspergillus niger</i>	<i>Penicillium crustosum</i>
1 <sup>th</sup>	0.0 <sup>a</sup>	0.0±0.0 <sup>a</sup>	0.0±0.0 <sup>a</sup>	0.0±0.0 <sup>a</sup>
7 <sup>th</sup>	100±0.0 <sup>d</sup>	40±5.6 <sup>b</sup>	0.0±0.0 <sup>a</sup>	0.0±0.0 <sup>a</sup>
10 <sup>th</sup>	100±0.0 <sup>d</sup>	60±9.0 <sup>c</sup>	0.0±0.0 <sup>a</sup>	0.0±0.0 <sup>a</sup>
15 <sup>th</sup>	100±0.0 <sup>d</sup>	100±0.0 <sup>d</sup>	0.0±0.0 <sup>a</sup>	0.0±0.0 <sup>a</sup>

<sup>a</sup> Days of storage; <sup>b</sup> Positive control: olives were inoculated with *Aspergillus niger*; <sup>c</sup> Positive control: olives were inoculated with *Penicillium crustosum*.

<sup>d</sup> Percentage disease index (PDI). The means in a column followed by the same letter(s) represent values that are not significantly different ( $P \leq 0.05$ ).

It has been shown that carvacrol has antimicrobial action, especially against *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Candida albicans*, *Candida glabrata* and *Candida parapsilosis* [25, 26]. It has been proven that carvacrol to high doses reduced the growth of *Botrytis cinerea* in berry and grapes with 97% inhibition. Carvacrol can alter the cell membrane of fungi by affecting the function of cell membrane enzymes catalyzing the synthesis of cell wall polysaccharide compounds such as  $\beta$ -glucan and inhibiting cell growth [27].

P-cymene shows a range of biological activities which include anti-inflammatory, anxiolytic, anticancer and antimicrobial activities [28]. The p-cymene acts synergistically with the carvacrol causing the expansion of the membrane, resulting the destabilization of the bacterial membrane [29]. While, the results of laboratory bioassay showed that limonene has good antifungal effect against *Trichophyton rubrum*. On the other hand, in 2013, Aznar and colleagues [30] studied the antimicrobial activity of nisin, thymol, carvacrol and cymene against growth of *Candida lusitanae*. It has been shown that cymene was more effective than thymol and carvacrol. Generally, whole essential oils have greater

antifungal activity owing to a synergistic effect with some active components [30].

### 3.3. Fumigation Toxicity

The results on fumigation toxicity of *A. verticillata* oil against L3 stage, pupae and adults of *B. oleae* are summarized in Table 3. The efficacy of *A. verticillata* oil varied with its concentration. At the lowest concentration (2  $\mu\text{L/L}$  air), the essential oil caused 100% mortality of *B. oleae* adults after 24 h of exposure. At the highest concentration (12  $\mu\text{L/L}$  air), the oil caused 80, 80 and 100% mortality against L3 stage, pupae and adults of *B. oleae* after 24 h of exposure, respectively. The results of the insecticidal activity showed a clear correlation between oil concentration and percentage of mortality of test insects. 80 to 100% mortality was achieved at an oil concentration of 12  $\mu\text{L/L}$  air within 24 h. *A. verticillata* essential oil showed pronounced contact toxicity ( $\text{LC}_{50} < 2 \mu\text{L/L}$  air) to adult insect, as well as good fumigation toxicity for pupae ( $\text{LC}_{50}$  of 7.2  $\mu\text{L/L}$  air) and L3 stades ( $\text{LC}_{50}$  of 10.1  $\mu\text{L/L}$  air).

This activity is related mainly to the majority compounds. Limonene has been studied and applied as a botanical insecticide [31]. Carvacrol has been shown potent insect-

**Table 4. Insecticidal activity of essential oil after 24h of exposure.**

Concentrations ( $\mu\text{L/L}$ air)	% Mortality		
	<i>L3</i>	<i>Pupae</i>	<i>Adults</i>
2.0	17 $\pm$ 0.1 <sup>a</sup>	17 $\pm$ 0.2 <sup>a</sup>	100 $\pm$ 00 <sup>a</sup>
8.0	19 $\pm$ 0.6 <sup>a</sup>	30,0 $\pm$ 1.1 <sup>b</sup>	100 $\pm$ 00 <sup>a</sup>
12.0	80 $\pm$ 0.1 <sup>b</sup>	80 $\pm$ 00 <sup>c</sup>	100 $\pm$ 00 <sup>a</sup>
LC <sub>50</sub>	10.1	7.2	<< 2

<sup>a-c</sup> Values are mean (n = 3)  $\pm$  standard deviations. Values followed by the same letter in each column are not significantly different in analysis of variance and Duncan's multiple range test (p < 0.05).

ticidal and acaricidal activity with a broad spectrum against agricultural, stored-product, and arthropod pests. It showed displaying strong and selective activity against *Alphitobius diaperinus* Panzer, a cosmopolitan pest insect of stored food grain products such as flour, and of poultry-rearing facilities [32]. Furthermore, the magnitude of the insecticidal activity can be related to the effect caused by the interaction of all constituents present in the oil [14].

Indeed, terpenes has been shown to have significant toxicity against a panel of insect pests [33]. The mode of action of these compounds has not been fully elucidated. However, according to Khanikor et al. [33], terpenic compounds are neurotoxic and moderate the toxic action of different species of *Aedes* by acting on the acetylcholinesterase and the octopaminergic system.

## CONCLUSION

In conclusion, we aimed as part of our program to evaluate antifungal and insecticidal proprieties of *A. verticillata* essential oil, in hopes to find new biocidal products to fight olive tree fungi and pests. The results confirm that *A. verticillata* is a good source of aromatic compounds. The essential oil presented high antifungal activity against *Alternaria alternata* and *Fusarium solani*, followed by *Aspergillus niger* and *Penicillium crustosum*. The results of the present study suggest that essential oil from aerial parts of *A. verticillata* has very interesting protective effect *in-vivo* against *Penicillium crustosum* and *Aspergillus niger*, responsible for rot of ripe olives. Furthermore, essential oil has demonstrated promising insecticidal activity against devastating pest *Bactrocera oleae*. However, the possibility of developing a biocidal product from essential oil of *A. verticillata* for use in olives tree protection may be an attractive adventure.

## ETHICS APPROVAL AND CONSENT TO PARTICIPATE

Not applicable.

## HUMAN AND ANIMAL RIGHTS

No Animals/Humans were used for studies that are base of this research.

## CONSENT FOR PUBLICATION

Not applicable.

## AVAILABILITY OF DATA AND MATERIALS

Not applicable.

## FUNDING

None.

## CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest, financial or otherwise.

## ACKNOWLEDGEMENTS

The authors are indebted to the Ministère des Affaires Étrangères et Européennes throughout the 'Partenariat Hubert Curien Tassili' research program.

## REFERENCES

- [1] Soylu EM, Kurt S, Soylu S. In vitro and in vivo antifungal activities of the essential oils of various plants against tomato grey mould disease agent *Botrytis cinerea*. Int J Food Microbiol 2010; 143(3): 183-9. [http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2010.08.015]-[PMID: 20826038]
- [2] Poutiers R. Les Insectes de l'Olivier. J Agric Tradit Bot Appl 1925; 44: 257-65.
- [3] Heteroptera as Vectors of Plant Neotrop Entomol 2004; 33(5): 519-45. [http://dx.doi.org/10.1590/S1519-566X2004000500001]
- [4] Carter W. Insects in relation to plant disease. 2nd ed. New York: Wiley 1973; p. 759.
- [5] McGraw EA, O'Neill SL. Beyond insecticides: new thinking on an ancient problem. Nat Rev Microbiol 2013; 11(3): 181-93. [http://dx.doi.org/10.1038/nrmicro2968]-[PMID: 23411863]
- [6] Agrawal A, Pandey RS, Sharma B. Water pollution with special reference to pesticide contamination in India. J Water Resource Prot 2010; 2(5): 432-48. [http://dx.doi.org/10.4236/jwarp.2010.25050]
- [7] Sanborn M, Kerr KJ, Sanin LH, Cole DC, Bassil KL, Vakil C. Non-cancer health effects of pesticides: systematic review and implications for family doctors. Can Fam Physician 2007; 53(10): 1712-20. [PMID: 17934035]
- [8] Damalas CA. Understanding benefits and risks of pesticide use. Sci Res Essays 2009; 4: 945-9.
- [9] Asghari-Marjanlo A, Mostofi Y, Shoeibi SH, Fattahi M. Effect of cumin essential oil on postharvest decay and some quality factors of strawberry. J Med Plant 2009; 8: 25-43.
- [10] Feng W, Zheng XD. Essential oils to control *Alternaria alternata* in vitro and in vivo. Food Control 2007; 18: 1126-30. [http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2006.05.017]

- [11] Fang XL, Li ZZ, Wang YH, Zhang X. In vitro and in vivo antimicrobial activity of *Xenorhabdus bovienii* YL002 against *Phytophthora capsici* and *Botrytis cinerea*. *J Appl Microbiol* 2011; 111(1): 145-54. [http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2672.2011.05033.x]-[PMID: 21554568]
- [12] Ziyat A, Legssyer A, Mekhfi H, Dassouli A, Serhrouchni M, Benjelloun W. Phytotherapy of hypertension and diabetes in oriental Morocco. *J Ethnopharmacol* 1997; 58(1): 45-54. [http://dx.doi.org/10.1016/S0378-8741(97)00077-9]-[PMID: 9324004]
- [13] Muselli A, Desjobert JM, Paolini J, Bernardini AF, Costa J. Chemical Composition of the Essential Oils of *Teucrium chamaedrys* L. from Corsica and Sardinia. *J Essent Oil Res* 2009; 21: 138-42. [http://dx.doi.org/10.1080/10412905.2009.9700133]
- [14] Belabbes R, Dib MEA, Djabou N, *et al.* Chemical Variability, Antioxidant and Antifungal Activities of Essential Oils and Hydrosol Extract of *Calendula arvensis* L. from Western Algeria. *Chem Biodivers* 2017; 14(5)e1600482 [http://dx.doi.org/10.1002/cbdv.201600482]-[PMID: 28109063]
- [15] Barnett HL, Hunter BB. Illustrated genera of imperfect fungi. 4th ed. St. Paul, Minnesota: The American Phytopathological Society 2006.
- [16] Samson RA, Hoekstra ES, Frisvad JC. Introduction to Food and Airborne Fungi. 7th Ed., Utrecht: Centraal bureau voor Schimmelcultures 2001.
- [17] Tian J, Ban X, Zeng H, He J, Huang B, Wang Y. Chemical composition and antifungal activity of essential oil from *Cicuta virosa* L. var. *latisecta* Celak. *Int J Food Microbiol* 2011; 145(2-3): 464-70. [http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2011.01.023]-[PMID: 21320730]
- [18] Singh P, Srivastava B, Kumar A, Kumar R, Dubey NK, Gupta R. Assessment of *Pelargonium graveolens* oil as plant-based antimicrobial and aflatoxin suppressor in food preservation. *J Sci Food Agric* 2008; 88: 2421-5. [http://dx.doi.org/10.1002/jsfa.3342]
- [19] De Lucca AJ, Pauli A, Schilcher H, Sien T, Bhatnagar D, Walsh TJ. Fungicidal and Bactericidal Properties of Bisabolol and Dragosantol. *J Essent Oil Res* 2011; 23: 47-54. [http://dx.doi.org/10.1080/10412905.2011.9700457]
- [20] Kumar P, Mishra S, Malik A, Satya S. Biocontrol potential of essential oil monoterpenes against housefly, *Musca domestica* (Diptera: Muscidae). *Ecotoxicol Environ Saf* 2014; 100: 1-6. [http://dx.doi.org/10.1016/j.ecoenv.2013.11.013]-[PMID: 24433784]
- [21] Abbott WS. A Method for computing the effectiveness of an insecticide. *J Econ Entomol* 1925; 18: 265-7. [http://dx.doi.org/10.1093/jee/18.2.265a]
- [22] El Ouariachi M, Tomi P, Bouyanzer A, *et al.* Chemical composition and antioxidant activity of essential oils and solvent extracts of *Ptychotis verticillata* from Morocco. *Food Chem Toxicol* 2011; 49(2): 533-6. [http://dx.doi.org/10.1016/j.fct.2010.11.019]-[PMID: 21093522]
- [23] Chliyah M, Rhimini Y, Selmaoui K, *et al.* Survey of the Fungal Species Associated to Olive-tree (*Olea europaea* L.) in Morocco. *Int J Rec Biotech* 2014; 2(2): 15-32.
- [24] Attou A, Davenne D, Benmansour A, Lazouni HA. Chemical Composition and Biological Activities of *Ammoides verticillata* Essential Oil from West Algeria. *Phytotherapie* 2017. [http://dx.doi.org/10.1007/s10298-017-1108-1]
- [25] Rattanachaikunsopon P, Phumkhachorn P. Assessment of factors influencing antimicrobial activity of carvacrol and cymene against *Vibrio cholerae* in food. *J Biosci Bioeng* 2010; 110(5): 614-9. [http://dx.doi.org/10.1016/j.jbiosc.2010.06.010]-[PMID: 20638331]
- [26] Dalleau S, Cateau E, Bergès T, Berjeaud JM, Imbert C. In vitro activity of terpenes against *Candida* biofilms. *Int J Antimicrob Agents* 2008; 31(6): 572-6. [http://dx.doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2008.01.028]-[PMID: 18440786]
- [27] Martínez-Romero D, Guillén F, Valverde JM, *et al.* Influence of carvacrol on survival of *Botrytis cinerea* inoculated in table grapes. *Int J Food Microbiol* 2007; 115(2): 144-8. [http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2006.10.015]-[PMID: 17141907]
- [28] Chee HY, Kim H, Lee MH. In vitro Antifungal Activity of Limonene against *Trichophyton rubrum*. *Mycobiology* 2009; 37(3): 243-6. [http://dx.doi.org/10.4489/MYCO.2009.37.3.243]-[PMID: 23983542]
- [29] Ultee A, Bennis MHJ, Moezelaar R. The phenolic hydroxyl group of carvacrol is essential for action against the food-borne pathogen *Bacillus cereus*. *Appl Environ Microbiol* 2002; 68(4): 1561-8. [http://dx.doi.org/10.1128/AEM.68.4.1561-1568.2002]-[PMID: 11916669]
- [30] Aznar A, Fernández PS, Periago PM, Palop A. Antimicrobial activity of nisin, thymol, carvacrol and cymene against growth of *Candida lusitanae*. *Food Sci Technol Int* 2015; 21(1): 72-9. [http://dx.doi.org/10.1177/1082013213514593]-[PMID: 24293188]
- [31] Sfara V, Zerba EN, Alzogaray RA. Fumigant insecticidal activity and repellent effect of five essential oils and seven monoterpenes on first-instar nymphs of *Rhodnius prolixus*. *J Med Entomol* 2009; 46(3): 511-5. [http://dx.doi.org/10.1603/033.046.0315]-[PMID: 19496421]
- [32] Ahn YJ, Lee SB, Lee HS, Kim GH. Insecticidal and acaricidal activity of carvacrol and  $\beta$ -thujaplicine derived from *Thujopsis dolabrata* var. *hondai* Sawdust. *J Chem Ecol* 1998; 24(1): 81-90. [http://dx.doi.org/10.1023/A:1022388829078]
- [33] Khanikar B, Parida P, Yadav RNS, Bora D. Comparative mode of action of some terpene compounds against octopamine receptor and acetyl cholinesterase of mosquito and human system by the help of homology modeling and Docking studies. *J Appl Pharm Sci* 2013; 3(02): 006-12.
- [34] König WA, Hochmuth DH, Joulain D. Terpenoids and related constituents of essential oils library of mass finder 21 Ed. Hamburg.: Institute of Organic Chemistry 2001.

DISCLAIMER: The above article has been published in Epub (ahead of print) on the basis of the materials provided by the author. The Editorial Department reserves the right to make minor modifications for further improvement of the manuscript.

## RESEARCH ARTICLE

# Chemical Composition and Combinatory Antifungal Activities of *Ammoides Verticillata*, *Allium Sativum* and *Curcuma Longa* Essential Oils Against Four Fungi Responsible for Tomato Diseases

Hanane Senouci<sup>1</sup>, Nassira Gaouar Benyelles<sup>1</sup>, Mohammed El Amine Dib<sup>2,\*</sup>, Jean Costa<sup>3</sup> and Alain Muselli<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Laboratoire d'Ecologie et Gestion des Ecosystèmes Naturels, Université de Tlemcen, BP 119, 13000, Algérie;

<sup>2</sup>Laboratoire des Substances Naturelles et Bioactives (LASNABIO), Département de Chimie, Faculté des Sciences, Université Aboubekr Belkaïd, Tlemcen, Algérie; <sup>3</sup>Laboratoire Chimie des Produits Naturels, UMR CNRS 6134 SPE, Campus Grimaldi, BP 52, 20250 Corté, France

**Abstract: Background:** Tomato is considered a model plant in genetics and is one of the most economically important crops of all those that exist in the world. Several species of fungi are reported on tomato fruit, causing damage both during cultivation and after harvest. Some of the appropriate actions that could be initiated to resolve the problem are to develop and search for new antimicrobial substances isolated from the bioactive natural products, such as essential oils.

**Aim and Objective:** The aim of this work was to determine the chemical composition of essential oils of *Ammoides verticillata*, *Allium sativum* and *Curcuma longa*, to evaluate their *in-vitro* antifungal activities and *in-vivo* antifungal effect of essential oils to prevent the diseases caused by tomato.

## ARTICLE HISTORY

Received: November 05, 2019  
Revised: January 15, 2020  
Accepted: January 24, 2020

DOI:  
[10.2174/1386207323666200219123214](https://doi.org/10.2174/1386207323666200219123214)

**Materials and Methods:** The essential oils obtained from aerial parts of plants were analyzed by GC/MS and tested for their antifungal activities against *Penicillium expansum*, *Fusarium solani*, *Rhizopus stolonifer* and *Alternaria alternata* using the radial growth technique method. The effectiveness *in-vivo* of the association between *Allium sativum* and *Curcuma longa* essential oils was also investigated on tomatoes inoculated by fungi.

**Results:** The essential oil from *A. verticillata* was mainly composed of phenolic compounds (54.4%), the *A. sativum* oil was mainly composed of sulfur compounds (91.5%) and *C. longa* oil was dominated by oxygenated monoterpenes (82.0%). The obtained results *in-vitro* antifungal revealed that individual essential oils of *A. verticillata* and *A. sativum* were more active than the essential oil of *C. longa* against all screened microorganisms. An important antifungal effect of *A. sativum* and *C. longa* essential oils blend was obtained against *P. expansum* (100%), *F. solani* (95.2%), *R. stolonifer* (95.1%) and *A. alternata* (48.5%). Furthermore, *A. sativum* and *C. longa* essential oils blends have demonstrated promising *in-vivo* antifungal activity to control infection of tomato against *P. expansum* and *R. stolonifer*.

**Conclusion:** *A. sativum* and *C. longa* essential oil blends can be used as a natural food preservative and alternative to chemical fungicides to protect stored tomato against many phytopathogens.

**Keywords:** Essential oils blend, Natural antifungals, Tomato diseases, Fungus, *In-vitro* activities, *In-vivo* activities.

## 1. INTRODUCTION

Market gardening has, in recent decades, become an alternative business and generally offers a viable market in microeconomics. However, the production of these vegetables is limited by multiple abiotic and biotic

constraints that affect yields and post-harvest operations [1]. The highly perishable fresh fruits as tomatoes are generally exposed to fungal and bacterial infections that are responsible for post-harvest losses. Synthetic fungicides are commonly used to protect post-harvest crops. The misuse of these pesticides generated new diseases such as disorders of the nervous system, encephalopathies in children, and the proliferation of gastric and renal tumors in adults [2]. The use of a fungicide is an ancestral practice in Africa. Indeed, many plants are known and used for their biocidal activities

\*Address correspondence to this author at the Laboratoire des Substances Naturelles et Bioactives (LASNABIO), Université de Tlemcen, BP 119, 13000, Algérie; Tel/Fax: 0021343411189; E-mail: [a\\_dibdz@yahoo.fr](mailto:a_dibdz@yahoo.fr)

against a wide range of pests [3]. They can be used as foliar plant extracts [4, 5] alone or in combination with other crops [6, 7]. Essential oils have a very wide spectrum of action since they inhibit the growth of bacteria as well as those of fungi and yeasts.

The studies conducted at the laboratories showed that *Ocimum gratissimum* inhibits spore germination and mycelial growth of *Fusarium oxysporum* and *Pythium sp.* with a relatively similar effect to that of synthetic fungicides [8]. In addition, it has been shown that the essential oil of *Xylopiya aethiopica* fruit strongly inhibited mycelial growth of *Sclerotium rolfisii*, resulting in a considerable reduction in the incidence of disease on treated tomato plants compared to untreated plants [9].

*Curcuma longa* is particularly present in the socio-cultural life of people, where it is considered as an exceptional plant compared to its many properties (spice, food preservative, coloring agent, cosmetic and medicinal). The essential oil of *Curcuma longa* has been reported to have toxic activities against *Aspergillus flavus* involved in the deterioration of agricultural products [10]. In addition, the principal component of turmeric essential oil, the purified ar-turmerone, showed antifungal activity similar to the crude oil against three *Aspergillus* species, *Fusarium semitectum*, *Colletotrichum musae* and *Colletotrichum gloesporioides* [11]. Kim et al. (2003) reported good *in-vitro* and *in-vivo* fungicidal properties of curcumin isolated from rhizomes [12].

*Allium sativum* is a very old traditional remedy; garlic treated all kinds of diseases. It was also used to heal wounds and infections [13]. The antibacterial and antifungal activities against a variety of fungi were extensively investigated. Benkeblia et al. [14] reported that the essential oil of *Allium sativum* exhibited marked antibacterial activity.

*Aspergillus niger* and *Penicillium cyclopium* were significantly inhibited particularly at 50 ml/l concentration [14].

*Ammoides verticillata* is used for the treatment of gastrointestinal disorders, lack of appetite and bronchial problems. Many properties have been reported: fungicidal, antimicrobial, antiviral and anti-aggregative effects on human beings [15, 16]. Senouci et al. [17] reported that essential oil of *Ammoides verticillata* has demonstrated promising *in vitro* and *in-vivo* antifungal activity to control infections of olives caused by *Aspergillus niger* and *Penicillium crustosum*. The *in vitro* antifungal activity of a combination of some essential oils extracted from the herbs such as *Thymus vulgaris*, *Salvia officinalis*, *Eucalyptus globulus* and *Mentha piperita* against some filamentous fungal strains *Metrhizium sp.*, *Ophiostoma sp.*, *Trichoderma sp.* and *Enicillium expansum* was determined. The results demonstrated that combined essential oils is very active against filamentous fungi tested. Some other studies have concluded that combinations essential oils have greater antimicrobial activity than their individual components [18, 19]. Although the antifungal properties of *Curcuma longa*, *Allium sativum* and *Ammoides verticillata* essential oils have been reported, to our best knowledge, data on comparisons of antifungal activity of their essential oils combined, are not reported. This work is a part of our continuing program

aiming isolating extracts that might control fungal diseases. The main objective of this study were to asses the chemical composition of essential oils of these three plants, their *in-vitro* activity against *P. expansum*, *F. solani* *R. stolonifer* and *A. alternata*, and the potential *in-vivo* activity of oils blends against fungi.

## 2. MATERIALS AND METHOD

### 2.1. Plant Material and Essential Oils Extraction

*A. verticillata* (Aerial parts) and *A. sativum* (Cloves) were collected in Western Algeria during flowering (May–July). *C. longa* was purchased from an herbalist. Voucher specimens were deposited in the herbarium of the University of Tlemcen. *A. verticillata* (A.V on.05/2018) and *A. sativum* (A.S. 07.2018). Essential oils were obtained by hydrodistillation for 5 h using a Clevenger-type apparatus according to the European Pharmacopoeia [20] and yielded (w/w) 2.6% from *A. verticillata*, 0.2% from *A. sativum* and 1.2% from *C. longa*.

### 2.2. Analysis Conditions

#### 2.2.1. Gas Chromatography

Analyses were carried out using a Perkin Elmer Clarus 600 GC apparatus equipped with a dual-flame ionization detection system and two fused-silica capillary columns (60 m x 0.22 mm I.D., film thickness 0.25  $\mu\text{m}$ ), Rtx-1 (polydimethylsiloxane) and Rtx-Wax (poly-ethyleneglycol). The oven temperature was programmed from 60°C to 230°C at 2°C/min and then held isothermally at 230°C for 35 min. The injector and detector temperatures were maintained at 280°C. The essential oils were injected in the split mode (1/50), using hydrogen as the carrier gas (0.7 mL min<sup>-1</sup>); the injection volume was 0.2  $\mu\text{L}$ . The retention indices (RI) of the compounds were determined from Perkin-Elmer software.

#### 2.2.2. Gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS)

Essential oils were analyzed using a Perkin Elmer Turbo mass detector (quadrupole) coupled to a Perkin Elmer Autosystem XL equipped with Rtx-1 fused silica capillary columns and Rtx-Wax (poly-ethyleneglycol), (ion source temperature, 150°C; ionization energy, 70 eV). Ionization energy MS was acquired over a mass range of 35-350 Da (scan time, 1 s). Other GC conditions were the same as described for GC, except the split was 1/80.

#### 2.2.3. Component Identification and Quantification

Identification of individual components was accomplished by comparing their GC retention indices (RIs) on nonpolar and polar columns, determined relative to the retention time of a series of n-alkanes with linear interpolation, with those of authentic compounds or literature data [21, 22] and through computer matching with commercial mass spectral libraries [23, 24] and also by comparing the spectra obtained with those of the in-house laboratory library. The quantification of Eos and hydrosol

extract components was performed using peak normalization (%) abundances calculated by integrating FID response factors relative to tridecane (0.7 g/100 g), used as an internal standard.

## 2.3. Antifungal Activities

### 2.3.1. Pathogenic Fungal Strains

*Alternaria alternata*, *Penicillium expansum*, *Fusarium solani* and *Rhizopus stolonifer* were isolated from naturally decayed tomato after storage of several weeks. These isolates were the most aggressive ones in our collection and produced the largest lesions on fruit. A pure culture of these fungi was maintained on potato dextrose agar medium (PDA: potato 200, dextrose 20 g and agar 15 g/L in distilled water at 25°C) in the presence of a quantity of lactic acid (25%) to stop the growth of bacteria. The plates were incubated at 25±2°C for 8 days and darkness.

The spores were obtained from the surface of the agar and suspended in 5 mL of sterile distilled water containing 0.1% v/v Tween 80. Spore suspensions were filtered through four layers of sterile cheesecloth to remove mycelial fragments. In parallel, an inoculum was prepared and quantified at 1×10<sup>6</sup> spores/mL using a hemacytometer (Bio-Rad's TC20), Cellometer Vision, as previously reported [25]. The fungal morphology was studied macroscopically by observing the colony features (color, shape, size and hyphae), and microscopically using a lactophenol cotton blue-stained slide mounted with a small portion of the mycelium [26, 27].

### 2.3.2. In-vitro Antifungal Assay

Antifungal activity of the essential oils and their blends was tested against the aforementioned strains. The method used was of Tian *et al.* [28] with a small modification (Tween-20 has been replaced by DMSO), which was based on a method published by Singh *et al.* [29]. Aliquots of essential oils dissolved separately in 0.5 ml of 10% (v/v) DMSO were pipetted aseptically to 9 cm glass Petri dishes containing 9.5 ml of molten PDA to procure the requisite concentrations (100 to 400 µL/L). In regards to essential oils blends, a ratio of 1: 1: 1 by volume was mixed for each combination and a series of concentrations ranging from 100 to 400 µL/L were prepared. The fungicide used in this study was "Artea 330EC". It is a versatile systemic foliar fungicide from the triazole chemical family. Concentrations ranging from 100 to 600 µL / L were prepared. A mycelial disc of 9 mm of diameter, cut from the periphery of the 5-day pre-culture, was inoculated aseptically into the center of each Petri dish. All Petri dishes were sealed with sterile parafilm and incubated at 28°C for 9 days. The effectiveness of the treatment was evaluated daily by measuring the average of the two perpendicular diameters of each colony. The percentage inhibition of growth of the four fungi tested, relative to the control, was calculated on the 9th day, using the following formula [30].

$$DI(\%) = \frac{TN}{N} \times 100$$

where, = TNI: Total number of infected tomatoes and *N* = total number of tomatoes assessed.

### 2.3.3. In-vivo Antifungal Assay

The *in-vivo* antifungal activity of the essential oils and their blends on wound-inoculated tomatoes was carried out using the method of Belabbes *et al.* [25]. Tomatoes were selected according to their maturity, uniformity and especially the absence of visible symptoms of rot on their surface. Using a cotton-bud, 10<sup>6</sup> spore/mL of the fungal inoculum prepared beforehand, was scrapped on the surfaces of the colonies and was resuspended in distilled water containing 0.5% Tween 80. Filter papers of 4 cm of diameter were impregnated of 20 mg of essential oils and placed into polystyrene containers (1L) (without any solvent) to reach a final concentration of 20 µL/L air. Control experiments were performed without any treatment. All the containers were then stored at 25 ± 1°C for ten days with humidity of 60%. The experiments were carried out three times. The percentage disease index of infection on the tomatoes fruits was determined using the formula:

$$DI(\%) = \frac{TNI}{N} \times 100$$

where, = TNI: Total number of infected tomatoes and *N* = total number of tomatoes assessed.

## 2.4. Statistical Analysis

Statistical analysis of variance (ANOVA) was performed using the SAS software and means were separated using the Least Significant Difference (LSD) test at *P* ≤ 0.05. Analysis of each test was performed in triplicate.

## 3. RESULTS AND DISCUSSION

### 3.1. Chemical Composition of Essential Oils

The essential oils obtained from three plants by the hydrodistillation method were analyzed using gas chromatography (GC) and gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) techniques. The chemical composition of the essential oils was given in Table 1. Twelve components accounting for 92.4% were identified in the essential oil of *A. verticillata* (Table 1). The essential oil was mainly represented by oxygenated monoterpenes (59.4%), followed by monoterpene hydrocarbons (39.0%). The major components were carvacrol (33.2%), limonene (28.1%) and p-cymene (25.2%). The comparison of our results with other reports indicated that *A. verticillata* essential oil presented thymol [31] and carvacrol chemotypes [32]. Bekhechi *et al.* [15] isolated and identified by GC-MS, fourteen components, the major constituents of the flowering stage were isothymol, whereas in other cases, thymol was predominant. The essential oil of *A. sativum* was represented only by sulfur compounds with a percentage of 91.5%. The major components were diallyl trisulfide (31.5%), diallyl disulfide (29.8%) and allyl methyl trisulfide (16.8%). The oil composition from our study shows quantitative similarities from previously published reports on garlic oil. Generally, in the previous works found diallyl disulfide (27.1-46.8%) and diallyl trisulfide (19.9-34.1%) to be the dominant components, followed by allyl methyl trisulfide (8.3-18.2%), and allyl methyl disulfide (4.4-12.0%) [33-37]. For example, the major components of Serbian garlic essential oil were diallyl trisulfide (33.6%), diallyl disulfide (28.1%), and

**Table 1.** Chemical composition of essential oils.

No. <sup>a</sup>	Compounds	IR <sub>a</sub> <sup>b</sup>	IR <sub>a</sub> <sup>c</sup>	Percentages			Identification <sup>d</sup>
				<i>A. verticillata</i>	<i>A. sativum</i>	<i>C. longa</i>	
1	Diallyl disulfide	846	847	-	3,9	-	RI, MS
2	Allyl methyl disulfide	908	906	-	4,4	-	RI, MS
3	Methyl trans-propenyl disulfide	926	1536	-	0,8	-	RI, MS
4	$\alpha$ -Thujene	932	925	0,1	-	-	RI, MS
5	$\alpha$ -Pinene	931	932	0,6	-	-	RI, MS
6	Dimethyl trisulfide	948	953	-	2,2	-	RI, MS
7	Sabinene	964	966	0,1	-	-	RI, MS
8	Myrcene	976	982	0,5	-	-	RI, MS
9	p-Cymene	1010	1012	25,2	-	-	RI, MS
10	Limonene	1020	1021	28,1	-	-	RI, MS
11	$\gamma$ -Terpinene	1047	1049	9,6	-	-	RI, MS
12	Terpinen-4-ol	1161	1162	0,8	-	-	RI, MS
13	Diallyl disulfide	1079	1070	-	29,8	-	RI, MS
14	Allyl methyl trisulfide	1126	1119	-	16,8	-	RI, MS
15	1,4-Dimethyltetrasulfide	1238	1240	-	0,5	-	RI, MS
16	Thymol	1266	1269	0,2	-	-	RI, MS
17	Carvacrol	1282	1278	33,2	-	-	RI, MS
18	Diallyl trisulfide	1288	1278	-	31,5	-	RI, MS
19	$\alpha$ -Humulene	1456	1456	0,1	-	-	RI, MS
20	$\gamma$ -Muuroleone	1471	1469	0,2	-	-	RI, MS
21	Diallyl tetrasulfide	1482	1509	-	1,6	-	RI, MS
22	$\beta$ -Sesquiphellandrene	1516	1517	-	-	10,5	RI, MS
23	trans-Caryophyllene	1521	1518	-	-	0,3	RI, MS
24	(E)- $\alpha$ -Bisabolene	1532	1536	-	-	0,3	RI, MS
25	cis-Hydrate sesquisabinene	1565	1564	-	-	2,1	RI, MS
26	Germacrene-B	1553	1559	-	-	1,1	RI, MS
27	trans-Sabinene hydrate	1565	1562	-	-	0,4	RI, MS
28	Caryophyllene oxide	1576	1578	-	-	2,1	RI, MS
29	Zingiberenol 1	1599	1599	-	-	0,9	RI, MS
30	Zingiberenol 2	1613	1614	-	-	2,8	RI, MS
31	$\alpha$ -Turmerone	1639	1642	-	-	32,1	RI, MS
32	$\alpha$ -Turmerone	1649	1656	-	-	24,5	RI, MS
33	$\beta$ -Bisabolol	1653	1660	-	-	0,4	RI, MS
34	$\beta$ -Turmerone	1680	1685	-	-	15,6	RI, MS
Identification %				98,7	91,5	93,1	
Monoterpene hydrocarbons				39,0	-	-	
Oxygenated monoterpenes				59,4	-	-	
Oxygenated sesquiterpenes				-	-	82,0	
Sesquiterpene hydrocarbons				0,3	-	11,1	
Sulfur compounds				-	91,5	-	

<sup>a</sup> Order of elution is given on apolar column (Rtx-1). <sup>b</sup> Retention indices of literature on the apolar column (IRI<sub>a</sub>). <sup>c</sup> Retention indices on the apolar Rtx-1 column (RI<sub>a</sub>). <sup>d</sup> RI: Retention Indices; MS: Mass Spectra in electronic impact mode.

Table 2. Antifungal activity of individual essential oils.

Microorganisms	Percentages of Inhibitions (%)									Artea 330EC (µL/L)
	<i>A. verticillata</i>			<i>A. sativum</i>			<i>C. longa</i>			
Concentrations µL/L	100	200	400	100	200	400	100	200	400	100% Inhibition
<i>P. expansum</i>	69,3 ± 3.2	90,7 ± 2.2	100 ± 00	46,3 ± 1.5	60,3 ± 3.2	97,4 ± 3.2	24,1 ± 3.2	35,2 ± 1.8	59,2 ± 0.2	512
<i>F. solani</i>	35,9 ± 2.6	45,9 ± 5.6	97,4 ± 1.4	10,4 ± 0.9	30,0 ± 0.4	79,2 ± 2.1	11,1 ± 0.9	21,5 ± 0.8	32,6 ± 0.8	452
<i>R. stolonifer</i>	24,1 ± 1.2	36,3 ± 4.1	71,5 ± 2.7	23,3 ± 2.1	45,5 ± 1.6	73,3 ± 5.1	6,3 ± 0.5	10,0 ± 0.2	17,7 ± 1.7	> 600
<i>A. alternata</i>	11,2 ± 0.9	25,2 ± 4.2	37,1 ± 6.4	00 ± 00	06,3 ± 0.5	12,1 ± 3.1	00 ± 00	00 ± 00	00 ± 00	425

allyl methyl trisulfide (17.8%) [35]. The French garlic oil is composed of diallyl disulfide (37.9%), diallyl trisulfide (28.1%) and allyl methyl trisulfide (7.3%), diallyl sulfide (6.6%), diallyl tetrasulfide (4.1%) and allyl methyl disulfide (3.7%) [37]... etc. The chemical composition of essential oil of *C. longa* were characterized principally by oxygenated monoterpenes such as Ar-turmerone (32.1%),  $\alpha$ -turmerone (24.5%) and  $\beta$ -turmerone (15.6%). Our study demonstrated that the main components of the *C. longa* essential oil were ar-turmerone,  $\alpha$ -turmerone and  $\beta$ -turmerone. These results agree with those obtained previously [38-41].

### 3.2. In-vitro Antifungal Activity of Individual and Combined Essential Oils

The antifungal activity of essential oils was evaluated against four microorganisms (*P. expansum*, *F. solani*, *R. stolonifer* and *A. alternata*); their potencies were assessed by the presence or absence of the inhibition percentages. The results obtained from Tables 2 show that percentages of inhibition of mycelial growth increased with the increasing concentration of essential oils for all strains tested. The essential oils of *A. verticillata* and *A. sativum* showed very good antifungal activity against *P. expansum*, *F. solani* and *R. stolonifer* compared to the reference fungicide Artea 330EC. At the concentration of 400 µL/L, the strains of *P. expansum* (100% and 97.4%), *F. solani* (97.4% and 79.2%) and *R. stolonifer* (71.5% and 73.3%) were more sensitive to essential oils of *A. verticillata* and *A. sativum*, respectively. However, *A. alternata* was less sensitive, with percentages of inhibition of 57.1% and 22.1%, respectively. However, no activity against *A. alternata* was observed with essential oils of *A. sativum* and *C. longa* (Table 2).

The antifungal activity of the essential oil blends examined in this study is presented in Table 3. Among these blends, the combined essential oils of *A. sativum* and *C. longa* showed the best activity with greater effects against *P. expansum* (100%), *F. solani* (95.2%), *R. stolonifer* (95.1%) and *A. alternata* (58.5%) at a concentration of 400 µL/L compared to other blends and individual essential oils. The second most effective essential oils combination (400 µL/L) was essential oils of *A. verticillata* and *A. sativum* blend, with percentages for mycelial reduction for *P. expansum*, *F. solani*, *R. stolonifer* and *A. alternata* of 99.3%, 90.3%, 84.4% and 33.3%, respectively. On the other hand, data indicated that the essential oils blends of *A. verticillata* + *C. longa*, and

*A. verticillata* + *A. sativum* + *C. longa* were less effective except for *P. expansum* which was inhibited with a percentage of 99.2% and 100%, respectively (Table 3). Comparing the results of essential oils blends with the individual oils, we noticed that the combined essential oils of *A. sativum* and *C. longa* showed the best synergistic effect on the inhibition of mycelial growth of all fungi tested (Tables 2 and 3).

On the basis of the results obtained, it seems that the association of the sulfur compounds (91.5%) with the oxygenated sesquiterpene compounds like the aromatic-turmerones (72.2%) and/or carvacrol (33.2%) and p-cymene (25.2%) considerably increases the antifungal activity. While, the association of sulfur compounds with aromatic-turmerones and oxygenated monoterpenes all together, showed no synergistic effect.

### 3.3. Effect of the Essential Oils on Disease Development In-Vivo Conditions

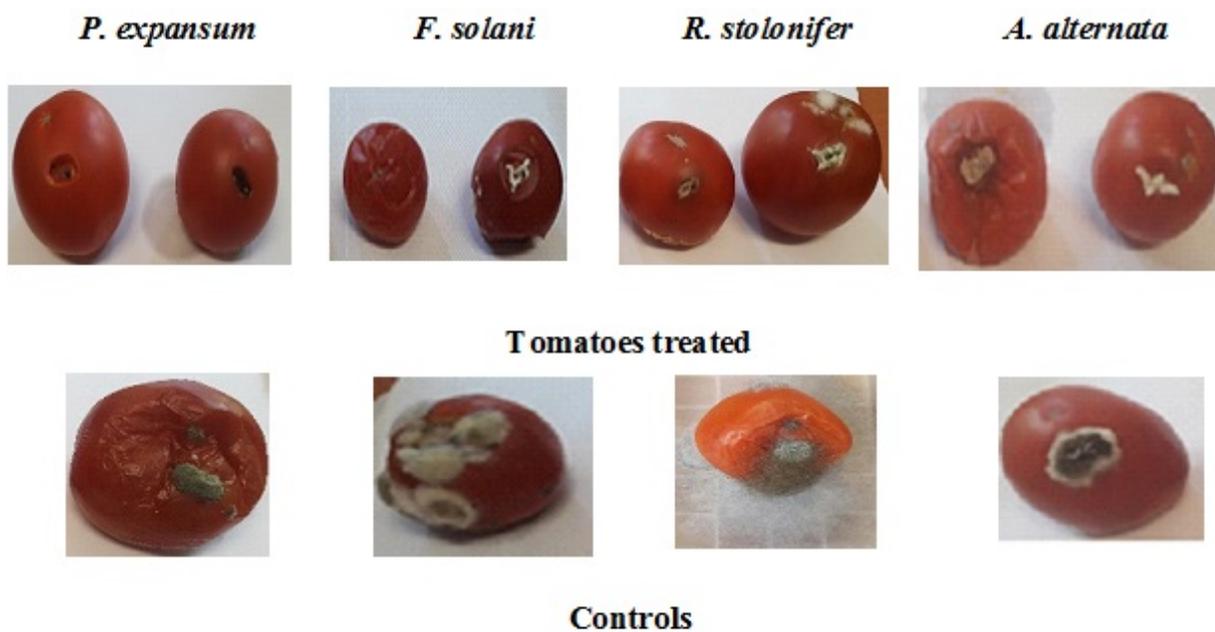
Due to the promising results of *in-vitro* tests, the blend of *A. sativum* and *C. longa* essential oils was chosen to determine its protective effects against tomato diseases caused by *P. expansum*, *F. solani*, *R. stolonifer* and *A. alternata*. According to Table 4 and Fig. (1), the *in-vivo* activity showed that the severity of the disease caused by all fungi was significantly reduced ( $P \leq 0.05$ ). Essential oils blend used with the concentration of 20 µL/L air, showed a very interesting protective effects on tomato up to ten days against *P. expansum* (100%), *R. stolonifer* (90%), *F. solani* (50%) and *A. alternata* (30%) (Table 4), compared with the controls, which were completely damaged (Fig. 1). In this study, the antifungal activities of the essential oils of three plants widely used in traditional medicine with the hope to find new natural antifungals to fight microorganisms that contaminate food and environment against the many fungicides are known for their toxic and/or mutagenic effects. Our study indicated that *A. verticillata*, *A. sativum* and *C. longa* essential oils possess interesting antifungal activities against *P. expansum*, *F. solani*, *R. stolonifer* and *A. alternata*. In addition, the essential oils blend of *A. sativum* and *C. longa* showed a protective effect of tomatoes in post-harvest conditions against all fungi. The antifungal properties of our essential oils may be related to its chemical profiles, particularly to the relatively high percentage of monoterpenes such as the p-cymene, limonene and carvacrol

Table 3. Antifungal activity of essential oils blends.

Microorganisms	Percentages of inhibitions (%)												Artea 330EC (µL/L)
	<i>A. verticillata</i> + <i>C. longa</i>			<i>A. verticillata</i> + <i>A. sativum</i>			<i>A. sativum</i> + <i>C. longa</i>			<i>A. verticillata</i> + <i>A. sativum</i> + <i>C. longa</i>			
Concentrations µL/L	100	200	400	100	200	400	100	200	400	100	200	400	100% Inhibition
<i>P. expansum</i>	45,5 ± 2.3	69,2 ± 1.7	99,2 ± 3.1	56,3 ± 6.5	71,8 ± 2.8	99,3 ± 1.5	34,8 ± 0.6	78,8 ± 2.1	100 ± 0.0	23,3 ± 1.0	45,5 ± 3.2	100 ± 0.0	512
<i>F. solani</i>	17,7 ± 0.8	23,3 ± 0.9	40,0 ± 0.8	28,9 ± 1.1	45,5 ± 1.6	90,3 ± 1.2	18,4 ± 0.4	34,2 ± 1.2	95,2 ± 1.7	27,1 ± 0.6	34,1 ± 3.5	50,7 ± 2.1	452
<i>R. stolonifer</i>	13,7 ± 0.6	17,7 ± 1.1	24,1 ± 0.3	11,8 ± 0.6	38,5 ± 3.6	84,4 ± 1.6	17,4 ± 0.2	63,3 ± 3.2	95,1 ± 1.5	3,7 ± 0.2	23,3 ± 1.6	28,5 ± 1.3	> 600
<i>A. alternata</i>	06,5 ± 0.2	10,3 ± 0.5	23,3 ± 1.2	07,5 ± 0.3	22,3 ± 2.9	33,3 ± 0.2	20,3 ± 0.9	32,5 ± 0.8	58,5 ± 2.2	00 ± 0.0	11,2 ± 0.5	27,4 ± 2.3	425

Table 4. Effect of *A. sativum* + *C. longa* essential oil blend on the protective of tomatoes against the infection caused by fungi.

Days	PDI (%)							
	Controls				Essential oil blend ( <i>A. sativum</i> + <i>C. longa</i> )			
	<i>P. expansum</i>	<i>F. solani</i>	<i>R. stolonifer</i>	<i>A. alternata</i>	<i>P. expansum</i>	<i>F. solani</i>	<i>R. stolonifer</i>	<i>A. alternata</i>
1th	0	0	0	0	0	0	0	0
2th	10	20	30	0	0	0	0	10
4th	30	50	50	10	0	10	0	30
6th	60	80	60	20	0	30	0	40
8th	100	100	100	50	0	40	0	60
10th	100	100	100	60	5	50	10	70

Fig. (1). Protective effects of *A. sativum* and *C. longa* essential oils blend after ten days of storage at 25 ± 1°C.

for *A. verticillata*, and Ar-turmerone,  $\alpha$ -turmerone and  $\beta$ -turmerone for *C. longa*. On the other hand, the properties of essential oil of *A. sativum* are due to high percentages of sulfur compounds. Phenylpropenes such as p-cymene and carvacrol are the main compounds in many essential oil plants and a large body of evidence suggests that these components possess antibacterial and antifungal activities [42-44]. Many researches in Turmeric essential oil showed antifungal, antibacterial, antioxidant and antitumor effects. The inhibitory effect of turmeric essential oil against microorganisms has been reported by many authors [45-48]. Little is known about the *in-vitro* and *in-vivo* antifungal activities of turmerones. However, it has been reported that turmerones have shown in the *in-vitro* tests anti-inflammatory effects in microglial cells [49] and anti-inflammatory effects in amyloid  $\beta$ -stimulated microglia [50]. *Allium sativum* L. is a pungent spice very use in traditional medicine for its various properties. It has been reported that garlic has been known to possess antioxidant, antimicrobials and antifungal activities. These properties are mainly due to organosulfur compounds like diallyl trisulfide and diallyl disulfide known for these various properties [51]. On the other hand, *A. sativum* and *C. longa* essential oils blend showed a very good antifungal activities under *in-vivo* and *in-vitro* conditions. This increase in activity may be due to the association between major compounds such as Ar-turmerone,  $\alpha$ -turmerone and  $\beta$ -turmerone with diallyl disulfide, allyl methyl trisulfide and diallyl trisulfide or owing to a synergistic effect with all active components present in both oils.

## CONCLUSION

The essential oils blend of *C. longa* and *A. sativum* had high level of turmerones and organosulfur compounds. The mixture exhibited high antifungal activities against *P. expansum*, *F. solani*, *R. stolonifer* and *A. alternata* strains and demonstrated promising *in-vivo* antifungal activities to control tomatoes infection. The development of natural antifungals based on essential oil blends may be an attractive adventure to decrease the negative effect of synthetic fungicide.

## ETHICS APPROVAL AND CONSENT TO PARTICIPATE

Not applicable.

## HUMAN AND ANIMAL RIGHTS

No Animals/Humans were used for studies that are the basis of this research.

## CONSENT FOR PUBLICATION

Not applicable.

## RESEARCH INVOLVING PLANTS

The authors declare that species studied is not endangered.

## AVAILABILITY OF DATA AND MATERIALS

Not applicable.

## FUNDING

None.

## CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest, financial or otherwise.

## ACKNOWLEDGEMENTS

The authors are indebted to Benabadji N from University of Tlemcen, Laboratory of Ecology and Management of Natural Ecosystems, to botanical identification of plants.

## REFERENCES

- [1] Travis, W.; Reynolds, S.R.; Waddington, C.; Leigh Anderson, A.C. Zoe, True.; Alison, Cullen. Environmental impacts and constraints associated with the production of major food crops in Sub-Saharan Africa and South Asia. *J. Food Secur.* **2015**, *7*(4), 795-822. <http://dx.doi.org/10.1007/s12571-015-0478-1>
- [2] Nicolopoulou-Stamati, P.; Maipas, S.; Kotampasi, C.; Stamatis, P.; Hens, L. Chemical Pesticides and Human Health: The Urgent Need for a New Concept in Agriculture. *Front. Public Health*, **2016**, *4*, 148. <http://dx.doi.org/10.3389/fpubh.2016.00148> PMID: 27486573
- [3] *Africa's Indigenous Knowledge: From Education to Practice. Indigenous Knowledge and Education in Africa.*, **2019**, 55-80.
- [4] Mochiah, M.; Banful, B.; Fening, K. Botanicals for the management of insect pests in organic vegetable production. *J. Entomol. Nematol.* **2011**, *3*, 85-97.
- [5] Mondédji, A.D.; Nyamador, W.S.; Amévoïn, K.; Abbey, G.A.; Ketoh, G.K.; Glitho, A.I. Analyse des caractéristiques sociodémographiques et identification des perceptions des distributeurs de pesticides et des consommateurs sur l'utilisation d'extraits botaniques dans la gestion des insectes ravageurs des cultures maraichères au sud du Togo. *Bulletin de l'IFAN Cheikh Anta Diop, Série A.*, **2014**, *53*(2), 135-150. b
- [6] Asare-Bediako, E.; Addo-Quaye, A.A.; Mohammed, A. Control of Diamondback Moth (*Plutella xylostella*) on Cabbage (*Brassica oleracea* var *capitata*) using Intercropping with Non-Host Crops. *Am. J. Food Technol.*, **2010**, *5*(4), 269-274. <http://dx.doi.org/10.3923/ajft.2010.269.274>
- [7] Baidoo, P.K.; Mochiah, M.B.; Apusiga, K. Onion as a pest control intercrop in organic cabbage (*Brassica oleracea*) production system in Ghana. *Sustain. Agric. Res.*, **2012**, *1*(1), 36-41. <http://dx.doi.org/10.5539/sar.v1n1p36>
- [8] Doumbouya, M. Abo, K.; Lepengue A.N.; Camara, B.; Kanko, K.; Aidara, D.; Kone, D. Activités comparées *in-vitro* de deux fongicides de synthèse et de deux huiles essentielles, sur des champignons telluriques des cultures maraichères en Côte d'Ivoire. *J. Appl. Biosci.*, **2012**, *50*, 3520-3532.
- [9] Bolou Bi Bolou, A.; Kouakou, T.H.; Kouamé, K.K.; Kassi, F.; Tuo, S.; Cherif, M.; Lézin Edson, B.; Koné, D. Inhibition de *Sclerotium rolfsii* Sacc. (Corticaceae), agent causal de la pourriture du collet de la tige de la tomate (Solanaceae), par *Xylopiia aethiopicia* (Dunal) A. Rich. (Annonaceae) et *Trichoderma* sp. *Eur. Sci. J.*, **2015**, *11*(12), 61-85.
- [10] F.; Mossini, S.A.; DiasFerreira, F.M.; Arrotéia, C.C.; Costa, C.L.; Nakamura, C.V.; Machinski, M. The inhibitory effects of *Curcuma longa* L. essentialoil and curcumin on *Aspergillus flavus* Link growth and morphology. *ScientificWorldJournal*, **2013**, *•••*343804
- [11] Dhingra, O.D.; Jham, G.N.; Barcelos, R.C.; Mendonça, F.A.; Ghiviriga, I. Isolation and identification of the principal fungitoxic component of turmeric essential oil. *J. Essent. Oil Res.*, **2007**, *19*(4), 387-391. <http://dx.doi.org/10.1080/10412905.2007.9699312>

- [12] Kim, M.K.; Choi, G.J.; Lee, H.S. Fungicidal property of *Curcuma longa* L. rhizome-derived curcumin against phytopathogenic fungi in a greenhouse. *J. Agric. Food Chem.*, **2003**, *51*(6), 1578-1581. <http://dx.doi.org/10.1021/jf0210369> PMID: 12617587
- [13] Sharifi-Rad, J.; Mnayer, D.; Tabanelli, G.; Stojanović-Radić, Z.Z.; Sharifi-Rad, M.; Yousaf, Z.; Vallone, L.; Setzer, W.N.; Iriti, M. Plants of the genus *Allium* as antibacterial agents: From tradition to pharmacy. *Cell. Mol. Biol.*, **2016**, *62*(9), 57-68. PMID: 27585263
- [14] Benkeblia, N. Antimicrobial activity of essential oil extracts of various onions (*Allium cepa*) and garlic (*Allium sativum*). *Lebensm. Wiss. Technol.*, **2004**, *37*, 263-268. <http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2003.09.001>
- [15] Bekhechi, C.; Boti, J.B.; Bekkara, F.A.; Abdelouahid, D.E.; Casanova, J.; Tomi, F. Isothymol in Ajowan essential oil. *Nat. Prod. Commun.*, **2010**, *5*(7), 1107-1110. <http://dx.doi.org/10.1177/1934578X1000500726> PMID: 20734951
- [16] Bhargava, P.P.; Hakasas, C.N. Examination of essential oil from ajowan seeds. *Perfum. J. Essent. Oil Res.*, **1959**, *50*, 204-206.
- [17] Senouci, H.; Gaouar Benyelles, N.; Dib, M.A.; Costa, J.; Muselli, A. *Ammoides verticillata* Essential Oil as Biocontrol Agent of Selected Fungi and Pest of Olive Tree. *Recent. Pat. Food Nutr. (Roma)*, **2019**, ... <http://dx.doi.org/10.2174/2212798410666190619110251> PMID: 31215382
- [18] Davidson, P.M.; Parish, M.E. Methods for testing the efficacy of food antimicrobials. *Food Technol.*, **1987**, *43*, 148-155.
- [19] Gill, A.O.; Delaquis, P.; Russo, P.; Holley, R.A. Evaluation of antilisterial action of cilantro oil on vacuum packed ham. *Int. J. Food Microbiol.*, **2002**, *73*(1), 83-92. [http://dx.doi.org/10.1016/S0168-1605\(01\)00712-7](http://dx.doi.org/10.1016/S0168-1605(01)00712-7) PMID: 11883677
- [20] Conseil de l'Europe. *Pharmacopée Européenne*, France: Maisonneuve S.A.: Sainte Ruffine, **1996**.
- [21] Adams, R. *Identification of essential oils by Capillary Gas Chromatography/Mass Spectroscopy*; Allured Publ. Corp.: Carol Stream, IL, **2001**.
- [22] Kçnig, W.; Joulain, D.; Hochmuth, D. *Terpenoids and Related Constituents of Essential Oils*, Library of Mass Finder 2.1. In: *Institute of Organic Chemistry, University of Hamburg, Hamburg*; , **2001**.
- [23] Mc Lafferty, F.; Stauffer, D. *Wiley Register of Mass Spectral Data*, (6th edn). *Mass spectrometry library search system bench-Top/PBM*; Version, **1994**.
- [24] Standards, N.I.O. *Technology, PC Version 1.7 of The NIST/EPA/NIH Mass Spectral Library*, **1999**.
- [25] Belabbes, R.; Dib, M.E.A.; Djabou, N.; Ilias, F.; Tabti, B.; Costa, J.; Muselli, A. Chemical Variability, Antioxidant and Antifungal Activities of Essential Oils and Hydrosol Extract of *Calendula arvensis* L. from Western Algeria. *Chem. Biodivers.*, **2017**, *14*(5)e1600482 <http://dx.doi.org/10.1002/cbdv.201600482> PMID: 28109063
- [26] Alsoghaili, S.A.; Bani-Hasan, B.M. Morphological and Molecular Identification of Fungi Isolated from Different Environmental Sources in the Northern Eastern Desert of Jordan. *Jordan J. Biol. Sci.*, **2018**, *11*(3), 329-337.
- [27] Gaddeyya, G.; Niharika, P.S.; Bharathi, P.; Kumar, P.K.R. Isolation and identification of soil mycoflora in different crop fields at Salur Mandal. *Adv. Appl. Sci. Res.*, **2012**, *3*, 2020-2026.
- [28] Tian, J.; Ban, X.; Zeng, H.; He, J.; Huang, B.; Wang, Y. Chemical composition and antifungal activity of essential oil from *Cicuta virosa* L. var. *latisecta* Celak. *Int. J. Food Microbiol.*, **2011**, *145*(2-3), 464-470. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2011.01.023> PMID: 21320730
- [29] Singh, P.; Srivastava, B.; Kumar, A.; Kumar, R.; Dubey, N.K.; Gupta, R. Assessment of *Pelargonium graveolens* oil as plant-based antimicrobial and aflatoxin suppressor in food preservation. *J. Sci. Food Agric.*, **2008**, *88*, 2421-2425. <http://dx.doi.org/10.1002/jsfa.3342>
- [30] Tabet Zatla, A.; Dib, M.E.A.; Djabou, N.; Ilias, F.; Costa, J.; Muselli, A. Antifungal activities of essential oils and hydrosol extracts of *Daucus carota* subsp. *sativus* for the control of fungal pathogens, in particular gray rot of strawberry during storage. *J. Essent. Oil Res.*, **2017**, *29*, 391-399. <http://dx.doi.org/10.1080/10412905.2017.1322008>
- [31] Attou, A.; Davenne, D.; Benmansour, A.; Lazouni, H.A. Chemical Composition and Biological Activities of *Ammoides verticillata* Essential Oil from West Algeria. *Phytotherapie*, **2019**, *17*(1), 2-8. <http://dx.doi.org/10.3166/phyto-2019-0116>
- [32] Benyoucef, F.; Dib, M.A.; Tabti, B.; Zoheir, A.; Costa, J.; Muselli, A. Synergistic Effects of Essential Oils of *Ammoides verticillata* and *Satureja candidissima* Against Many Pathogenic Microorganisms. *Antimicrob. Agents*, **2019**, ... <http://dx.doi.org/10.2174/2211352517666190227161811>
- [33] Douiri, L.; Boughdad, A.; Assobhei, O.; Moumni, M. Chemical composition and biological activity of *Allium sativum* essential oils against *Callosobruchus maculatus*. *IOSR J. Environ. Sci. Toxicol. Food Technol.*, **2013**, *3*, 30-36.
- [34] Dziri, S.; Casabianca, H.; Hanchi, B.; Hosni, K. Composition of garlic essential oil (*Allium sativum* L.) as influenced by drying method. *J. Essent. Oil Res.*, **2014**, *26*, 91-96. <http://dx.doi.org/10.1080/10412905.2013.868329>
- [35] Kimbaris, A.C.; Siatif, N.G.; Daferera, D.J.; Tarantilis, P.A.; Pappas, C.S.; Polissiou, M.G. Comparison of distillation and ultrasound-assisted extraction methods for the isolation of sensitive aroma compounds from garlic (*Allium sativum*). *Ultrason. Sonochem.*, **2006**, *13*(1), 54-60. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ultsonch.2004.12.003> PMID: 16223688
- [36] Kocić-Tanackov, S.; Dimić, G.; Lević, J.; Tanackov, I.; Tepić, A.; Vujičić, B.; Gvozdanović-Varga, J. Effects of onion (*Allium cepa* L.) and garlic (*Allium sativum* L.) essential oils on the *Aspergillus versicolor* growth and sterigmatocystin production. *J. Food Sci.*, **2012**, *77*(5), M278-M284. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1750-3841.2012.02662.x> PMID: 22497489
- [37] Mnayer, D.; Fabiano-Tixier, A.S.; Petitcolas, E.; Hamieh, T.; Nehme, N.; Ferrant, C.; Fernandez, X.; Chemat, F. Chemical composition, antibacterial and antioxidant activities of six essential oils from the Alliaceae family. *Molecules*, **2014**, *19*(12), 20034-20053. <http://dx.doi.org/10.3390/molecules191220034> PMID: 25470273
- [38] Gounder, D.K.; Lingamallu, J. Comparison of chemical composition and antioxidant potential of volatile oil from fresh dried and cured turmeric (*Curcuma longa*) rhizomes. *Ind. Crops Prod.*, **2012**, *38*, 124-131. <http://dx.doi.org/10.1016/j.indcrop.2012.01.014>
- [39] Singh, G.; Kapoor, I.P.S.; Singh, P.; de Heluani, C.S.; de Lampasona, M.P.; Catalan, C.A.N. Comparative study of chemical composition and antioxidant activity of fresh and dry rhizomes of turmeric (*Curcuma longa* Linn.). *Food Chem. Toxicol.*, **2010**, *48*(4), 1026-1031. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fct.2010.01.015> PMID: 20096323
- [40] Sharma, R.K.; Misra, B.P.; Sarma, T.C.; Bordoloi, A.K.; Pathak, M.G.; Leclercq, P.A. Essential oils of *Curcuma longa* L. from Bhutan. *J. Essent. Oil Res.*, **1997**, *9*(5), 589-592. <http://dx.doi.org/10.1080/10412905.1997.9700783>
- [41] Singh, G.; Singh, O.P.; Maurya, S. Chemical and biocidal investigations on essential oils of some Indian *Curcuma* species. *Prog. Cryst. Growth Charact. Mater.*, **2002**, *45*(1-2), 75-81. [http://dx.doi.org/10.1016/S0960-8974\(02\)00030-X](http://dx.doi.org/10.1016/S0960-8974(02)00030-X)
- [42] Kaluderović, G.N.; Krajnović, T.; Momčilović, M.; Stosic-Grujicic, S.; Mijatović, S.; Maksimović-Ivanić, D.; Hey-Hawkins, E. Ruthenium(II) p-cymene complex bearing 2,2'-dipyridylamine targets caspase 3 deficient MCF-7 breast cancer cells without disruption of antitumor immune response. *J. Inorg. Biochem.*, **2015**, *153*, 315-321. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2015.09.006> PMID: 26428537
- [43] Li, J.; Liu, C.; Sato, T. Novel Antitumor Invasive Actions of p-Cymene by Decreasing MMP-9/TIMP-1 Expression Ratio in Human Fibrosarcoma HT-1080 Cells. *Biol. Pharm. Bull.*, **2016**, *39*(8), 1247-1253. <http://dx.doi.org/10.1248/bpb.b15-00827> PMID: 27476935
- [44] Păunescu, E.; Nowak-Sliwinska, P.; Clavel, C.M.; Scopelliti, R.; Griffioen, A.W.; Dyson, P.J. Anticancer Organometallic Osmium(II)-p-cymene Complexes. *ChemMedChem*, **2015**, *10*(9), 1539-1547. <http://dx.doi.org/10.1002/cmdc.201500221> PMID: 26190176
- [45] Apisariyakul, A.; Vanittanakom, N.; Buddhasukh, D. Antifungal activity of turmeric oil extracted from *Curcuma longa* (Zingiberaceae). *J. Ethnopharmacol.*, **1995**, *49*(3), 163-169. [http://dx.doi.org/10.1016/0378-8741\(95\)01320-2](http://dx.doi.org/10.1016/0378-8741(95)01320-2) PMID: 8824742

- [46] Norajit, K.; Laohakunjit, N.; Kerdchoechuen, O. Antibacterial effect of five Zingiberaceae essential oils. *Molecules*, **2007**, *12*(8), 2047-2060.  
<http://dx.doi.org/10.3390/12082047> PMID: 17960105
- [47] Bin, J.I.; Yassin, M.S.M.; Chin, C.B.; Chen, L.L.; Sim, N.L. Antifungal Activity of the Essential Oils of Nine Zingiberaceae Species. *Pharm. Biol.*, **2003**, *41*(5), 392-397.  
<http://dx.doi.org/10.1076/phbi.41.5.392.15941>
- [48] Wilson, B.; Abraham, G.; Manju, V.S.; Mathew, M.; Vimala, B.; Sundaresan, S.; Nambisan, B. Antimicrobial activity of *Curcuma zedoaria* and *Curcuma malabarica* tubers. *J. Ethnopharmacol.*, **2005**, *99*(1), 147-151.  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2005.02.004> PMID: 15848035
- [49] Park, S.Y.; Kim, Y.H.; Kim, Y.; Lee, S.J. Aromatic-turmerone's anti-inflammatory effects in microglial cells are mediated by protein kinase A and heme oxygenase-1 signaling. *Neurochem. Int.*, **2012**, *61*(5), 767-777.  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.neuint.2012.06.020> PMID: 22766494
- [50] Park, S.Y.; Jin, M.L.; Kim, Y.H.; Kim, Y.; Lee, S.J. Anti-inflammatory effects of aromatic-turmerone through blocking of NF- $\kappa$ B, JNK, and p38 MAPK signaling pathways in amyloid  $\beta$ -stimulated microglia. *Int. Immunopharmacol.*, **2012**, *14*(1), 13-20.  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.intimp.2012.06.003> PMID: 22728094
- [51] Yin, M.C.; Tsao, S.M. Inhibitory effect of seven *Allium* plants upon three *Aspergillus* species. *Int. J. Food Microbiol.*, **1999**, *49*(1-2), 49-56.  
[http://dx.doi.org/10.1016/S0168-1605\(99\)00061-6](http://dx.doi.org/10.1016/S0168-1605(99)00061-6) PMID: 10477070

DISCLAIMER: The above article has been published in Epub (ahead of print) on the basis of the materials provided by the author. The Editorial Department reserves the right to make minor modifications for further improvement of the manuscript.

ملخص: دراسة اصابة الزيتون بواسطة باكتوسيرا أوليا والنباتات المسببة للأمراض المرتبطة به من ناحية ؛ الدراسة الكيميائية النباتية للزيوت الأساسية للنباتات الطبية *Ammoides verticillata* و *Curcuma longa* و *Allium sativum* ، من ناحية أخرى ، أتاحت الحصول على نتائج تساعد على معرفة معدلات سميتها ضد آفات شجرة الزيتون وتأثيرها التآزري والجزئي - تغليف الزيوت العطرية من *Ammoides verticillata* ، حيث تظهر معدلات الإصابة بالذباب الذي يمثل عدد العضات والثقوب الخارجة اختلافات كبيرة في تواريخ مختلفة ، كما أن النشاط المضاد للطفيليات للزيوت الأساسية من *Ammoides verticillata* أكدت فعاليتها وأظهرت قوتها من سمية المبيدات الحشرية على *Bactrocera olea*. حصلنا على وفاة 100 ٪ من الحشرات البالغة بجرعات منخفضة من 2 µl / L من الهواء. نشاط جيد مضاد للميكروبات ضد كل السلالات التي تم اختبارها ، غرام (-) أو (+) وحتى على الخميرة ، الزيوت الأساسية لـ A. أظهر كل من *Verticillata* و *A. sativum* نشاطاً جيداً مضاداً للفطريات ضد *P. expansum* و *F. solani* و *R. stolonifer* مقارنةً بمبيد الفطريات المرجعي Artea 330EC بتركيز 400 ميكرو لتر / لتر سلالات *P. expansum* (100٪ و 97.4٪) ، و *F. solani* (97.4٪ و 79.2٪) و *R. stolonifer* (71.5٪ و 73.3٪) كانت أكثر حساسية للزيوت الأساسية *A. verticillata* and *A. sativum* ، على التوالي كان لخليط الزيوت العطرية لـ *C. longa* و *A. sativum* مستوى عالٍ من مركبات التيرمون والكبريت العضوي وكان له أفضل تأثير تآزري على تثبيط نمو ونشاطات المضادة للفطريات الواعدة في الجسم الحي للسيطرة على عدوى الطماطم (البندورة): دراسة تغليف الزيوت العطرية من *Ammoides verticillata* عن طريق التعقيد المركب مع اللبان العربي-الجيلاتين لبلان اللوز-الجيلاتين حيث يعمل على حماية و الحفاظ على المركبات العطرية للزيوت الأساسية ضد الانحلال الحراري والتبخّر.

**الكلمات المفتاحية:** الزيوت العطرية ، باكتوسيرا أوليا ، امويديس فيرتشيلاتا ، الأنشطة البيولوجية ، التغليف

Résumé : L'étude de l'infestation des olives par *Bactrocera oleae* et la flore pathogène qui lui est associée d'une part ; l'étude phytochimique des huiles essentielles des plantes médicinales *Ammoides verticillata*, *Curcuma longa* et *Allium sativum* ,d'autre part ont permis d'obtenir des résultats servant à connaître leurs taux de toxicité contre les bioagresseurs de l'olivier, leurs effets synergiques et la micro-encapsulation de l'huile essentielle de *Ammoides verticillata*. Les taux d'infestation de la mouche représentés par le nombre de piqûres et de trous de sortie, montrent des variations significatives aux différentes dates d'observation. L'activité antiparasitaire de l'huile essentielle d'*Ammoides verticillata* a confirmé son efficacité et montré son pouvoir insecticide sur *Bactrocera oleae* avec une mortalité de 100% de l'insecte adulte aux faibles doses de 2µl/L d'air. L'HE d'*A. verticillata* a montré une bonne activité antimicrobienne contre toutes les souches testées, Gram (-) ou (+) et même sur la levure *C. albicans*. Les huiles essentielles de *A. Verticillata* et *A. sativum* ont montré une très bonne activité antifongique contre *P. expansum* (100% et 97,4%), *F. solani* (97,4% et 79,2%) et *R. stolonifer* (71,5% et 73,3%) respectivement, par rapport au fongicide de référence Artea 330EC à la concentration de 400 µL / L.

Le mélange des huiles essentielles de *C. longa* et *A. sativum* avait un niveau élevé de turmerones et de composés organosulfurés et présentait le meilleur effet synergique sur l'inhibition de la croissance mycélienne, des activités antifongiques prometteuses, in vivo, pour contrôler l'infection des tomates. Nous avons procédé à l'encapsulation de l'huile essentielle d'*Ammoides verticillata* par coacervation complexe avec la gomme d'amandier -gélatine, et gomme arabe -gélatine comme polysaccharide servant à protéger et préserver les composés aromatiques des huiles essentielles contre la dégradation thermique et la volatilité et facilitant leur relargage lors des traitements.

**Mots clés :** huile essentielle, *Bactrocera oleae*, *Ammoides verticillata*, activités biologiques, encapsulation

Abstract: The study of the infestation of olives by *Bactrocera oleae* and the pathogenic flora associated with it on the one hand; phytochemical study of the essential oils of medicinal plants *Ammoides verticillata*, *curcuma longa* and *Allium sativum*, on the other hand have obtained results used to know their toxicity levels against the bioagressors of the olive tree, their synergistic effects and the micro-encapsulation of the essential oil of *Ammoides verticillata*. The fly infestation rates, represented by the number of stings and exit holes, show significant variations at different viewing dates. The antiparasitic activity of *Ammoides verticillata* essential oil confirmed its effectiveness and showed its insecticide power on *Bactrocera oleae* with a 100% mortality of the adult insect at low doses of 2µl/L of air. The essential oil of *A. verticillata* has shown good antimicrobial activity against all strains tested, Gram+ or Gram - and even on the yeast *C. albicans*. Essential oils of *A. Verticillata* and *A. sativum* showed very good antifungal activity against *P. expansum* (100% and 97.4%), *F. solani* (97.4% and 79.2%) and *R. stolonifer* (71.5% and 73.3%) respectively, compared to the reference fungicide Artea 330EC at the concentration of 400 µL / L. The mixture of essential oils of *C. longa* and *A. sativum* had a high level of turmerones and organosulfur compounds and had the best synergistic effect on inhibition of mycelial growth and exhibited promising antifungal activities, in vivo, to control infection of tomatoes. The study of the encapsulation of the essential oil of *Ammoides verticillata* by complex coacervation with almond gum-gelatin, and arabic gum-gelatin as a polysaccharide serves to protect and preserved the aromatic compounds of essential oils against thermal degradation and volatility

**Keywords:** essential oil, *Bactrocera oleae*, *Ammoides verticillata*, biological activities, encapsulation