

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche scientifique
UNIVERSITE ABOU BAKER BELKAID DE TLEMCEN
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie et Sciences de la Terre et de
l'Univers

Département d'Ecologie et Environnement

Laboratoire de recherche: " Ecologie et Gestion des Ecosystèmes Naturels"

Thèse pour l'obtention du diplôme de

DOCTORAT EN ECOLOGIE ET ENVIRONNEMENT

Option : **ECOLOGIE ET ENVIRONNEMENT**

Soutenue publiquement par

Mme TABTI LEILA

Thème:

« Comparaison des activités antimicrobienne et insecticide de *Thymus capitatus* (L.) Hoffm. & Link, *Tetraclinis articulata* (Vahl.) Masters et *Daucus crinitus* Desf. contre les pathogènes de *Citrus sinensis* dans la région de Tlemcen »

Présidente:

Mme BELAIDI Nouria

Pr. Université de Tlemcen

Directrice de thèse

Mme GAOUAR BENYELLES Nassira

Pr. Université de Tlemcen

Co-Directeur de thèse:

Mr DIB Mohammed El Amine

MCA Université de Tlemcen

Examineurs:

Mr ABDELWAHID Djamel

Pr. Université de Tlemcen

Mr MOULAI Ryadh

Pr. Université de Bejaïa

Mr BENMAHDI Houcine

MCA Université de Béchar

Année Universitaire: 2014-2015

REMERCIEMENT

La réalisation de ce mémoire a été possible grâce au concours de plusieurs personnes à qui je voudrais témoigner toute ma reconnaissance.

Mes remerciements vont en premier lieu à **Mme BENYELLES-GAOUAR Nassira**, ma directrice de thèse, qui a toujours su m'aider, m'encourager et me motiver. Je lui suis énormément reconnaissant pour les nombreuses relectures de ce manuscrit et pour le temps qu'elle a consacré pour m'aider lorsque je me noyais dans les pages de ce qui n'était pas encore le présent document. Merci aussi de m'avoir guidé durant cette aventure doctorale.

Mes remerciements vont ensuite à **Mr DIB Mohamed El Amine**, mon co-encadreur merci pour toute cette énergie lors de nos réunions au laboratoire où nous avons pu faire avancer ce projet. Merci également de m'avoir convaincu qu'il ne fallait pas commencer par les points négatifs mais justement toujours voir le coté positif des choses. Merci pour sa patience son attention, ses conseils et ses regards critiques sur mes résultats.

Je tiens à remercier vivement **Mr REBIAHI Sid Ahmed** professeur et chef de département de biologie à l'université de Tlemcen et **Mr BELYAAGOUBI Larbi** enseignant à l'université de Tlemcen pour tout le temps qui ont consacré pour m'aider à la réalisation de la partie microbiologique.

Cette thèse n'aurait pas sa valeur sans le jury ; je tiens à remercier vivement ses membres d'avoir accepté de juger ce travail :

Mme BELAIDI Nouria professeur à la faculté des Sciences de la Nature et de la Vie et Sciences de la Terre et de l'Univers pour avoir fait l'honneur de présider ce jury et pour son aide précieuse.

Mes vifs remerciements vont à **Mr ABDELWAHED Djamel** professeur à la faculté des Sciences de la Nature et de la Vie et Sciences de la Terre et de l'Univers d'avoir accepter de faire partie du jury.

A **Mr MOULAY Ryadh** professeur à l'université de Béjaia et **Mr BENMEHDI** Houssin, maître de conférence à l'université de Béchar d'avoir accepté de venir de loin pour participer à ce jury.

A **Mr BNNSLIMANE** Boumediene directeur de la ferme pilote BELAIDOUNI MOUHAMED, et l'ingénieur **Mr FAROUI**, je tiens à les remercier énormément pour leur aide et d'avoir mis leurs matériels à ma disposition durant les sorties sur le terrain.

En fin je remercie toute personne que j'ai eu l'occasion de côtoyer au cours de ces quatre années au sphère universitaire surtout les ingénieurs de laboratoire Asma, Salima, Khadidja, khaira et Mouhamed et tout mes amies.

DEDICACES

A mes très chers parents

*en témoignage de ma reconnaissance envers le soutien les sacrifices et tout les efforts
qu'ils ont fait pour mon éducation ainsi que ma formation*

A mes chers frères et sœurs

pour leurs affection compréhension et patience

A toute ma famille et ma belle famille

et ma belle mère qui était toujours à mes côtés

A toutes les amies qui ont une relation de proche ou de

loin avec la réalisation de ce travail

LEILA

SOMMAIRE

Introduction	1
CHAPITRE I : ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE	
PARTIE I: LES AGRUMES	
I-Historique	5
2-Taxonomie	5
3-Morphologie	6
3-1- Les racines	7
3-2- Le tronc	7
3-3- Les feuille	7
3-4-Les fleurs	8
3-5-Le fruit	8
3-6-Les graines	9
4-Reproduction	9
4-1- La reproduction sexuée	10
4-2- La reproduction asexuée	10
5-Variétés des agrumes	11
5-1-Les Navels	11
5-2-Les Blondes	11
5-3-Les Sanguines	11
6-Ecologie	12
7-Conservation et maturation des agrumes	12
8-Les agrumes en Algérie	14
9-Les agrumes à Tlemcen	14
PARTIE II: PATHOLOGIE DES AGRUMES	
1-Les maladies cryptogamiques	17
1-1- <i>Aspergillus sp.</i>	17
1-2- <i>Alternaria sp.</i>	17
1-3- <i>Cladosporium herbarum</i>	18
1-4- <i>Geotricum candidum</i>	18

1-5- <i>Penicillium</i>	19
1-6- <i>Trichoderma viride</i>	20
1-7- <i>Phytophthora sp.</i>	20
1-8- <i>Mycophaeralla citri</i>	21
1-9- <i>Phomopsis citri</i>	21
1-10- <i>Colletotrichum gleosporioides</i>	21
2-Les maladies bactériennes	22
2-1-La galle	22
2-2-Les tâches noires	22
2-3- Citrus canker (le chancre)	22
2-4- Citrus greening	22
3-Les maladies virales	22
3-1-Tristeza	22
3-2- Psorose	23
4-Désordres physiologiques	23
4-1-Les fentes des fruits	23
4-2-Le pourrissement des racines	23
4-3-La carence en minéraux	23
5-Ravageurs	23
5-1- Cochenilles	23
5-2- Pucerons	24
5-3- Cératite (<i>Ceratitis capitata</i>)	24
5-4- Nématodes	25
5-5- Cicadelle blanche	25

PARTIE III: PRESENTATION DE *CERATITIS CAPITATA*

1-Origine	26
2-Distribution géographique	26
3-Position systématique	27
4-Plantes hôtes	28
5- Description morphologique des différents stades de développement	28
5-1-Les œufs	28
5-2-les larves	29
5-3-Les pupes	29

5-4-L'adulte	30
6-Cycle de développement de la cératite	30
6-1-Ponte et incubation	30
6-2-Développement larvaire	31
7- Dégâts	32

PARTIE IV: METHODES DE LUTTE CONTRE LES BIOAGRESSEURS

1-La lutte chimique	33
1-1-Lutte contre les moisissures	33
1-1-1- Fongicides utilisés en Algérie	33
1-1-2-Insecticides utilisés au niveau de la ferme pilote d'El Fhoul	35
2-Lutte biologique	35
2-1-Utilisation des produits naturels pour la lutte contre les bioagresseurs	36
2-1-1- Produits naturels utilisés comme insecticides	36
2-1-2-Produits naturels utilisés comme fongicides	37
2-1-3-Produits naturels utilisés comme herbicides	38
2-2-Utilisation des microorganismes pour lutter contre les ravageurs	38

PARTIE V: METHODES DE LUTTE ET ALTERNATIVES BIO

I-Introduction	40
2-Inconvénients des fongicides synthétiques	40
3-Lutte contre les maladies en culture Bio	41
4-Les extraits de plantes et huiles essentielles	42
5-La composition chimique d'extraits de plantes et des huiles essentielles	43
6-Effets sur la production de mycotoxines	45
7-Essais in vivo	45

CHAPITRE II : MATERIELS ET METHODES

1-Présentation de la zone d'étude	48
1-1-Situation géographique	48
1-2-Etude bioclimatique	48
1-2-1-Les précipitations	51
1-2-2- Les températures	51
1-2-3- Diagramme ombrothermique de Bagnouls et Gausson (1953)	52
1-2-4-Quotient pluviothermique et climagramme d'Emberger	53

2-Matériel utilisé	55
2-1 Matériel de piégeage	55
2-2 Matériel d'élevage	55
3-Etude parasitologique	56
3-1-Echantillonnage	56
3-2-Capture des adultes	58
3-3-Mise en élevage	58
3-4-Etude statistique des données	59
3-4-1-Analyse de variance à un critère de classification	59
3-4-2- Coefficient de corrélation linéaire	59
3-4-3-Droite de régression	60
4-Description des plantes aromatiques utilisées	60
4-1- <i>Thymus capitatus</i>	60
4-1-1-Morphologie	60
4-1-2-Utilisation	61
4-1-3-Systématique	61
4-2- <i>Tetraclinis articulata</i>	61
4-2-1-Morphologie	62
4-2-2-Utilisation	62
4-2-3-Systématique	62
4-3- <i>Daucus crinitus desf.</i>	63
4-3-1-Morphologie	63
4-3-2-Utilisation	63
4-3-3-Systématique	64
5- les extractions	65
5-1-Préparation des huiles essentielles	65
5-1-1-L'hydrodistillation (HD)	65
5-1-2-Calcul du rendement	66
5-2-Préparation des extraits à base de solvants	66
5-3-Extraction des acides gras et des insaponifiables	68
5-3-1-Préparation des échantillons	68

5-3-2-Extraction des insaponifiables	68
5-3-3-Extraction des acides gras	68
5-3-4-Calcul du rendement	68
6-Etude microbiologique	68
6-1-Prélèvement des fruits pour l'étude microbiologique	68
6-2- Etude mycologique	69
6-2-1-Isolement des moisissures pathogènes de l'oranger	69
6-2-2-Purification des souches fongiques isolées	69
6-2-3-Identification des moisissures isolées à partir des orangers	69
6-2-3-1-Méthode du scotch	69
6-2-3-2-Méthode de microculture	70
6-3- Etude bactériologique	70
6-3-1-Isolement des bactéries pathogènes de l'oranger	70
6-3-2-Purification des souches bactériennes isolées	70
6-3-3-Identification des bactéries isolées à partir des orangers	70
6-3-3-1- Caractères morphologiques	71
6-3-3-2-Caractères biochimiques	72
7-Activités biologiques	74
7-1-Activité antifongique	74
7-1-1-Activité antifongique des extraits	74
7-1-2-Activité antifongique des huiles essentielles	75
7-1-3-Activité antifongique des hydrolats	75
7-2- Activité antibactérienne	76
7-3-1-Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI)	76
7-3-2-Détermination de la concentration minimale bactéricide (CMB)	76
7-3-Activité antioxydante	76
7-1-2-Expression des résultats	77
8- Activité insecticide des huiles essentielles	78
8-1- Evaluation de l'efficacité des huiles essentielles sur <i>Ceratitis capitata</i>	78

8-2- Analyse statistique	78
8-3- Correction de la mortalité et calcul des doses létales 50 et 90	78

CHAPITRE III : RESULTATS ET DISCUSSION

PARTIE I: ETUDE ENTOMOLOGIQUE

A-Résultats	80
1-Etude de l'infestation en fonction des trous de ponte	80
1-1- Effet de l'orientation	80
1-2 -Effet de la date	81
1-3- Effet de l'arbre	82
2-Etude de l'infestation à partir des fruits chutés	82
2-1- Effet de l'orientation	83
2-2- Effet de la date	83
2-3- Effet de l'arbre	84
3-Bioécologie de <i>Ceratitis capitata</i>	84
3-1-Capture des adultes	85
3-2- Biologie des différents stades de la mouche	85
3-2-1- Mortalité larvaire	85
3-2-2 -Développement nymphal	86
3-2-3- Mortalité nymphale	86
3-2-4 -Taux d'émergence des adultes estimé à partir des pupes	87
3-2-5-Taux d'émergence des adultes à partir des larves	88
B-Discussion	89
1- Cycle évolutif	89
2- Taux de mortalité et longévité des différents stades	89
3- Nombre de générations	90
4-Cinétique des infestations	90
5-Incidence des trois facteurs écologiques testés	91
6-Parasitisme	92

PARTIE II : ETUDE MICROBIOLOGIQUE

A-Résultats	93
1-Analyse mycologique	93
1-1-Identification des moisissures	93
1-2-Dénombrement des moisissures isolées	99
2-Analyses bactériologiques	100
2-1-Identification des genres de bactéries	100
B-Discussion	102
1-Analyse mycologique	102
2-Analyse bactériologique	103

PARTIE III : ETUDE PHYTOCHIMIQUE

A-Résultats	105
1-Extraction des huiles essentielles de <i>T. capitatus</i> , <i>D. crinitus</i> et <i>T. articulata</i>	105
1-1-Rendement des huiles essentielles	105
1-2- Composition chimique de l'huile essentielle et l'hydrolat de <i>T. capitatus</i>	106
1-3- Composition chimique de <i>D. crinitus</i> et <i>T. articulata</i>	108
2-Extraction à base de solvants organiques	111
2-1-Rendement des extraits de <i>T. capitatus</i> , <i>D. crinitus</i> , <i>T. articulata</i>	111
2-2-Profil des acides gras de <i>T. capitatus</i>	112
2-3-Criblage phytochimique	113

PARTIE IV : ACTIVITES BIOLOGIQUES

A- Résultats	114
· Activité insecticide des huiles essentielles étudiées vis-à-vis de <i>Ceratitis capitata</i>	114
1-1- Activité insecticide de l'huile essentielle de <i>T. capitatus</i>	114
· 2- Activité insecticide de l'huile essentielle de <i>T. articulata</i>	115
1-3- Activité insecticide de l'huile essentielle de <i>D. crinitus</i>	116

2- Activités antifongiques in vitro des plantes étudiées	116
2-1-Activité antifongique in vitro de l'huile essentielle de <i>T. capitatus</i>	116
2-2- Activités antifongiques in vitro des extraits de <i>T. capitatus</i>	118
2-3-Activités antifongiques in vitro des huiles essentielles de <i>T. articulata</i>	119
2-4-Activités antifongiques in vitro des extraits de <i>T. articulata</i>	120
2-5-Activités antifongiques in vitro des huiles essentielles de <i>D.crinitus</i>	121
2-6-Activités antifongiques in vitro des extraits de <i>D. crinitus</i>	121
3- Activités antifongiques in vivo des plantes étudiées	122
3-1-Activité antifongique in vivo de <i>T. capitatus</i> contre le développement de <i>P.italicum</i>	122
3-2-Traitement des oranges non infectées par l'hydrolat de <i>T. capitatus</i>	124
3-3-Activité antifongique in vivo de <i>T.articulata</i> contre le développement de <i>P. italicum</i>	125
4- Test du goût	126
5-Activités antibactériennes des huiles essentielles et les extraits des trois plantes	127
6- Activités antioxydantes des huiles essentielles et les extraits des trois plantes	133
6-1-Propriétés antioxydantes de l'huile essentielle et des extraits du <i>T. Capitatus</i>	133
6-2-Propriétés antioxydantes de l'huile essentielle et des extraits du <i>T. articulata</i>	135
6-3-Propriétés antioxydantes des huiles essentielles <i>D.crinitus</i>	136
B- Discussion	137
1- Activité insecticide	137
2-Activité antimicrobienne	138
3-Activité antioxydante	140
Conclusion	141
Conclusion générale	142
Références bibliographiques	146
Annexes	

LISTE DES FIGURES

Figure 1: Aspect général de la plante.

Figure 2: Feuilles et fruits de *Citrus sinensis*.

Figure 3 : la fleur de *Citrus sinensis*.

Figure 4 : Coupe transversale d'orange.

Figure 5: *Aspergillus sp.* Sur orange.

Figure 6 : *Alternaria sp.* sur mandarine.

Figure 7: *Geotricum candidum* sur orange.

Figure 8 : *Penicillium digitatum* (pourriture verte) et *Penicillium italicum* (pourriture bleue).

Figure 9 : *Phytophthora sp.* sur orange.

Figure 10 : Répartition géographique de *Ceratitis capitata*.

Figure11 : Les œufs de *C. capitata*.

Figure 12 : la larve de *C. capitata*.

Figure 13 : La puppe de *C. capitata*.

Figure 14 : L'adulte de *C. capitata*.

Figure 15: Cycle de développement de la cératite.

Figure16 : Situation géographique de la station d'étude (El Fhoul).

Figure 17 : photographie de la ferme pilote **Belaidouni Mouhamed**.

Figure 18 : moyennes mensuelles et annuelles des précipitations (2003-2013).

Figure19 : Moyennes mensuelles et annuelles des températures (2003-2013).

Figure 20 : Diagramme ombrothermique de Bagnouls et Gausson (1953) de la station d'El Fhoul (2003-2013).

Figure 21: Climagramme d'Emberger pour la commune d'El Fhoul (2003-2013).

Figure22 : matériels d'élevage et de capture.

Figure 23 : *Thymus capitatus*.

Figure 24: *Tetraclinis articulata*.

Figure 25 : *Daucus crinitus* (*Daucus meifolius*).

Figure 26 : Montage d'hydrodistillation.

Figure 27 : Appareillage soxhlet.

Figure 28 : Evaporation du solvant à rotavapor.

Figure 29 : Plaque Api20E.

Figure 30 : Répartition des trous de ponte selon l'orientation.

Figure 31: Répartition temporelle des infestations.

Figure 32: Effet de l'orientation .

Figure 33 : Effet de la date.

Figure 34 : Cinétique des adultes au cours des différentes dates d'observation.

Figure 35 : Mortalité larvaire au niveau des élevages.

Figure 36 : Durées moyennes des nymphoses aux différentes dates.

Figure 37 : Mortalité nymphale à partir des élevages.

Figure 38: Régression se rapportant au nombre de pupes/larves.

Figure 39: Régression du nombre d'adultes/nombre de pupes.

Figure 40 : Relation entre le nombre d'adultes et celui des larves.

Figure 41 : Aspects macroscopique (récto-verso) et aspect microscopique du genre *Aspergillus fumigatus*.

Figure 42 : Aspects macroscopique (récto-verso) et aspect microscopique du genre *Aspergillus niger*.

Figure 43: Aspects macroscopique (récto-verso) et aspect microscopique du genre *Aspergillus oryzae*

Figure 44: Aspects macroscopique (récto-verso) et aspect microscopique du genre *Penicillium sp1*.

Figure 45: Aspects macroscopique (récto-verso) et aspect microscopique du genre *Penicillium sp2*.

Figure 46: Aspects macroscopique (récto-verso) et aspect microscopique du genre *Fusarium solani*.

Figure 47: Aspects macroscopique (récto-verso) et aspect microscopique du genre *Cladosporium sp.*

Figure 48: Aspects macroscopique (récto-verso) et aspect microscopique du genre *Alternaria sp.*

Figure 49: Aspects macroscopique et aspect microscopique du genre *Trichoderma sp.*

Figure 50: Aspects macroscopique du genre *Rhizopus sp.* et *Aspergillus flavus.*

Figure 51 : Pourcentage des champignons dans les oranges saines et contaminées.

Figure 52: Pourcentages des bactéries sur les oranges saines et infectées.

Figure 53: Développement de *P.italicum.*

Figure 54 : Traitement des oranges non infectés par l'hydrolat sous une température de 16-20°C.

Figure 55: oranges traitées (à gauche) et témoin (à droite) après 15 jours.

Figure 56: Effet de H.E de *T. capitatus* contre *Xanthomonas sp*

Figure 57: Effet de H.E de *T. capitatus* contre *Pseudomonas sp.*

Figure 58: Effet de H.E de *T. articulata* contre *Pantoea sp.*

Figure 59: Effet de H.E de *T. articulata* contre *Xanthomonas sp.*

Figure 60: Effet de H.E de *T. articulata* contre *Pseudomonas sp.*

Figure 61: Effet de H.E de *T. articulata* contre *Borkholdrea sp*

Figure 62: Effet de H.E de *T.articulata* contre *Bacillus sp.*

Figure 63: Effet de H.E de *D. crinitus* contre *Pantoea sp.*

Figure 64: Effet de H.E de *D. crinitus* contre *Xanthomonas sp*

Figure 65: Effet de H.E de *D. crinitus* contre *Borkholdrea sp.*

Figure 66: Effet de H.E de *D. crinitus* contre *Pseudomonas sp.*

Figure 67: Effet de H.E de *D. crinitus* contre *Bacillus sp.*

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Bilan de la campagne de récolte des agrumes de la wilaya de Tlemcen.

Tableau 2 : Superficies Complantées dans la Daïra de Remchi.

Tableau 3 : Caractères macroscopiques et microscopiques des moisissures isolées.

Tableau 4: Pourcentages des moisissures dans nos échantillons.

Tableau 5 : Résultats des caractères morphologiques, culturaux et biochimiques des bactéries isolées de nos échantillons d'orange.

Tableau 6: Pourcentages des bactéries dans nos échantillons.

Tableau 7: Rendements en huile essentielle de *T. capitatus*, *D. crinitus* et *T. articulata*.

Tableau 8: Composition chimique de l'huile essentielle (HE) et de l'extrait d'hydrolat de *Thymus Capitatus*.

Tableau 9: Composition chimique des huiles essentielles de *D. crinitus* et *T. articulata*.

Tableau 10 : Rendements des extraits de *T. capitatus*, *D. crinitus* et *T. articulata*.

Tableau 11 : Composition en acides gras des parties aériennes de *T. capitatus*.

Tableau 12 : Prospection Phytochimique de l'extrait à l'hexane du *T. capitatus*.

Tableau 13: Toxicité des huiles essentielles de *T. capitatus* vis-à-vis des adultes de *C. capitata*

Tableau 14: Toxicité des huiles essentielles de *T. articulata* vis-à-vis des adultes de *C. capitata*

Tableau 15 : pourcentage d'inhibition du développement mécyliat à différentes concentrations d'huile essentielle du *T. capitatus*.

Tableau 16 : pourcentage d'inhibition des extraits de *T. capitatus*.

Tableau 17 : Pourcentage d'inhibition de l'huile essentielle de *T. articulata*.

Tableau 18: Pourcentage d'inhibition des extraits de *T. articulata*.

Tableau 19 : Pourcentage d'inhibition des huiles essentielles de *D. crinitus*.

Tableau 20 : Pourcentage d'inhibition des extraits de *D. crinitus*.

Tableau 21: Moyens des diamètres de détérioration (mm).

Tableau 22 : Moyens des diamètres de détérioration (mm).

Tableau 23: Effet de l'hydrolat sur le résultat de l'acceptabilité sensorielle des oranges .

Tableau 24: Diamètres des zones d'inhibition (mm).

Tableau25: Activité antiradicalaire des extraits de *T. capitatus* à différentes concentrations.

Tableau 26: Activité antiradicalaire de *T. articulata* à différentes concentrations.

Tableau 27: Activité antiradicalaire de *D.crinitus* à différentes concentrations .

Introduction

INTRODUCTION

Du point de vue économique, les agrumes représentent la première production fruitière mondiale avec 95 millions de tonnes produites par an. Le Bassin méditerranéen représente à lui seul 20% de la production mondiale avec 16 à 17 millions de tonnes produites par les 12 pays membres du Comité de Liaison des Agrumes Méditerranéens (CLAM) (**Grissa, 2010**).

L'agrumiculture en Algérie a connu de belles années au lendemain de l'indépendance et notre pays était traditionnellement exportateur d'agrumes jusqu'aux années 80 où les exportations ont cessé, amorçant une chute libre. Actuellement il éprouve des difficultés à satisfaire les besoins de consommation interne. Pour parer à cette situation, des actions doivent être prises et orientées vers la réalisation d'un programme d'extension, de reconstitution, d'intensification et de protection phytosanitaire.

En effet, les jeunes vergers d'agrumes sont particulièrement exposés aux attaques de maladies et ravageurs en raison de leurs poussées végétatives fréquentes ; le contrôle exercé dépend des situations géographiques et des conditions climatiques saisonnières. Il est toujours utile que le planteur se tienne informé de la présence d'organismes utiles dans son verger car ceux-ci sont susceptibles d'atténuer les pullulations de ravageurs (**Aubert, 1997; Vullin, 1997**).

En zone méditerranéenne, ce sont les attaques d'insectes piqueurs suceurs, susceptibles de transmettre des maladies de dégénérescence, qui sont à craindre. Ces ravageurs peuvent se développer rapidement à la faveur d'une nouvelle poussée végétative (**Aubert, 1997 ; Vullin, 1997**).

Dans l'ordre des diptères, on réunit un grand nombre d'espèces parmi lesquelles il existe plusieurs ravageurs ; mais par chance une seule espèce est nuisible : *Ceratitis capitata*. Elle est polyphage, une centaine d'espèces de plantes hôtes ont été dénombrées, parmi lesquelles figurent toutes les espèces fruitières ; pour les agrumiculteurs c'est le ravageur qui cause le plus de pertes fruitières.

En Algérie, les variétés les plus touchées sont les clémentines et les oranges Navel ; lorsque les hivers sont doux et sans pluie, la pullulation des premières générations augmente et les variétés de saison peuvent être ainsi détériorées par les piqures et les pontes (**Kerboua, 2010**). De plus, les piqures de ponte pratiquées par ce phytophage favorisent l'installation de nombreuses souches de cryptogames pathogènes (**Christien et al., 2002**).

INTRODUCTION

Les progrès dans la protection des plantes ont largement contribué à l'augmentation des rendements et à la régularité de la productivité. Faciles d'accès et d'emploi, relativement peu chers, les produits phytosanitaires de synthèse se sont révélés très efficaces et fiables dans un nombre important de cas et sur de grandes surfaces, mais aujourd'hui, l'utilisation systématique de ces produits est remise en question avec la prise de conscience des risques qu'ils peuvent générer pour l'environnement ainsi que pour la santé de l'homme (**Baldi et al., 1998**).

L'agriculture biologique (AB) est une forme de production agricole particulière fondée sur des principes éthiques, tels que le respect du vivant et la recherche de rapports socio-économiques plus équitables ; et techniques, comme le refus d'utiliser des produits chimiques de synthèse (**Savini, 2014**) en mettant en œuvre des systèmes de lutte contre les organismes nuisibles qui utilisent un ensemble de méthodes satisfaisant aux exigences à la fois économiques, écologiques et toxicologiques, en réservant la priorité à la mise en œuvre délibérée des éléments naturels de limitation et en respectant les seuils de tolérance (**Camagref, 2011**).

La toxicité des pesticides vis à vis de la santé humaine (et animale) et sa nocivité sur l'environnement est reconnue depuis longtemps, il est donc devenu nécessaire de réduire l'utilisation des pesticides en adoptant un ensemble de mesures alternatives (rotations, assolements, travail du sol sans labour, diversité des cultures, l'utilisation des produits naturels...) pour limiter le recours aux molécules chimiques.

Les produits dits « naturels » et surtout les extraits de plante ont un usage reconnu depuis l'Antiquité et font actuellement l'objet d'un regain d'intérêt du fait, notamment de l'écotoxicité des pesticides de Synthèse (**Deguine et al., 2008**).

Le premier objectif de notre travail est d'accroître notre connaissance sur les agrumes, leur principal ravageur, *Ceratitis capitata*, avec sa bio-écologie ; d'identifier la microflore dont l'installation est favorisée par les piqûres de ce ravageur ainsi que les différentes méthodes de lutte les plus pratiquées contre ces pathogènes.

INTRODUCTION

Le deuxième objectif est l'extraction des huiles essentielles, des hydrolats et des extraits de solvant de trois espèces de plante médicinales (*Thymus capitatus*, *Tetraclinis articulata* et *Daucus crintus*). Détermination de la composition chimique des fractions légères par CPG-SM et CPG-Ir.

Le troisième objectif de ce travail est l'évaluation des activités biologiques : antibactérienne, antifongique et anti-oxydante des différents extraits des trois plantes afin de trouver des substituts naturels aux pesticides de synthèse.

La présente thèse se subdivise en trois grands chapitres :

Le premier chapitre est consacré à une revue bibliographique concernant la plante hôte, l'oranger *Citrus sinensis* ; ses pathologies et son principal ravageur, *Ceratitis capitata*, avec sa bio-écologie, ainsi que les différentes méthodes de lutte les plus pratiquées contre ce ravageur.

Le deuxième chapitre est une présentation de la région d'étude avec toutes ses caractéristiques bioclimatiques etc..., une description du matériel utilisé, la démarche expérimentale et les méthodes employées pour l'extraction des huiles essentielles et des extraits ainsi que les méthodes d'identification de ces derniers, statistiques utilisées et une description botanique sur les plantes utilisées.

Le troisième chapitre est essentiellement consacré à la discussion des résultats de :

L'étude entomologique : concernant les attaques de *Ceratitis capitata* sur la variété sanguine des oranges *Citrus sinensis*, et l'impact des facteurs écologiques tels que : la date d'observation, l'orientation, l'arbre échantillonné. Les élevages des mouches menés au laboratoire, complétés par le piégeage des adultes, permettent de connaître leur cycle de développement, la dynamique des populations, la nature du parasitoïde et le degré de leur parasitisme ;

L'étude microbiologique qui consiste à déterminer la microflore de nos fruits, et à identifier les genres pour en déduire les agents pathogènes responsables des maladies.

INTRODUCTION

L'étude chimique qui consiste à l'identification des huiles essentielles, des hydrolats et des acides gras des trois plantes aromatiques très utilisées en médecine traditionnelle.

L'étude des activités biologiques in vitro des différents extraits sur les pathogènes isolés des fruits.

L'étude de l'activité antifongique in vivo sur les pathogènes isolées des oranges *Citrus sinensis*.

Enfin une **conclusion générale** permettant de récapituler les plus importants résultats de ce travail.

Etude Bibliographique

PARTIE I : LES AGRUMES

1- Historique :

Les agrumes sont originaires du sud-est asiatique (**De Rocca Serra et Ollitrault, 1992**). Cependant, les données historiques plaident en faveur de l'existence de trois centres de diversification primaire (**Scora, 1988**) :

- le nord-est de l'Inde, les régions proches de la Birmanie et de la Chine, auraient abrité la diversification de *Citrus medica* et l'apparition de *Citrus aurantifolia*, *Citrus limon*, *Citrus aurantium* et *Citrus sinensis* ;
- la Malaisie et l'Indonésie sont citées comme centres d'origine de *C. grandis*.
- le Vietnam, le Sud de la Chine et le Japon seraient les zones de diversification de *C. reticulata* (**Anonyme, 1998**).

La diffusion des agrumes à travers le monde s'est faite très lentement grâce aux grandes découvertes (Les arabes, Christophe Colomb en 1493...) et c'est grâce aux navigateurs anglo-hollandais (1654) que les agrumes furent diffusés dans le monde (**Praloran, 1971 ; Loussert, 1989**).

Le bigaradier, le citronnier et l'oranger ont été introduits dans le Bassin méditerranéen vers la moitié du XIIe siècle, et le mandarinier au XIXe siècle. Le Bassin méditerranéen constitue à présent une importante zone de production pour ces trois dernières espèces.

Le clémentinier a été découvert à Misserghin (Oran) par le Père Clément, mais le mérite de sa diffusion dans les cultures revient au docteur Trabut, fondateur de l'arboriculture commerciale algérienne.

2-Taxonomie :

Les agrumes appartiennent à trois genres botaniques : *Citrus*, *Fortunella* et *Poncirus* (**De Rocca Serra et Ollitrault, 1992 ; Spiegel-Roy et Goldschmidt, 1996**) ; ceux-ci forment avec 10 autres genres (*Atalantia*, *Burkillanthus*, *Citropsis*, *Clymenia*, *Eremocitrus*, *Hespertusa*, *Limnocitrus*, *Microcitrus*, *Pleiospermium* et *Severinia*) la sous-tribu des *Citrinae*. Cette sous-tribu appartient à la tribu des *Citreae*, sous-famille des *Aurantioideae* de la famille des Rutacées.

Le genre *Citrus* renferme la plupart des agrumes cultivés pour leurs fruits ou leurs huiles essentielles. Deux classifications du genre prévalent, celle de **Tanaka (1961)** identifie 156 espèces, tandis que celle de **Swingle et Reece (1967)** n'en distingue que 16 espèces. En référence à cette dernière classification, les huit espèces cultivées sont : *C. sinensis* (L.) Osb., l'oranger ; *C. aurantium* L., le bigaradier ; *C. reticulata* Blanco, le mandarinier ; *C. paradisi* Macf., le pomelo ; *C. maxima* (Burn.) Merr., le pamplemoussier ; *C. limon* (L.) Burm., le citronnier ; *C. aurantifolia* (Christm.) Swing., le limettier et *C. medica* L., le cédratier. Ces espèces renferment un grand nombre de variétés.

Certaines études répartissent ces 8 espèces d'importance économique dans 3 grands groupes en fonction des similarités génétiques. Il s'agit du groupe des orangers et mandariniers, du groupe des pomélos et pamplemoussiers et du groupe des limes et citronniers (**Luro et al., 2001**). D'autres travaux plus récents sur la diversité génétique et la structure des populations des agrumes penchent plutôt en faveur de l'existence de 3 espèces « ancestrales » d'agrumes ; il s'agit du bigaradier (*C. medica*), du pamplemoussier (*C. maxima*) et du mandarinier (*C. reticulata*). Ces espèces seraient à l'origine de nombreuses espèces répertoriées de nos jours, qui en réalité sont des hybrides issus de croisement entre les premières espèces (**Barkley et al., 2006**).

La position taxonomique des agrumes, d'après **Swingle (1948)** se présente comme suit :

Règne : Plantae

Division : Magnoliophyta

Classe : Magnoliopsida

Ordre : Geranal

Famille : Rutaceae

Sous famille : Aurantoidae

Tribu : Citerae

Sous tribu : Citrinae

Genre : *Citrus*

Espèce : *Citrus sinensis* (orange douce)

3-Morphologie :

La forme typique chez *Citrus sinensis* (orange douce) tend à être conique vers le sommet et rétrécie vers la base de l'arbre, avec un tronc droit ; les branches sont longues, compactes et horizontales (Fig. 1). Aussi, les citronniers *Citrus limon* présentent de longues branches qui ont une croissance assez lente ; chez le pamplemoussier *Citrus grandis*, le tronc est large (0.5- 0.75m de diamètre) avec un sommet conique, ce qui confirme que la forme et la croissance des arbres varient selon leur génétique et la manière dont ils sont implantés (soit par ensemencement des graines, soit par greffage) (Praloran, 1971).



Figure 1: Aspect général de la plante (oranger)

3-1- Les racines : Chez les agrumes, le système racinaire occupe plus de 70% de la taille de l'arbre. Les racines ont un pivot qui peut dépasser 2m au-dessous de la surface. Ces racines fibreuses se prolongent généralement bien au-delà de la canopée (écran formé par la partie supérieure de la végétation du verger) (Walter et Sam, 2002).

3-2- Le tronc :Praloran (1971) signale que les agrumes présentent habituellement un tronc presque cylindrique et parfois un aspect de colonnes entre elles.

3-3- Les feuilles: Les feuilles sont simples ou composées, sans stipule, éparses ou opposées (Fig.2). Un de leurs caractères communs est la présence de glandes oléifères qui apparaissent par transparence comme des points translucides. Toutes les parties de la plante possèdent en outre des tissus sécrétant des huiles essentielles, odeurs aromatiques (Courboulex et Lorrain, 1998).



Figure 2: Feuilles et fruits de *Citrus sinensis*

3-4-Les fleurs : Les fleurs des agrumes sont disposées en petites cymes terminales ou plus rarement axillaires de couleur blanche. Elles sont de dimensions très variables non seulement d'une variété l'autre mais aussi d'un arbre à un autre. Chaque fleur se compose d'un calice qui enveloppe les pétales et les sépales (Fig.3); étamine et pistil qui se compose de stigmate, style et ovaire (Somou, 1987).



Figure 3 : la fleur de *Citrus sinensis*

3-5-Les fruits : Les fruits sont sphéroïdaux, robustes et ovales, la taille des fruits est de 4cm de diamètre pour le citron à plus de 25cm pour le pamplemousse (Stone, 1970). En les sectionnant on peut observer (Fig.4) :

- **Un épicarpe :** rugueux, robuste, jaune, qui entoure et protège le reste du fruit. Cet épicarpe est riche en glandes lysogènes qui contiennent une huile aromatique essentielle volatile, d'une saveur citrique, composées de phéllandrène, limonane...

- **Un mésocarpe** : parenchymateux, blanc, consistant, qui est relié étroitement à l'épicarpe, forme la peau ou l'écorce. Le mésocarpe contient quelques glycosides, comme la limanine et la citrine et les flavonoïdes qui déterminent la vitamine P, le glucose et quelques acides organiques tels que l'acide citrique.
- **Un endocarpe** : membraneux qui constitue la chair, une pellicule radiale consistante le subdivise en loges, de dimensions variables selon le cultivar. Les loges contiennent des cellules fusiformes, allongées, riches en sucres solubles, une quantité non négligeable de vitamine C, pectine, fibres et divers acides organiques sont présents tout comme les sels de potassium (Courboulex et Lorrain, 1998).

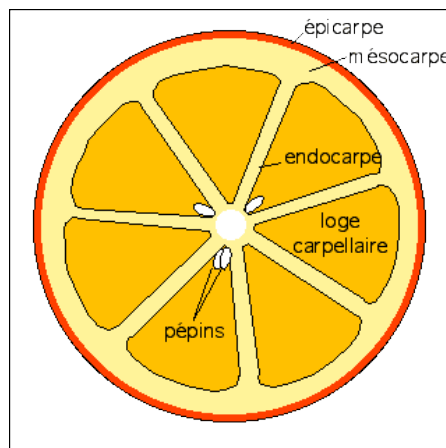


Figure 4 : Coupe transversale d'orange

3-6-Les graines : Les graines proviennent de la transformation des ovules consécutive à la fécondation. La forme générale du pépin est une caractéristique importante, elle permet de préciser toujours, sinon la variété, du moins l'espèce à laquelle appartient la graines examinées (Manner et al., 2005).

4-Reproduction : Selon Praloran (1971), la multiplication des végétaux fait intervenir les processus suivants :

- la reproduction sexuée qui résulte de la fusion du gamète mâle et du gamète femelle ;
- la multiplication végétative qui fait intervenir la capacité d'évolution des cellules peu différenciées comme celles des méristèmes.

De plus, de nombreux agrumes ont la possibilité de donner à côté de l'embryon sexué, des embryons provenant du développement des cellules d'un tissu de l'ovule : le nucelle ; ces embryons correspondent donc à une multiplication végétative particulière.

4-1- La reproduction sexuée : Quand un équilibre s'établit entre le développement des différentes parties végétatives, l'arbre est alors en mesure d'assurer la pérennité de l'espèce par la reproduction.

4-1-1-La floraison : Les agrumes fleurissent au printemps après le repos végétatif plus ou moins marqué de la saison où la baisse de la température nocturne favorise la coloration de ses fruits (**Parfonry, 2001**).

Toutefois, les citronniers fleurissent toute l'année, la floraison du printemps restant la plus importante ; l'arbre porte des fleurs pendant un laps de temps très variable qui dépend particulièrement de l'époque de la montée de la sève, déterminée par la température (**Guignard, 2001**).

4-1-2-La fructification : L'évolution normale, après la fécondation, aboutit au développement de la graine. Cependant, de nombreuses variétés dont les plus importantes du point de vue commercial, sont aspermes ou presque, dépourvues de graines (parthénocarpes). Ces variétés ne produisent pas de graines suite à une dégénérescence de l'ovule ou par suite de non fécondation. Le fruit des agrumes est une baie pluriloculaire. La croissance du fruit s'étend sur les trois quarts de l'année, la floraison a lieu au printemps alors que la récolte des fruits a lieu dès la fin de l'automne et se poursuit pendant l'hiver (**Praloran, 1971**).

4-2- La reproduction asexuée : La plupart des agrumes sont des végétaux très instables du point de vue génétique. L'intérêt de la reproduction asexuée réside dans la possibilité d'obtenir une plante ou l'organe mère, sans modification génétique de celui-ci ; elle est très fréquente en agrumiculture.

On a essentiellement recours au bouturage ou le greffage. Ce dernier mode étant de loin le plus employé, il est basé sur des analogies morphologiques et des affinités physiologiques entre le porte- greffe et le greffon (**Williamson et Jackson, 1994**).

5-Variétés des agrumes :

On distingue trois grands groupes : les Navels, qui sont principalement utilisées en dessert, les Blondes et les Sanguines, qui sont plus particulièrement utilisées en jus.

5-1-Les Navels : Les oranges navels ont à leur extrémité un petit fruit rudimentaire appelé navel ou ombilic qui résulte d'une formation de carpelles additionnels, se développant à l'extrémité de l'axe centrale dans l'ovaire. Ces oranges se différencient par la texture croquante de leur pulpe, la facilité de séparation des quartiers, la bonne qualité gustative et la présence de peu ou pas de pépins, peu adaptées et résistantes au transport, grande productivité aux régions tropicales chaudes et continentales (**Parfonry, 2001**).

- **Oranger Navelina :** variété ancienne, vigoureuse, qui produit à partir du mois d'octobre.
- **Oranger Washington Navel Power :** variété récente dont les fruits très sucrés et peu acides, arrivent à maturité dès le mois d'août.
- **Oranger Navelate :** Cette variété est peu productive mais ses fruits de forme ovale sont très sucrés et se conservent longtemps sur l'arbre.
- **Oranger New Hall Navel :** variété dont les oranges sont parmi les plus savoureuses, la pulpe n'est pas trop acide et assez sucrée.

5-2-Les Blondes : Ce sont essentiellement des oranges à jus, sans pépins.

- **Oranger Valencia Late :** variété dont le fruit dépourvu de pépins est l'un des plus consommés dans le monde. l'arbre vigoureux, de croissance rapide est très productif. Cet agrume est cultivé principalement en Espagne et en Californie.
- **Oranger Calabraise :** variété cultivée principalement dans le sud de l'Europe, elle a la particularité d'avoir une production plus tardive que les autres variétés.
- **Oranger Ovale :** variété aux fruits légèrement allongés.
- **Oranger Hamlin :** variété précoce et assez rustique, dont les fruits de petite taille mûrissent avant les grands froids.
- **Oranger Shamouti :** variété dite de "java" produit des fruits pour la période de Noël.

5-3-Les Sanguines : Les oranges sanguines, ont des pigments anthocyaniques responsables de la coloration de l'épiderme et de la pulpe (rouge), ils n'apparaissent que sous certaines conditions climatiques. (Parfonry, 2001).

- **Oranger Sanguinelli :** variété vigoureuse et très productive. Les fruits ont une pulpe presque rouge.
- **Oranger Tarocco et Moro:** variété cultivée en Sicile. Les fruits sont mûrs en décembre et ont une pulpe de couleur très rouge.

6-Ecologie :

Les Citrus craignent le froid; il leur faut des moyennes annuelles de température de 14°C (10 °C l'hiver et 22°C l'été en moyenne), sans que le minimum absolu puisse descendre au dessous de 0°C; cela explique que la limite de la culture des agrumes ne dépasse pas 41° C à 43°C de latitude dans l'hémisphère Nord et 38° à 40° de latitude dans l'hémisphère Sud.

La culture des agrumes est une culture délicate car les Citrus craignent les vents, surtout les vents chauds et secs. Les coupe-vents sont donc nécessaires, ce qui explique les haies de cyprès dans le Maghreb. Enfin le terrain doit nécessairement être riche, bien drainé et bien arrosé (de 5.000 à 6.000 m³ d'eau à l'hectare).

7-Conservation et maturation des agrumes :

Bien que citrons, oranges et pamplemousses soient présents tout au long de l'année sur les étals, c'est au cœur de l'hiver qu'ils sont les plus savoureux. Quant aux clémentines et mandarines, on ne les trouve que de fin octobre à début avril.

A l'achat, il n'y a pas que l'apparence qui compte, une orange n'a pas besoin d'être parfaitement lisse et ronde pour être juteuse, en revanche un agrume parvenu à maturité dans de bonnes conditions est lourd et son écorce parfumée.

7-1-Conservation :

On redoute lors de la conservation des agrumes l'action des moisissures vertes et bleues du genre *Penicillium*. Ces problèmes sont palliés en conventionnel par trempage des fruits dans du benlate (fongicide) puis par un enrobage de cire à l'orthophenylphenol thiabendazol.

Les agrumes biologiques seront préservés au maximum de ces problèmes si, dès le départ, la cueillette a lieu quand les fruits ont atteint leur qualité optimale sur l'arbre et que les conditions climatiques sont clémentes (absence d'humidité notamment). En d'autres termes, moins les fruits restent sur l'arbre dès lors qu'ils sont prêts à être cueillis mieux ils se comportent lors du circuit de commercialisation. Cependant dans la mesure où la commercialisation n'est pas assurée, la meilleure façon d'éviter que les agrumes ne s'abîment est de les laisser sur l'arbre et non de les stocker en chambre froide.

Les agrumes cueillis pour être entreposés doivent être manipulés avec soin. La peau ne doit pas être blessée (éraflures, coups) et le fruit doit être cueilli lorsqu'il n'est pas mouillé. Il est nécessaire de cueillir les agrumes sur l'arbre en veillant à couper la queue près du fruit.

Les agrumes doivent être entreposés dans un lieu frais et l'on doit vérifier fréquemment qu'aucun fruit ne s'abîme.

7-2-Processus de maturation des citrus :

Le processus de maturation des agrumes quant à la production de sucres, la diminution de l'acidité et l'apparition de la couleur, atteint son optimum quand les variations de températures diurnes et nocturnes sont grandes. L'amplitude des températures joue donc un rôle essentiel dans ce processus.

Les agrumes cultivés dans les régions tropicales restent verts alors qu'ils sont déjà mûrs intérieurement sur l'arbre et possèdent un bon équilibre sucres / acidité.

7-3-L'entreposage frigorifique des agrumes :

La conservation en chambre froide ralentit la transpiration du fruit, inhibe la germination des spores et le développement des champignons et retarde les échanges biochimiques qui conduisent à la sénescence du fruit. Tous ces éléments contribuent à la réduction des pertes post-récolte et à la préservation des qualités intrinsèques du fruit. Les agrumes (oranges et mandarines) ne sont pas des fruits climatériques, ils mûrissent sur l'arbre sans que se produisent des changements importants dans l'intensité respiratoire et la production d'éthylène. La principale cause de détérioration physiologique des agrumes est le stress hydrique provenant de la séparation du fruit de l'arbre lors de la cueillette, sans possibilité de renouveler l'eau perdue à partir de ce moment. La transpiration enclenche un dessèchement, la formation de rides, le ramollissement du fruit anticipant la sénescence.

L'entreposage au froid réduit l'intensité de ces phénomènes, retardant ainsi la sénescence, améliorant la résistance physiologique des tissus aux attaques de champignons et ralentissant l'évolution des pourritures.

Les pourritures les plus fréquentes chez les agrumes après récolte sont la « pourriture verte » (*Penicillium digitatum*) et la « pourriture bleue » (*Penicillium italicum*). Les autres pourritures sont celles produites par les champignons du genre *Botrytis*, *Rhizopus*, *Alternaria*, *Geotrichum*, etc...

8- Les agrumes en Algérie :

La surface des cultures pérennes est de 920.670 ha, les agrumes couvrent actuellement une superficie de 63.296 ha, soit environ 6,8% de la superficie totale occupée par l'arboriculture fruitière (**Biche, 2012**).

Les aires de production des agrumes en Algérie sont localisées sur les plaines du littoral et du sublittoral ; à moins de 400 mètres d'altitude et à pas plus de 50 km du littoral sur des terres riches, car cette espèce est très exigeante en eau.

Les orangers seuls occupent 46.310 ha dont 19.300 ha de Thomson Navel soit 33% et 11.700 ha de Washington Navel soit 20%, 12.300 ha pour la double fine soit 23%, une superficie de 6.440 ha pour la Valencia late soit 11%, et enfin 8.780 ha soit 15% pour les autres variétés. La production totale en agrumes pour l'année 2007 a atteint 689.467 tonnes dont 539.000 tonnes d'oranges, 100.000 tonnes en clémentines plus mandarine et 50.000 tonnes pour le citron et le pomelo, 97% de la production est destinée à la consommation en frais, la transformation est autour de 8.000 t/an.

Les grandes zones de production par ordre d'importance sont la plaine de la Mitidja 44%, Habra Mascara 25%, le périmètre Bounamoussa et la plaine de Saf Saf à Skikda 16% et le périmètre de la Mina et bas Chelif 14%. Le Centre du pays occupe une surface de 39.305 ha d'agrumes soit 62%, l'Ouest représente 26% soit 16.453 ha, l'Est 9,7% représenté par 6.134 ha et 1.404 ha pour le Sud soit 2,2% (**Kerbouaa, 2010**).

Pays exportateur d'agrumes juste après l'indépendance, l'Algérie n'arrive plus aujourd'hui à satisfaire ses besoins nationaux. La région de la Mitidja, classée première dans le pays pour l'arboriculture, représente un chiffre d'affaires de 10 milliards de dinars environ en production totale d'agrumes en Algérie.

A titre comparatif à un pays voisin aussi productif d'agrumes, le Maroc, on constate un léger dépassement de leur part avec une superficie de 74.800 ha représentant environ 10% de la superficie de l'arboriculture fruitière, avec une production totale atteignant 1.324.000 tonnes. Près de 50% de la production est orientée vers l'exportation.

9- Les agrumes à Tlemcen :

La région de Tlemcen comprend 2462 ha d'agrumes plantés en différentes variétés ; soit 8 % de la superficie arboricole de la wilaya, localisés essentiellement dans les périmètres irrigués, alors que la production totale est de 150 290 qx, dont 79% est destinée à la consommation en frais (DSA, 2011).

Ces dernières années, la wilaya de Tlemcen a connu une progression nette dans les superficies plantées grâce aux subventions de l'état avec le programme « PNDA ». Le verger agrumicole de notre wilaya est très hétérogène, il se caractérise par une composition variétale très diversifiée qui se trouve souvent adaptée aux exigences des marchés. Ces variétés se partagent de façon très inégale le verger.

La gamme variétale du groupe des orangers est la plus importante (78,9 %), avec une prédominance des variétés précoces, telles que Washington Navel et le Thomson Navel.

Les clémentiniers suivent de très loin avec 13,3 %, puis arrivent les variétés qui se vendent plus difficilement : les valencia late, les citronniers et les mandariniers.

Le tableau 1 montre le rendement des différentes variétés au cours de l'année 2009-2010 (DSA, 2011).

Tableau 1 : Bilan de la campagne de récolte des agrumes de la wilaya de Tlemcen (DSA, 2011).

Variétés	Superficie totale (ha)	Superficie en rapport (ha)	Superficie récoltée (ha)	Production (qx)
T.Navel	883.00	763.00	763.00	63329.00
W.Navel	384.76	80.00	80.00	9600.00
Cadénéras	09.00	09.00	09.00	950.00
Oranges précoces	1276.76	852.00	852.00	73879.00
Orange com.	230.00	216.00	216.00	13260.00
Sanguine	21.72	21.72	21.72	1588.00
Double fine	131.00	128.00	128.00	8900.00
Orange douce	04.00	04.00	04.00	460.00
Portugaise	66.95	66.95	66.95	4687.00
Oranges tardives	453.67	436.67	436.67	28895.00
Valencia late	165.07	152.07	152.07	12926.00
Total Orange	1895.50	1440.74	1440.74	115700.00
Clémentine	318.50	208.00	208.00	23800.00
Mandarine	23.00	23.00	23.00	1790.00
Citron	166.00	143.00	143.00	9000.00
Total général	2403	1887	1887	150290

Le tableau 2 montre les superficies complantées et les rendements des différentes variétés dans la Daïra de Remchi.

Tableau 2 : Superficies Complantées dans la Daïra de Remchi (DSA, 2011).

Daïra	Secteur	Oranger		Mandarinier		Clémentinier		Citronnier		Total agrumes	
		Su.C (Ha)	Pr.T (QX)	Su.C (Ha)	Pr.T (QX)	Su.C (Ha)	Pr.T (QX)	Su.C (Ha)	Pr.T (QX)	Su.C (QX)	Pr.T (QX)
Remchi	F.P	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	S.P	411	23560	0	0	30	1800	30	1800	471	27160
A/Youcef	S.P	45	1720	0	0	1	50	6	300	52	2070
B/Ouars	S.P	2	120	0	0	0	0	0	0	2	120
ous											
El-Fhoul	F.P	43	900	0	0	5	0	2	30	50	930
	S.P	112	7410	1	60	22	1350	10	600	145	9420
S/Chiouk	S.P	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
h											
Total	F.P	43	900	0	0	5	0	2	30	50	930
	S.P	570	32810	1	60	53	1350	48	2700	670	

F.P : ferme pilote

S.P : secteur privé.

PARTIE II : PATHOLOGIE DES AGRUMES

Les Citrus sont sujets à l'attaque de parasites (champignons, virus et bactéries...) et nécessitent de l'attention.

1-Les maladies cryptogamiques :

Les agrumes sont exposés à une large gamme de maladies cryptogamiques qui peuvent affecter les fruits comme :

1-1-*Aspergillus sp.* : Les pourritures à *Aspergillus sp.* peuvent toucher toutes les variétés d'agrumes; elles se développent préférentiellement en entrepôt lorsque les températures sont supérieures à 15°C. L'espèce *Aspergillus niger*, la plus fréquente, provoque une pourriture molle épidermique et est accompagnée d'une odeur caractéristique de fermentation. Initialement de couleur claire, elle se couvre ensuite d'amas de spores noires (Fig.5).



Figure 5: *Aspergillus sp.* Sur orange

1-2-*Alternaria sp.* : Les spores d'*Alternaria sp.* sont présentes toute l'année dans les vergers; on les retrouve fréquemment dans les entrepôts. C'est un pathogène de blessures (grattages d'épiderme, plaies de coupe du pédoncule), mais il pénètre surtout dans les fruits par les ouvertures naturelles (ombilic, cicatrice stylaire, craquelures de base du pédoncule). Sur l'épiderme, il provoque une pourriture noire, molle, déprimée et entourée d'une bordure brunâtre (Fig.6), qui se développe en entrepôt même à des températures basses. Dans le fruit, il colonise l'axe central et les quartiers ; les tissus noircissent. Cette pourriture interne se développe au verger et en entrepôt ; elle est indécélable à la cueillette. Les oranges Navel, les mandarines et les citrons sont les variétés les plus souvent atteintes.

Les fruits, même faiblement contaminés, sont impropres à la consommation et à la fabrication de jus (Moreau, 1974).

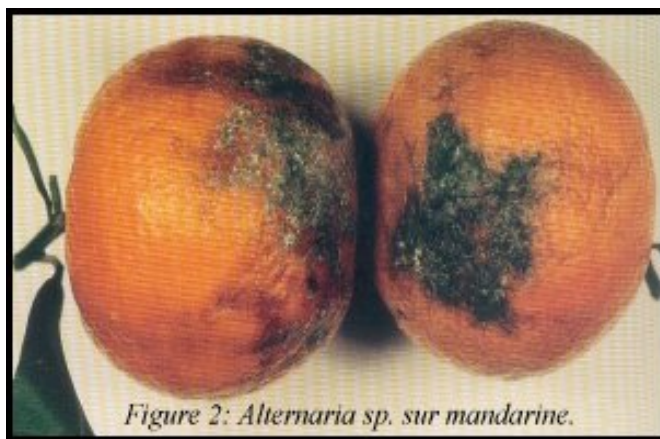


Figure 6 : *Alternaria sp.* sur mandarine (Anonyme, 2000)

1-3-*Cladosporium herbarum* : Ce pathogène est devenu fréquent sur de nombreuses variétés. Il est présent sur différents débris végétaux en décomposition dans le verger et contamine les fruits pendant la cueillette. Son action est similaire à celle d'*Alternaria*, il colonise les blessures d'épiderme et la zone stylaire, l'ombilic des variétés Navel et la base des pédoncules.

Sur la peau, il provoque une nécrose brunâtre, souple, qui se recouvre progressivement d'un mycélium gris-vert. Dans la zone stylaire, il reste superficiel mais les attaques pédonculaires précoces envahissent ensuite l'axe central.

1-4-*Geotricum candidum* : Ce champignon induit l'une des plus importantes et des plus nauséabondes pourritures des agrumes (pourriture amère). Elle s'observe sur toutes les variétés, mais plus fréquemment sur les groupes des citrons et des pomelos.

C'est un champignon du sol qui contamine les fruits tombés à terre ou en contact avec des particules de terre souillant les caisses de récolte, lors des périodes pluvieuses. Les parties atteintes sont rapidement molles, aqueuses et de couleur claire (Fig.7). L'épiderme, les cloisons et les vésicules à jus sont entièrement dégradés, et le fruit se transforme en une bouillie coulante, sale, d'odeur indésirable mais attractive pour les mouches du vinaigre (drosophiles). La contamination s'étend de fruit en fruit, au cours de stockage.



Figure 7: *Geotricum candidum* sur orange

1-5-Penicillium : Ces deux *Penicillium* sont responsables de plus de 80 % des pourritures des agrumes ; toutes les espèces et variétés y sont sensibles. Ces champignons existent dans le monde entier. Ils sont présents en permanence tout au long de la chaîne, depuis le verger jusqu'aux réfrigérateurs domestiques, en passant par les stations d'emballage, les véhicules de transports, les entrepôts, les magasins de demi-gros et les détails. Ces deux espèces sont systématiquement associées, mais leurs biologies diffèrent par leurs modes d'infection et par les symptômes qu'elles provoquent.

1-5-1-Penicillium digitatum : est responsable de " la pourriture verte " des agrumes, ainsi nommée à cause de la couleur de ses spores qui, en fin d'évolution, couvrent la totalité des fruits atteints. C'est strictement un parasite de blessures, ne pouvant pénétrer les épidermes intacts. Les possibilités de contamination au verger existent, mais l'essentiel des infections survient à la récolte, à l'emballage et dans les étapes suivantes de la commercialisation et de la consommation.

Au début, les zones atteintes de l'épiderme s'éclaircissent légèrement, deviennent molles, puis il se développe un fin mycélium blanc vif, à accroissement régulier et circulaire, dont le centre se couvre de spores vertes. En fin d'évolution, les spores vertes recouvrent la totalité du fruit ; l'épiderme, flavedo et albédo, et la pulpe sont entièrement envahis. Dès le début de l'infection, le fruit a une saveur indésirable. Les spores sont facilement transportables par le plus petit mouvement de l'air et colonisent les fruits adjacents blessés. Dans sa progression, *P. digitatum* suit une séquence bien définie, il doit impérativement dégrader le flavedo avant l'albédo et la

pulpe, la preuve en est qu'il ne peut s'attaquer à un fruit pelé superficiellement (flavedo) ayant conservé le seul albédo. *P. digitatum* reste actif aux températures habituelles d'entreposage.

1-5-2-*Penicillium italicum* : est responsable de " la pourriture bleue " des agrumes, ainsi nommée à cause de la couleur de ses spores. C'est un parasite des épidermes intacts, plus redoutable de ce fait que *P. digitatum*. Ses spores sont présentes tout au long de la chaîne, de l'emballage à la consommation. L'épiderme atteint s'éclaircit, devient mou, puis un duvet mycélien blanc apparaît, qui se couvre rapidement de spores bleues. La chair est simultanément contaminée et le fruit, même partiellement atteint, devient inconsommable. Les spores sont facilement transportées d'un fruit à l'autre, et la pourriture se propage aussi directement par contact. Aux températures basses d'entrepôts, son activité est supérieure à celle de *P. digitatum*.

Les deux espèces peuvent cohabiter sur un même fruit, *P. italicum* venant parfois se surimposer à *P. digitatum*, mais jamais l'inverse (Fig.8).



Figure 8 : *Penicillium digitatum* (pourriture verte) et *Penicillium italicum* (pourriture bleue)

1-6-*Trichoderma viride*: C'est un agent fréquent et important des agrumes entreposés. Il colonise de préférence les blessures profondes de l'épiderme. Il induit, autour du point de pénétration, une large zone brune, souple au toucher, qui se couvre progressivement d'un mycélium blanc, ponctué ensuite de petits amas de spores vert émeraude plus au moins foncé. Présent en permanence dans les sols de vergers, il contamine les fruits en contact avec des particules de terre au moment de la récolte. L'odeur des fruits atteints rappelle celle de la noix de coco.

1-7-*Phytophthora sp.* : N'importe quelle espèce du genre *Phytophthora* inféodée aux agrumes peut occasionner ce qu'on appelle communément "la pourriture brune à *Phytophthora*". En principe, les fruits de toutes les variétés peuvent être infectés, mais il existe quelques légères différences de sensibilité. Ainsi les oranges se révèlent être plus souvent atteintes que les citrons ou les mandarines.

Le champignon *Phytophthora* provoque la pourriture des racines, qui empêche l'absorption de l'eau et des minéraux. Ce champignon peut affecter aussi l'écorce et le cambium qui commencent à sécréter une sorte de gomme claire, cette maladie est appelée « gommose » pouvant entraîner des pertes de récolte importantes ainsi que le dépérissement de l'arbre (Christien et al., 2002).

Toutes les espèces de *Phytophthora* provoquent les mêmes symptômes. Ils s'expriment au début par une décoloration ponctuelle de la peau, vert clair sur les citrons non mûrs, brun clair sur les oranges à maturité. Ensuite la zone nécrosée s'étend et se colore de différentes teintes, plus ou moins foncées de brun (Fig.9), selon les fruits.

En entrepôt, un fin feutrage mycélien blanc apparaît dans les zones brunes atteintes.

Au verger, les fruits, surtout ceux situés sur les branches basses, sont infectés par les éclaboussures de pluie ou par les irrigations sous frondaison entraînant les spores.

Au conditionnement, les eaux de lavage sont souvent contaminées. En entrepôt la pourriture s'étend de fruit en fruit par contact.



Figure 9 : *Phytophthora sp.* sur orange

1-8-*Mycosphaerella citri* : Les tâches graisseuses, cette maladie touche les régions chaudes et humides, elle est causée par le champignon *Mycosphaerella citri* responsable des fentes brun-

noirâtres au niveau de la partie antérieure des feuilles et d'autres très petites sur la peau du fruit.

1-9-*Phomopsis citri*: Pourriture brun cannelle puis brun foncé, débutant dans la région du pédoncule vert, puis s'étendant à tout le fruit, ponctuée de petites masses sclérotiques noires. Les tissus sous-jacents ramollissent.

1-10-*Colletotrichum gleosporioides* : Altération brune à contours nets, légèrement déprimée, ramollissement des tissus. La peau semble déshydratée, les glandes sécrétrices apparaissent en creux, comme des pores. À l'intérieur, un mycélium peu abondant, blanchâtre avec des hyphes noirs. Pourriture sèche. Pas de fructification en surface.

2-Les maladies bactériennes :

2-1-La galle : Connue par le nom *Citrus scab*, l'infection provoque une petite bosse sur un côté de la feuille et une dépression sur l'autre côté ; ensuite des pustules brunes vont se former sur la peau du fruit devenant subéreuses pendant leur développement, causées par *Elsinoe fawcetti* (Whiteside, 1975).

2-2-Les tâches noires : *Guignardia citricarpa* ou autrement dit *Phyllosticta citricarpa* est un pathogène très important des citrus spp. Il est présent dans de nombreuses régions agrumicoles (EPPO/CABI, 1997). Il s'agit principalement d'une maladie du feuillage et des fruits, les symptômes de cette maladie ne sont pas observés à l'œil nu et les fruits sont exclus du marché (Manner et al., 2005).

2-3-Citrus canker (le chancre) : Les symptômes de cette maladie se traduisent par des fentes sur les jeunes feuilles et les fruits (Swarup et al., 1991), provoquées par la bactérie *Xanthosomas axonopodis* pv. *Citri* qui rentre principalement par les stomates et les blessures, les lésions soulèvent puis noircissent (Brunings et Gabriel, 2003).

2-4-Citrus greening : Appelé aussi le dragon jaune, provoqué par une bactérie appartenant aux *Liberobacter* ou plutôt *Candidatus*, une bactérie gram négative qui se développe dans l'écorce, les feuilles et les nervures des arbres où le fruit reste de couleur verte d'où le nom « greening » (Hoquelle et al., 1999).

3-Les maladies virales : Parmi ces maladies on trouve :

3-1-Tristeza : Le virus de la *Tristeza* est l'un des agents pathogènes les plus virulents des agrumes qui provoque une croissance retardée, des tiges trouées, des feuilles abimées et des fruits jaunes avec une taille réduite (**Manzanero, 2004**).

Le verger d'agrumes algérien est menacé par une grave virose, en l'occurrence la Tristeza, d'autant plus que le porte-greffe généralement utilisé est le bigaradier, très sensible à cette maladie. Les vecteurs de cette virose sont les pucerons dont les espèces les plus efficaces sont *Toxoptera citricidus* et *Toxoptera aurantii*. Les symptômes connus de cette virose se manifestent sur tronc par des cannelures et des striures et sur feuillage par un jaunissement et la chute des feuilles. Au stade final, l'arbre dépérit et meurt.

3-2-psoroses : Parmi les maladies virales qui s'attaquent aux agrumes en Algérie, les psoroses sont les plus courantes. Les types de psoroses connues en Algérie sont la psorose écailleuse, la psorose alvéolaire et la psorose infectieuse. Les symptômes de ces psoroses se manifestent:

- sur feuilles: par des mosaïques, des chloroses et des gaufrages ;
- sur tronc et branches : par des écailllements de l'écorce, écoulement de gomme et formation de tumeurs ;
- sur fruits : par leur déformation et l'apparition de nécroses annelées sur les peaux qui deviennent grumeleuses. Parmi les maladies à viroïdes sur agrumes, il est connu la cachexie-xyloporose, viroïde qui cause le dépérissement du bois à la suite de nombreuses altérations telles que la décoloration, la perforation et la criblure du bois ; le noircissement, l'écaillage de l'écorce et l'écoulement de gomme.

4-Désordres physiologiques:

4-1-Les fentes des fruits : Observées chez les fruits à peau mince tels que les mandarines, provoquées par le climat, le manque d'irrigation et de fertilisation (**Tucker et al., 1994**).

4-2-Le pourrissement des racines : Causé par l'irrigation excessive des arbres qui résulte du manque d'oxygène dans les racines (**Manner et al., 2005**).

4-3-La carence en minéraux : La pluie et l'irrigation excessives causent cette carence, ainsi que l'utilisation inappropriée des engrais (Vernière et al., 2003).

5-Ravageurs :

5-1-Cochenilles : Ce sont des suceurs de sève redoutables pour les arbres fruitiers. Les cochenilles sont pourvues de glandes sécrétant la cire qui les protège contre les conditions climatiques défavorables et également contre les insecticides. Les sécrétions cireuses forment un bouclier protecteur chez le pou noir et la cochenille virgule. Les œufs sont pondus sous le bouclier ou sous le corps de la mère ou encore groupés dans un ovisac. Les adultes sont peu mobiles ou fixes. Les larves sont mobiles au premier stade, se fixent pour se nourrir et sécréter le bouclier pour se protéger. Le nombre de générations des cochenilles dépend des espèces. Leurs dégâts apparaissent sous forme de jaunissement des feuilles accompagné bien souvent de fumagine. La respiration et la photosynthèse de l'arbre sont fortement perturbées par les encroûtements d'individus et par la pellicule de fumagine. Les fortes attaques entraînent l'affaiblissement de l'arbre, une perte de rendement et des fruits à faible valeur commerciale.

Les mesures prophylactiques contribuent beaucoup à la bonne santé des agrumes. Eviter l'excès d'humidité. Tailler judicieusement pour aérer la frondaison et détruire par le feu le bois de taille fortement attaqué.

La lutte chimique n'est indispensable qu'en cas de forte attaque. Il faut appliquer un traitement insecticide dès l'observation des premières larves mobiles.

5-2-Pucerons: Ils s'attaquent surtout aux jeunes pousses qui s'enroulent, se recroquevillent et ont une croissance ralentie. Quatre espèces de pucerons sont redoutées : *Toxoptera aurantii*, *Aphis craccivora*, *A.gossypi* et *Aphis citricola*. Pour la lutte, il faut intervenir au printemps, dès l'apparition des premières colonies de pucerons à l'aide d'un insecticide.

5-3-Cératite (*Ceratitis capitata*): C'est la mouche méditerranéenne des fruits. Elle s'attaque aux agrumes et aux fruits des rosacées. L'adulte est une mouche colorée dont la femelle pond des œufs groupés par petits paquets, à l'intérieur des fruits, à une profondeur de 2 à 5 mm environ.

La larve est un asticot qui se développe aux dépens de la pulpe des fruits. Les larves, à l'approche de la nymphose, se transforment en pupes et hivernent dans le sol. Le développement de la mouche dépend fortement des conditions de température. L'optimum se situe à 32°C et favorise l'achèvement d'une génération en deux semaines. Les dégâts sont importants surtout en été et en automne. Sur le fruit attaqué, on observe une petite tâche entourant le point de piqûre qui s'agrandit par la suite. Une dépression se creuse en dessous, du fait de la pourriture des tissus du fruit qui tombe prématurément. Pour la lutte contre la cératite, utiliser des pièges (gobe-mouches) appâtés avec des attractifs alimentaires pour déterminer les périodes de vol de l'insecte et raisonner ainsi les applications insecticides.

Le traitement se fait à l'aide d'un insecticide mélangé à un attractif appliqué à raison d'un arbre sur deux ou d'une face sur deux de tous les arbres. L'application peut se faire par voie aérienne.

5-4-Nématodes (*Tylenchulus semipenetrans*): C'est un nématode semi-endoparasite sédentaire inféodé aux citrus. Sa reproduction est sexuée ou parthénogénétique. La femelle pond une centaine d'œufs dans une masse gélatineuse. La durée du cycle est de 6 à 15 semaines.

Les arbres atteints manquent de vigueur, perdent leurs feuilles et montrent un dessèchement des extrémités des rameaux. Sur la partie souterraine, les racelles sont courtes, épaisses et nécrosées. Tous ces symptômes apparaissent progressivement et se traduisent par une forte perte de productivité.

D'autres insectes peuvent causer des dégâts sur agrumes. L'aleurode floconneux, l'aleurode commun ainsi que la mineuse ont causé des dégâts dans le passé. Le traitement chimique contre ces ravageurs n'est pas opérant. La lutte biologique avec les auxiliaires est la plus indiquée.

5-5-Cicadelle blanche (*Metcalfa pruinosa*): Ce nouveau ravageur a été observé en juillet 2012 par une équipe de la SRPV d'Alger sur différentes espèces végétales notamment les agrumes. Les adultes reconnus très polyphages ont été trouvés nombreux sur plus de 300 plants, particulièrement sur les troncs et les branches des arbres en dégageant une pruine et un miellat couverts par la fumagine. Ce mauvais aspect visuel déprécie considérablement la qualité des fruits et affaiblit grandement les espèces végétales qu'il colonise.

Les piqûres d'alimentation peuvent rendre les rameaux cassants et provoquer l'avortement de bourgeons. L'évolution des populations de ce ravageur observées à partir de juillet fait craindre une dispersion rapide touchant les vergers avoisinants.

PARTIE III : PRESENTATION DE LA MOUCHE MEDITERRANEENNE DES FRUITS (*CERATITIS CAPITATA*)

La Mouche méditerranéenne des fruits ou cératite (*Ceratitis capitata* Wied.) est un redoutable ravageur particulièrement polyphage qui s'attaque à plus de 250 espèces végétales. De nombreuses espèces fruitières cultivées peuvent être sujettes à ses attaques (agrumes, pêcher, figuier, abricotier, pommier, poirier, prunier, néflier).

1-Originine :

Les informations concernant l'origine de la cératite sont nombreuses mais restent assez proches les unes des autres. Le spécimen type de *Ceratitis capitata* Wiedmann a été collecté dans l'Océan indien en 1817 probablement sur un bateau transportant une cargaison de fruits collectés à partir d'un port africain.

En effet, **Silvestri (1913)**, **Bezzi (1918)** et **Bodenheimer (1951)** pensent que son foyer d'origine est l'Afrique tropicale et plus spécialement l'Afrique occidentale où vivaient plusieurs hyménoptères parasites indigènes de la cératite. Par contre **Balachowsky (1950)** considère qu'elle est originaire de la région paléarctique sud occidentale notamment du sud marocain, dans la région du Souss.

Selon **Buyckx (1994)**, son origine est plus précisément l'Afrique sub-saharienne à partir de laquelle elle s'est répandue dans les deux hémisphères à une latitude supérieure à 40° au-delà de laquelle la survie de la cératite est limitée par le froid et les températures hivernales.

2-Distribution géographique :

L'aire de répartition de la mouche méditerranéenne des fruits est très vaste à travers le monde. Au cours du siècle dernier, ce diptère s'est dispersé progressivement dans une grande partie du globe en arrivant à gagner des pays lointains tels que l'Amérique du sud, l'Amérique centrale, les îles Hawaii et l'Australie, sa présence est signalée pour la première fois aux Etats Unis d'Amérique (Floride) en 1929 en plein centre citricole.

Cette dispersion rapide est certainement due aux activités diverses de l'Homme tels que le transport des fruits, les voyages touristiques et à moindre degré le vent et les migrations naturelles.

Outre son installation dans tous les pays du Bassin méditerranéen, avec une importante abondance dans la zone littorale et sub-littorale, la cératite se trouve aussi dans toutes les régions tropicales et sub-tropicales du globe (Fig. 10) (Maddison et Bartlett, 1989).

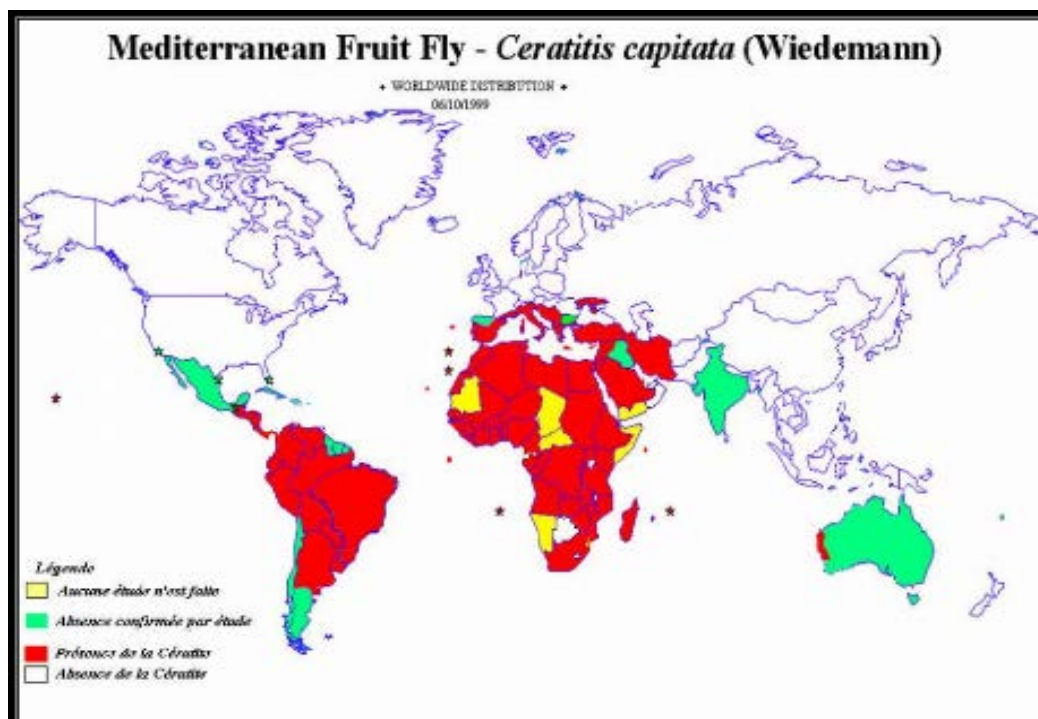


Figure 10 : Répartition géographique de *Ceratitis capitata* (Maddison et Bartlett, 1989)

3-Position systématique :

D'après Dyck et al. (2005), la position de la cératite ou la mouche méditerranéenne des fruits est la suivante :

Embranchement : Arthropodes

Classe : Insectes (Hexapodes)

Ordre : Diptères

Sous ordre : Brachyc res

Famille : Tephritidae

Genre : *Ceratitis*

Espèce : *Ceratitis capitata*

4-Plantes hôtes :

La cératite est connue par sa large gamme de plantes hôtes, elle est le ravageur polyphage le plus dangereux des régions tropicales et subtropicales (**Liquido et al., 1990**). Elle s'attaque à plus de 200 espèces de plantes aussi bien cultivées que sauvages. Ses principaux hôtes se rapportent aux genres:

-*Prunus* (pêcher, nectarinier, abricotier, prunier, ...);

-*Pyrus* (poirier);

-*Malus* (pommier);

-Quelques *Citrus* (clémentinier, oranges.....);

-*Ficus* (figuier);

-*Opuntia* (figue de barbarie);

-et de nombreuses espèces fruitières cultivées telles : coing, fruit de la passion, goyavier, manguier, piment...

5- Description morphologique des différents stades de développement :

5-1-Les œufs : Les œufs sont blancs, allongés et légèrement arqués (Fig.11); leur longueur atteint 1mm et leur diamètre est de 0,20 à 0,25 mm (**Nunez, 1987 ; Elaini, 2003**). Ils sont pondus sous la peau du fruit puis ils éclosent en 2-4 jours (jusqu'à 16-18 jours par temps frais). La femelle perce l'épiderme grâce à sa tarière et dépose ses œufs dans la pulpe à une profondeur de 2 à 5 mm. Le fruit piqué présente à sa surface une petite tâche au point de pénétration de l'oviscapte; cette tâche brunit par la suite; la pulpe devient molle à cet endroit et se déprime à la moindre pression, après éclosion des œufs. Au même endroit, lorsque la piqûre est fraîche, on peut observer un petit cratère de gomme provoqué par la réaction du fruit (**Christenson et Foote, 1960**).



Figure11 : Les œufs de *C. capitata* (Khimoud et Louni, 2008)

5-2-les larves : Elles sont blanches, d'une forme cylindrique, allongées, effilées à la partie antérieure et tronquées à la partie postérieure (Fig.12). Leurs caractéristiques morphologiques (complexe buccal et stigmates) permettent la distinction immédiate des trois stades larvaires chez cette mouche. Leur taille est variable, elle dépend de la qualité et de la quantité de la nourriture ingérée. Celle du premier stade est de 1 mm et celle du troisième stade est entre 6,8 et 8,2 mm (Ronald et Jayma, 1992).



Figure 12 : la larve de *C. capitata* (<http://t0.gstatic.com/images>)

5-3-Les pupes :Elles ont la forme d'un petit tonnelet arrondi (Fig. 13). Elles mesurent environ 5mm de longueur et 2 mm de diamètre, d'une couleur brun clair pour les jeunes pupes et brun foncé pour les pupes âgées (Bodenheimer, 1951 ; Weems, 1981).



Figure 13 : La pupa de *C. capitata*

5-4-L'adulte : L'imago est une mouche de 4,5 à 6mm de long. Il est caractérisé par un mésonotum noir luisant, avec quatre bandes grises, une tête d'un blanc jaunâtre avec une bande brune claire entre les deux yeux qui sont pourpres à reflets dorés (Féron, 1962 ; White et Elson-Harris, 1992).

L'abdomen est brun jaunâtre avec des bandes transversales grises. Les ailes sont larges et présentent trois bandes orangées (Fig. 14). Le mâle et la femelle sont facilement distinguables grâce à deux caractéristiques morphologiques ; le mâle est muni de soies céphaliques orbitales noires et aplaties en lamelle à l'apex, dont le rôle est inconnu. La femelle possède une tarière de ponte bien visible (oviscapte) (Duyck, 2005).



Figure 14 : L'adulte de *C. capitata* (<http://t3.gstatic.com/images>)

6-Cycle de développement de la cératite:

Le cycle de développement de la cératite est résumé dans la figure 15 :

6-1-Ponte et incubation : Les femelles font pénétrer leur ovipositeur jusqu'à une profondeur d'approximativement deux millimètres (**Filippi, 2003**). Elles déposent entre 5 et 10 œufs par fruit. De plus, elles sont capables d'effectuer plusieurs pontes jusqu'à ce que le nombre total d'œufs pondus atteigne 300 à 400 œufs (**Atcitrus, 2002**).

Le trou de ponte est facile à remarquer sur quelques fruits (agrumes et abricots) (**Praloron, 1971**). L'incubation des œufs est de 2 à 5 jours en été et plus de 20 jours en hiver (**Delassus et al., 1931**).

6-2-Développement larvaire : La durée du développement larvaire, qui comprend trois stades (L1, L2, L3), peut varier fortement pour une espèce donnée en fonction du fruit hôte (**Carey, 1984 ; Zucoloto, 1993**). La larve de troisième stade (asticot) quitte le fruit par une brusque détente. Elle retombe sur le sol dans lequel elle s'enfonce pour se nymphoser, donnant alors une puppe. Cette transformation ne dure que quelques heures (**Duyck, 2005**). De cette puppe émerge un adulte qui recommence le cycle à nouveau (**Sadoudi, 2007**).

D'après **Delrio (1985)**, la durée du cycle de développement de la cératite, dans la zone méditerranéenne, varie de 20 jours en été à 2 ou 3 mois en hiver.

7- Dégâts :

Ce ravageur est actif dans les zones côtières de la Méditerranée et de la mer Egée. Le taux des dégâts varie de 5,2 à 78,9%. Les facteurs qui affectent ce taux sont principalement les conditions climatiques et la biologie de l'insecte. Par exemple, les températures extrêmes, basses ou élevées, raccourcissent la durée de vie de la mouche. La mortalité des pupes dans le sol augmente avec une forte humidité.

Pour son alimentation, la mouche méditerranéenne est obligée d'accomplir son cycle en utilisant divers fruits hôtes. En conséquence s'il n'y a pas de fruits mûrs pendant la période active de la mouche, celle-ci est incapable de survivre quoiqu'il arrive (**Koçlu, 2010**).

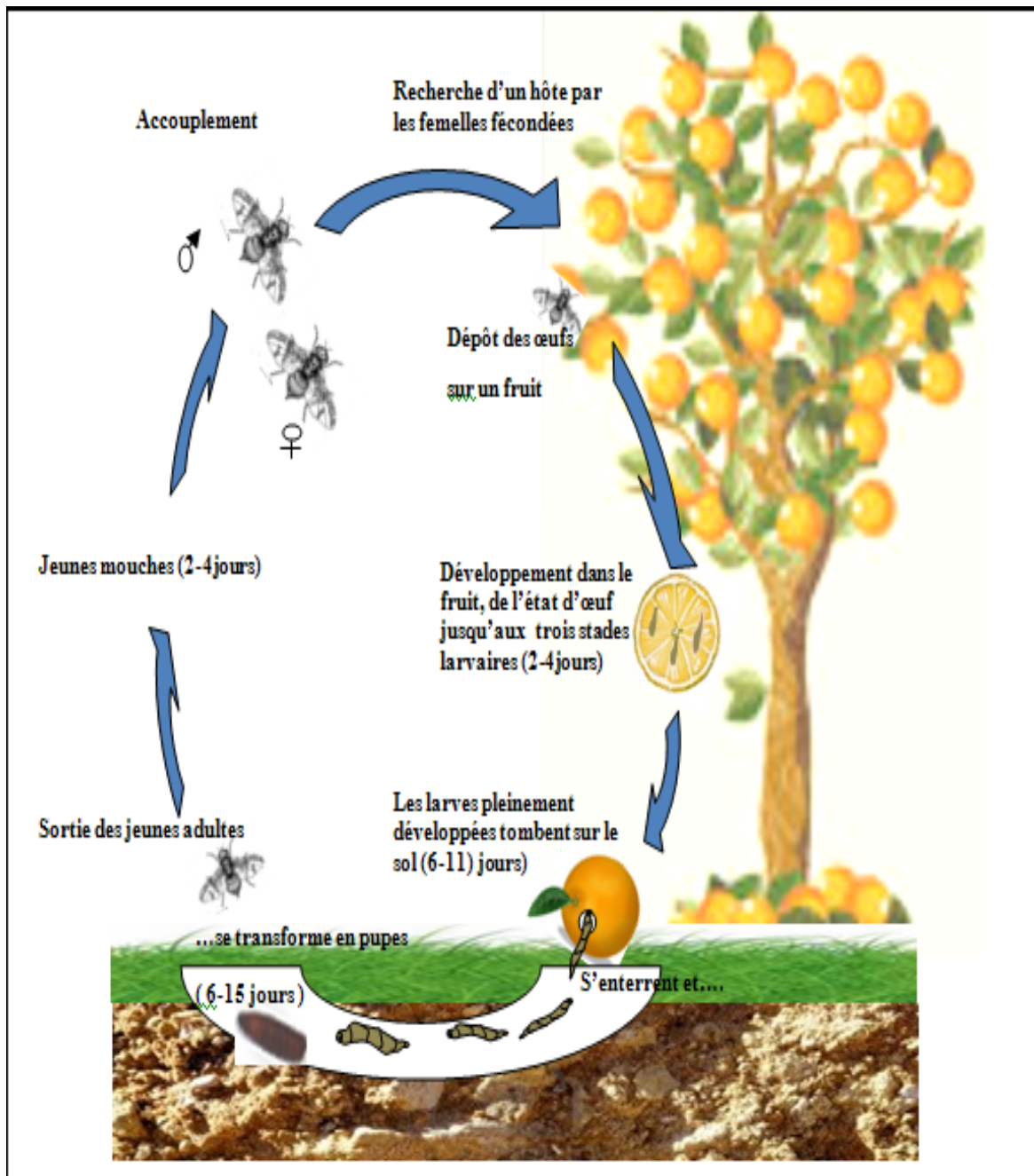


Figure 15: Cycle de développement de la cératite (originale)

PARTIE IV : METHODES DE LUTTE CONTRE LES BIOAGRESSEURS

La lutte contre les ravageurs est au moins aussi ancienne que l'agriculture. En effet, il a toujours été nécessaire de maintenir les cultures exemptes de parasites. Pour maximiser la production alimentaire, il est avantageux de protéger les cultures contre les espèces concurrentes des plantes, et contre les herbivores et phytophages en concurrence avec les humains.

Afin de minimiser les dégâts causées par les organismes nuisibles, un ensemble de moyens et méthodes sont employées, à savoir les produits chimiques ou naturels, car ils sont préjudiciables à l'économie et plus particulièrement à la production agricole.

1-Lutte chimique :

1-1-Lutte contre les moisissures : La lutte contre les maladies cryptogamiques est basée essentiellement sur l'utilisation des produits chimiques appelés fongicides.

Un fongicide est une substance conçue exclusivement pour éliminer ou limiter le développement des champignons parasites des végétaux. Les premiers fongicides systémiques appurent à la fin des années 1960. Ils présentent l'avantage d'avoir une action à la fois préventive et curative ; les produits préventifs empêchent le développement des spores à la surface de la plante, alors que les produits curatifs stoppent le développement du champignon déjà installé dans la plante.

1-1-1-Fongicides utilisés en Algérie:

- **Pelt[®]** : C'est un fongicide polyvalent constitué de thiophanate-méthyl, idéal pour lutter contre le *Botrytis* et l'oïdium des cultures maraîchères et de la vigne, ainsi que la tavelure, l'oïdium et la moniliose des arbres fruitiers. C'est un fongicide à systémie ascendante, absorbé par les feuilles et les racines. Il a une action préventive pour la

destruction du mycélium et une action curative par la stérilisation des formes de fructification du champignon.

- **Aliette® Flash** : Un fongicide formé de fosetyl-aluminium, stimulateur des défenses naturelles de la plante traitée et doté d'une systémie ascendante et descendante. Il est absorbé par les feuilles et les racines, ce qui lui permet d'assurer une protection complète pendant tout le cycle de développement de la plante. Ce fongicide est utilisé dans la ferme pilote d'El Fhoul contre la gommose qui attaque les agrumes. Et aussi contre le feu bactérien et le mildiou .
- **Bayfidan® 312 SC** est un fongicide à base du triadiménol, substance active de la famille des triazoles. Il agit principalement contre la synthèse des ergostérols (IBS) des cellules du champignon pathogène, ainsi que contre la synthèse des gibbérellines.
- En plus de son action par contact, Bayfidan® 312 SC est doté de propriétés systémiques à triple action : préventive, curative et éradiquante. L'assimilation rapide du triadiménol ainsi que sa diffusion translaminaire et acropétale (système ascendante) permettent une efficacité préventive haute et durable contre l'oïdium.
- **Flint®** inhibe les stades précoces du développement des champignons pathogènes : la germination des spores et l'apparition et la mobilité des zoospores. Utilisé contre l'oïdium qui attaque les arbres fruitiers, les cultures maraîchères, la vigne et la tomate.
- **Teldor®** est un nouveau fongicide anti-*Botrytis*. Sa substance active, le fenhexamide, appartient à la nouvelle famille chimique des hydroxyanilides.
- Grâce à son action locosystémique (pénétration et redistribution locale), Teldor® pénètre dans la couche superficielle des tissus et présente ainsi une action préventive contre le champignon.
- **Verita® Flash** est un fongicide associant l'effet de deux substances actives à haute performance technique. Il contrôle différents types de mildiou (*Phytophthora sp*, *Plasmopara sp*, *Peronospora sp*, *Pseudoperonospora sp*).
- **La fénamidone** : nouvelle substance active présentant des propriétés remarquables anti-mildiou. Grâce à sa rapidité d'action et son effet antisporulant, la fénamidone est bien adaptée aux périodes à risque de contamination. En plus de son action pénétrante, son action translaminaire procure une protection à la fois de la face supérieure et inférieure de la feuille.

- **Le fosétyl-aluminium** : une substance active dotée d'une systémie ascendante et descendante. Elle agit préventivement en inhibant la germination des spores ou en bloquant le développement du mycélium des champignons.

En plus de son activité directe sur la maladie, le fosétyl-aluminium stimule les défenses naturelles de la plante (activité indirecte).

1-1-2-Insecticides utilisés au niveau de la ferme pilote d'El Fhoul : Suite à un inventaire effectué avec les ingénieurs de la ferme pilote d'El Fhoul , nous constatons que les ravageurs qui causent le plus de dégâts sont la mineuse, les pucerons, les aleurodes, la cératite, et les acariens. Afin de protéger leurs cultures ils utilisent généralement les insecticides et les acaricides suivants, 14 jours avant la récolte :

- **Imaxi 200SL** : concentré soluble contenant 200g/l d'Imidachlopride appartenant à la famille des Chloronicotiniles. Il agit sur le système nerveux des insectes au niveau des centres de transmission des impulsions nerveuses. Il agit essentiellement par ingestion et par contact et il est doté de propriétés systémiques. Il a une excellente action contre les principaux insectes phytophages tels que : pucerons, mouche blanche, cicadelles, psylles....ces insectes provoquent non seulement des dommages aux cultures, mais ce sont des vecteurs de virus. Cet insecticide se caractérise par une faible toxicité, et un large spectre d'activité sur de nombreux insectes piqueurs-suceurs, les coléoptères, quelque diptères et lépidoptères.
- **Romectin** : est un insecticide acaricide de la famille des avermectines à large spectre d'activité ; il agit par ingestion et contact en plus de son action translaminaire. Il est actif sur toutes les formes mobiles, larves et adultes de mineuses, acariens et thrips des cultures maraîchères, mineuse des agrumes et sur psylle des arbres fruitiers.
- Traiter avec le Romectin dès que les premières formes de dégâts d'acariens ou de mineuses sont visibles, on obtient le maximum de mortalité 3 à 5 jours plus tard et une persistance d'action de 3 à 6 semaines. Ce produit respecte les acariens auxiliaires et s'adapte à la plupart des programmes de lutte intégrée.

2-Lutte biologique :

Les maladies causées par les champignons sont souvent aussi soudaines que tenaces, aussi massives que sévères. Certaines variétés de champignons ont

développé des résistances sous la pression de sélection naturelle ou orientées par les besoins de l'agriculture. L'utilisation répandue des pesticides en agriculture suscite des inquiétudes croissantes quant à leur impact sur la santé et l'environnement. Des recherches visent à trouver des solutions alternatives pour remplacer les traitements chimiques (**Boland et al., 2009**)

Le biocontrôle est un ensemble d'outils utilisables pour la protection intégrée. Il repose sur l'utilisation des mécanismes régissant les interactions entre les espèces dans le milieu naturel. Il compte 4 types d'outils : les macro-organismes invertébrés (insectes, nématodes...), les micro-organismes (virus, bactéries...), les médiateurs chimiques (phéromones...) et les substances naturelles.

2-1- Utilisation des produits naturels pour la lutte contre les bioagresseurs :

Les substances antifongiques et antibactériennes autorisées par l'agriculture biologique sont peu nombreuses; il s'agit essentiellement de quelques substances minérales et de biofongicides, les principaux fongicides utilisés sont ceux à base de cuivre et ceux à base de soufre et ceux à base de bicarbonates.

Le respect des recommandations d'emploi et une bonne maîtrise de l'utilisation des produits lors des différentes étapes de manipulation (transport, stockage, préparation de la bouillie, application, gestion des déchets...) sont indispensables. Ils garantissent la sécurité de l'utilisateur, du consommateur et de l'environnement.

2-1-1- Produits naturels utilisés comme insecticides :

- **Roténone** : insecticide à large spectre, dérivé d'une plante ayant été par le passé, utilisée de manière intensive comme solution de rechange aux pesticides chimiques. Des solutions alternatives plus sûres existent et sont recommandées par beaucoup d'organismes de certification. Toutefois, la roténone est encore souvent employée pour combattre les parasites externes du bétail.
- **Pyrèthre** : produit fait d'inflorescences de chrysanthèmes qui agit comme poison s'attaquant au système nerveux des nombreuses espèces d'insectes suceurs et broyeurs comme les pucerons, les cicadelles, les tétranyques et les doryphores de la pomme de terre.

- **Neem** : répulsif à large-spectre, un régulateur de croissance et insecticide qui peut avoir un effet systémique sur la plante, la rendant désagréable au goût pour les insectes. Il s'est avéré efficace contre le doryphore, le ver de l'épi de maïs, la chrysomèle rayée du concombre, l'altise, le puceron, la mineuse des feuilles, le thysanoptère et la mouche blanche.
- **Huile d'ail** : agit comme un insecticide non sélectif ayant également des propriétés antibiotiques et antifongiques. L'huile d'ail, souvent mélangée avec l'huile minérale, est plus efficace lorsqu'elle est appliquée tôt sur les plants de concombre, mais a un impact limité sur les doryphores.
- **Huile de canola** : maîtrise efficacement les pucerons et les acariens lorsqu'elle est pulvérisée sur différents types de cultures allant de la luzerne à la courgette. Cependant, les producteurs biologiques doivent maintenant s'assurer que l'huile de canola qu'ils utilisent est exempte de contamination par les OGM.
- **Phéromones** : sont soit des substances attractives attirant les insectes utiles soit des substances causant la confusion sexuelle, les phéromones sexuelles femelles employées pour confondre les insectes masculins ont réduit avec succès les populations de pyrales de la pomme dans les vergers biologiques.
- **Savon insecticide** : savons ménagers communs, aident à lutter contre les insectes sans carapace comme les pucerons et la mouche blanche, tuant également les perce-oreilles, les puces, les acariens, les thrips et les tiques.
- **Huiles essentielles** : l'huile essentielle de cannelle a été utilisée pour lutter contre les infestations d'acariens dans les produits comestibles tels que les raisins, les fraises et les patates douces.

2-1-2-Produits naturels utilisés comme fongicides : Actuellement, les fongicides employés proviennent de l'association d'une trentaine de matières actives regroupées en plusieurs familles chimiques, sont également produits à l'état naturel par certains végétaux (ex: l'épervière piloselle, *Hieracium pilosella*).

- **Bicarbonate de soude** : il est prouvé que ce produit empêche le développement de l'oïdium des fleurs ornementales et de certaines variétés de baies.
- **Bouillie bordelaise** : combinaison de sulfate de cuivre et de chaux hydratée, cette poudre (ou vaporisation) agit en tant que fongicide avec des propriétés insecticides et répulsives

pour les insectes et peut permettre de lutter contre l'antracnose, la flétrissure bactérienne, la rouille, l'oïdium, et du feu bactérien.

- **Peroxyde d'hydrogène** : fongicide et bactéricide à large spectre qui peut s'utiliser sur plusieurs cultures comestibles.
- **Produits à base de soufre** : agissent comme fongicides contre l'antracnose, la pourriture brune, les taches des feuilles, le mildiou, la rouille et la tavelure. Ils sont également efficaces pour tuer les acariens.
- **Produits à base de cuivre** : Le cuivre est efficace contre plusieurs maladies, il doit être utilisé comme traitement préventif, lorsque une maladie se déclare, il permet de protéger les nouveaux feuillages mais son utilisation répétée entraîne une accumulation dans le sol. Des excès de cuivre dans le sol sont toxiques pour les microorganismes, particulièrement les vers de terre. L'utilisation abusive de cuivre entraîne aussi des problèmes de résistance des pathogènes (Villeneuve, 2008) donc ces produits peuvent être aussi dommageables pour l'environnement que certains produits chimiques (Caldwell et al., 2005).

Plusieurs produits à base de cuivre (par exemple, le sulfate de cuivre ou vitriol bleu) ont les propriétés herbicides et fongicides. Beaucoup d'organismes de certification biologique limitent cependant l'abus des produits de cuivre.

2-1-3-Produits naturels utilisés comme herbicides :

- **Farine de gluten de maïs** : empêche la formation des racines de beaucoup de mauvaises herbes telles que le pissenlit, rumex crépu, le plantain, le chou gras, le vulpin, la digitale sanguine, et l'amarante et est utilisée comme herbicide en pré émergence sans effet (autre que 10 % d'azote) sur les espèces ayant un système racinaire bien développé.
- **Acide acétique (vinaigre)** : herbicide de contact non sélectif qui peut être efficace pour lutter contre les mauvaises herbes lorsqu'il est pulvérisé de manière dirigée ou à l'aide d'une mèche.

2-2-Utilisation des microorganismes pour lutter contre les ravageurs: La lutte biologique, utilisant des microorganismes antagonistes contre les pathogènes, représente une alternative

prometteuse aux fongicides. Elle pourrait permettre de contrôler la maladie en particulier dans les cas où le pathogène est résistant aux fongicides (**Blond, 2009**).

- **Animaux et insectes utiles** : parasitoïdes, serpents, chrysopes, coccinelles, les moucheron, acariens prédateurs, guêpes, trichogrammes et de nombreuses bactéries parasites sont quelques exemples de la diversité des espèces disponibles pour la lutte contre les ravageurs.
- ***Bacillus thuringiensis* (Bt)** : plus de 35 variétés différentes de cette bactérie ont été employées en agriculture biologique pour lutter contre les larves d'insectes nuisibles. On rapporte des cas de fausse-teigne des crucifères résistantes au Bt. Les producteurs biologiques doivent également être conscients que le Bt peut être produit par l'intermédiaire de manipulations génétiques et que de telles sources sont interdites.
- ***Beauveria Bassiana*** : mycète commun dans le sol qui attaque les jeunes insectes comme les adultes, dont les doryphores, les sauterelles, les pucerons, la pyrale du maïs, la punaise des céréales, la pyrale de la pomme et plusieurs autres espèces.
- **Spinosad** : produit fabriqué par une bactérie vivant dans le sol qui est utile pour lutter contre l'altise et l'arpenreuse dans des cultures de fruits et contre le doryphore de la pomme de terre.
- **Vaporisation de virus** : le virus de la polyédrose nucléaire (VPN) et le virus à granules (VG) sont utilisés à l'échelle commerciale pour lutter contre les légionnaires, les spongieuses et les teignes des pommes de terre.

PARTIE V : METHODES DE LUTTE ET ALTERNATIVES BIO

1- Introduction

De nombreux ravageurs et maladies attaquent les cultures vivrières dans le monde entier; la plupart d'entre eux sont liés à des maladies fongiques pathogènes. Dans le monde, les pertes après récolte ont été estimés à 50% dont une grande partie est due à des infections fongiques et bactériennes (**Magro et al., 2006**). Les moisissures sont des agents biologiques omniprésents qui sont capables de coloniser des aliments en raison de leur capacité de synthétiser une grande diversité d'enzymes hydrolytiques. Ils provoquent des troubles pathologiques chez les plantes, induisant des pertes économiques considérables pour les producteurs de denrées alimentaires.

Les oranges sont très sensibles à la détérioration fongique, à la fois sur le terrain et pendant le stockage après récolte. La croissance fongique sur les fruits frais est responsable de la détérioration des aliments et de nombreuses maladies de plantes, qui conduisent à des pertes économiques importantes. Les moisissures dépendent de facteurs abiotiques tels que le pH, la concentration en soluté, la température, l'atmosphère, le temps, etc. Cependant, les cultures des agrumes sont également vulnérables à la contamination fongique ; *Aspergillus sp.*, *Penicillium sp.*, *Fusarium sp.* et *Alternaria sp.* étant les genres les plus fréquents (**Tabti L., 2013**). Cela provoque une réduction de la qualité des agrumes.

2- Inconvénients des fongicides synthétiques

La première étape dans le domaine de la lutte contre la contamination fongique est l'application des fongicides. Les produits chimiques antimicrobiens tels que les benzimidazoles (par exemple thiabendazole), les hydrocarbures aromatiques (par exemple sodium ortho-phénylphénate) et les inhibiteurs de la biosynthèse des stérols (par exemple imazalil, un inhibiteur de la déméthylation des stérols) ont été

utilisés pendant des décennies dans le contrôle des maladies des plantes en agriculture. Plus récemment, deux autres fongicides, chacun avec mode d'action différent, ont pris de l'importance sur le marché: le pyriméthanil (anilinopyrimidine) et le fludioxonil (phénylpyrrole). L'utilisation indiscriminée et excessive de fongicides dans les cultures est une des principales causes de l'apparition de populations de pathogènes résistants, ce qui entraîne l'utilisation de concentrations plus élevées de ces antifongiques et l'augmentation consécutive de résidus toxiques dans les produits alimentaires. Par exemple, la résistance acquise par *Penicillium italicum* et *P. digitatum* à de nombreux fongicides synthétiques actuellement utilisés sur les agrumes a été démontrée (Fogliata et al., 2001; Cabral et al., 2013). Certains de ces composés ne sont pas biodégradables, ils peuvent s'accumuler dans le sol, les plantes et l'eau, et par conséquent affecter les humains par la chaîne alimentaire. Bien que les traitements chimiques ont été considérés comme le moyen le moins cher et le plus efficace de prévenir les maladies post-récolte, le développement de micro-organismes résistants a réduit leur acceptation (Cabral et al., 2013).

Le type et la concentration des fongicides autorisés pour l'application post-récolte sont limités en raison de leurs effets à long période de dégradation et potentiels sur l'alimentation et la santé humaine (cancérogénicité, tératogénicité, la toxicité aiguë et résiduelle élevée, déséquilibre hormonal et spermatotoxicité). En raison de ces effets indésirables, des études récentes ont abouti à la révocation de l'enregistrement de certains des fongicides plus efficaces. En outre, les préoccupations du public à propos de la contamination des aliments par des résidus fongicides a augmenté de façon significative. Compte tenu de tous ces facteurs, le développement de nouvelles solutions de rechange sécuritaires et biodégradables qui sont à la fois efficaces et économiquement viables est nécessaire (Cabral et al., 2013).

3-Lutte contre les maladies en culture Biologique:

Au cours des dernières années, les préférences des consommateurs se tournent vers des aliments qui contiennent des niveaux inférieurs de conservateurs chimiques et

présentent des caractéristiques plus fraîches et naturelles. Les sels d'acides faibles, tels que le benzoate de sodium et le sorbate de potassium, peuvent inhiber la croissance de plusieurs agents pathogènes fongiques post-récolte. L'utilisation de ces composés pour l'inhibition fongique présente plusieurs avantages tels que leur faible toxicité pour les mammifères, un large spectre d'activité et un coût relativement faible ; cependant, des concentrations élevées de ces composés sont nécessaires pour agir en tant que fongicides, apportant les modifications organoleptiques qui pourraient en résulter. L'utilisation des composés antimicrobiens naturels en combinaison avec des traitements de transformation des aliments doux et des additifs chimiques ont été largement étudiés ces derniers temps.

4- Les extraits de plantes et huiles essentielles

Afin de réduire l'utilisation des 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 l'intérêt de plus en plus, 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, phenylpropanes, 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 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.

5- La composition chimique d'extraits de plantes et des huiles essentielles

Comme mentionné précédemment, le potentiel d'extraits de plantes pour inhiber la croissance fongique dépend de leur composition. En outre, leur efficacité varie en fonction de la nature du solvant utilisé pour l'extraction. En général, il est bien connu que les solvants polaires ont une meilleure capacité de pénétration que celle des non polaires, de sorte qu'ils sont censés extraire une plus grande variété de composés à partir du tissu végétal des extractants non polaires. Cakir et al. (2005) ont constaté que l'acétone et le méthanol sont les meilleurs solvants pour l'extraction de composés antifongiques de *Linarioides hypericum*.

Les huiles essentielles sont constituées de nombreux composés volatils et leur composition varie entre les espèces (Feng et Zheng, 2007). Les différences dans la composition liée à la diversité, la pratique et le traitement agronomique sont également susceptibles d'influencer les propriétés antimicrobiennes, étant donné que ces facteurs contribuent à la fois au profil et aux concentrations relatives des

ingrédients actifs (**Delaquis et al., 2002**). **Oliveira et Furlong (2008)** ont travaillé avec des composés phénoliques et ont conclu que le type de structure phénolique est plus important que la concentration.

Les huiles volatiles sont un mélange complexe de composés, principalement des monoterpènes, des sesquiterpènes et leurs dérivés oxygénés (alcools, aldéhydes, des esters, des éthers, des cétones, des phénols et des oxydes). D'autres composés volatils comprennent des phénylpropènes et des substances contenant spécifiquement de l'azote et/ou soufre. Thymol, eugénol, anéthol, menthol, citral, pinènes, isothiocyanates, cinnamaldhydes, carvacrol, carvone, acide benzoïque, les acides phénoliques et les flavones sont des composés phytochimiques qui ont été particulièrement étudiés pour leurs activités antimicrobienne, bactérienne et fongique.

Par exemple, l'eugénol est un composé phénolique extrait principalement à partir des bourgeons et des feuilles de clou de girofle (*Eugenia caryophyllata* Thumb) et à partir de la cannelle, qui constitue le composant actif le plus significatif de l'huile de girofle (85 à 95%) en plus de l'iso-eugénol et du méthyl-eugénol. Ce composé a été étudié pour ses propriétés antimicrobiennes. **Prakash et al. (2010)** ont observé que l'eugénol, extrait comme composant majeur de l'huile essentielle de *Piper betle* var. magahi, était un inhibiteur efficace sur la croissance des champignons et l'aflatoxine. Ils ont suggéré que les composants restants de l'huile agissent de façon synergique dans le sens négatif et réduisent l'activité de l'eugénol. D'autre part, **Souza et al. (2005)** ont rapporté que *Aspergillus niger* était la souche unique parmi tous les champignons testés qui présentait une résistance à l'eugénol sur toutes les concentrations testées. Dans ce domaine, il ya eu de nombreuses études qui ont tenté d'isoler les composés responsables de l'activité biologique. L'huile essentielle de *Eucalyptus teretecornis* a été soumise à une chromatographie sur colonne pour l'isolement de molécules pures par **Guleria et al. (2012)**. En utilisant l'analyse GC/MS, ils ont constaté que les molécules bioactives correspondent à deux fractions qui sont des terpénoïdes oxygénés β -fenchol et α -eudesmol.

Les extraits de plantes sont composés d'une grande variété de composés chimiques, ce qui rend difficile l'établissement d'une relation entre un composé et un autre dans la cellule cible. Il est prouvé que même les composants mineurs ont un rôle déterminant dans l'activité antimicrobienne, il semble donc que les effets inhibiteurs sont le résultat de leur action synergique. Ainsi, les chances de développement de la résistance chez les champignons après l'application de l'extrait de plante seraient réduites, et le spectre d'organismes sensibles à son action serait plus large. En outre, des mesures pour purifier les composés impliqueraient des coûts plus élevés, de sorte que des extraits de plantes entières semblent plus prometteurs dans l'application commerciale de composés simples.

6- Effets sur la production de mycotoxines

Les aflatoxines sont des toxines fongiques les plus nocives connues; aflatoxine B1 est inclus dans le groupe 1 (considéré comme ayant suffisamment de preuves de cancérogénicité chez l'homme) par le Centre International de Recherche sur le Cancer (CIRC, 2002). En conséquence, de nombreuses recherches ont étudié le potentiel d'antifongiques naturels, soit pour inhiber la croissance de champignons ou aflatoxigènes, soit pour réprimer la biosynthèse des mycotoxines. **Bagheri-Gavkosh et al. (2009)** ont montré que des extraits au méthanol contenant les racines et les parties aériennes de l'éphédra ont inhibé la production de l'AFB1 par *Aspergillus parasiticus*, alors que l'huile essentielle des parties aériennes de la plante ne présentait pas d'effet sur sa biosynthèse.

7- Essais in vivo:

A la recherche d'autres antifongiques à appliquer dans les aliments, une question importante à prendre en compte est la performance in vivo. Bien que le dépistage in vitro d'extraits de plantes soit une première étape importante dans l'identification de plantes potentielles à cet effet, la confirmation in vivo de l'activité est essentielle parce que les matrices alimentaires peuvent interagir avec les composés bioactifs, en diminuant leur efficacité. En général, pour obtenir le même effet dans les produits alimentaires que celui observé dans des essais in vitro, des concentrations plus élevées d'huile essentielle ou d'extraits végétaux doivent être

appliqués. Une explication possible est que, quand ils sont en contact avec la surface des aliments, des substances actives hautement hydrophobes et volatiles sont liées par les composants alimentaires (glucides, lipides et protéines), tandis que les autres composants sont cloisonnés par l'intermédiaire du produit en fonction de leur affinité avec l'eau. Si tel est le cas, des changements indésirables dans la saveur sensorielle peuvent survenir. Il a été suggéré que les lipides présents dans les aliments peuvent former un revêtement autour du micro-organisme, en le protégeant des agents antimicrobiens. En outre, la faible teneur en eau dans l'alimentation par rapport à des milieux de laboratoire pourrait entraver le transfert des molécules antimicrobiennes au site actif à l'intérieur de la cellule microbienne. **El-Mogy et Alsanious (2012)** ont étudié l'efficacité de l'huile d'acacia in vivo contre *Botrytis cinerea* dans les fraises. Cette huile a complètement inhibé la croissance in vitro du champignon, présentant une activité fongistatique à de faibles concentrations et à l'exposition à long terme, ou effets fongicides à des concentrations élevées. Le pourcentage de la pourriture des fruits artificiellement inoculés avec *Botrytis cinerea* et de fruits non blessés a été considérablement réduit par l'application d'huile d'acacia. Les auteurs ont constaté que ce traitement n'a pas affecté les paramètres de qualité organoleptiques.

La tomate (*Lycopersicon esculentum*) est une culture largement commercialisée dans le monde entier, cette plante est très sensible à l'attaque de plusieurs agents pathogènes fongiques, par conséquent, beaucoup de recherches sont consacrées à l'étude de la façon de contrôler les infections de cette plante. **Phillips et al. (2012)** ont montré que l'exposition à un mélange 50:50 d'huile essentielle d'orange et de bergamote n'est pas un traitement antifongique efficace contre *Alternaria alternata* sur les tomates parce que toutes les blessures à la fois du contrôle et de tomates traitées ont été trouvées infectées après 7 jours. **Tzortzakis (2010)** a évalué l'huile d'origan contre la détérioration des fruits de tomate par *Colletotrichum coccodes*, montrant que le traitement par cette huile a supprimé la viabilité des spores de 22%.

Omidbeygi et al. (2007) ont évalué l'activité antifongique des huiles essentielles de thym (*Thymus vulgaris*), la sarriette (*Satureja hortensis*) et de clou de girofle (*Syzygium aromaticum*) in vitro dans la pâte de tomate. Ils ont observé que l'addition de l'huile essentielle a inhibé le développement du champignon testé, *Aspergillus flavus*, avec de l'huile de thym à 350 ppm et la sarriette à 500 ppm. Les résultats de l'évaluation sensorielle ont montré qu'il n'y avait pas de différences significatives entre les échantillons avec 500 ppm d'huile de thym et le contrôle (sans huile essentielle), mais une différence organoleptique significative a été observée pour les échantillons de sarriette et de clou de girofle et le contrôle. **Troncoso et al. (2005)** ont traité le poivron vert avec des extraits de feuille de chou (*Brassica oleracea* var. *Capitata*) et ont constaté qu'une concentration plus élevée était nécessaire pour inhiber complètement la maladie causée par *Alternaria alternata* dans les gousses.

Autres que les fruits et légumes, certaines études ont également été menées dans les grains comme une matrice alimentaire en raison de leur contamination par des champignons communs. **Kumar et al. (2007)** ont constaté que l'huile de *Citri ambrosioides* a été efficace dans le contrôle de la contamination fongique des échantillons de blé quand elle a été testée comme fumigant. **Phillips et al. (2012)** ont montré que le traitement avec le *Citri* réduit la croissance de *Penicillium chrysogenum* et *Aspergillus niger* sur le grain.

La recherche des alternatives antifongiques 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. Pendant ce 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 associé au développement de 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 utilisés dans 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». Il soulève également un avantage économique supplémentaire en raison de la possibilité de fournir une utilisation pour une large gamme de plantes ou mauvaises herbes.

Matériels et Méthodes

1-Présentation de la zone d'étude :

1-1-Situation géographique : La wilaya de Tlemcen s'étend sur une superficie de 902 000 ha, elle se situe au nord-ouest de l'Algérie entre 34° et 35°30 de latitude nord et 1°20 et 2°30 de longitude ouest, à 800m d'altitude; limitée au nord par la Méditerranée, au sud par la wilaya de Naâma, à l'est par la wilaya de Sidi Bel Abbés et à l'ouest par le Maroc (**Figure 16A**).

Notre travail s'est déroulé au niveau de la ferme Belaidouni Mouhamed d'El Fhoul (**Figure 16B**), située à une altitude moyenne de 170 m. Le champ d'agrumes s'étend sur une superficie de 10 hectares dont principalement des orangers de variété sanguine, clémentine, Thomson...etc.

La parcelle étudiée (**figure 17**) a une superficie de 2ha, comportant des orangers *Citrus sinensis* de la variété sanguine, elle est limitée au nord par plusieurs variétés d'agrumes, au sud par des clémentines; à l'est par un champ d'orangers et à l'ouest par un autre verger de la variété sanguine.

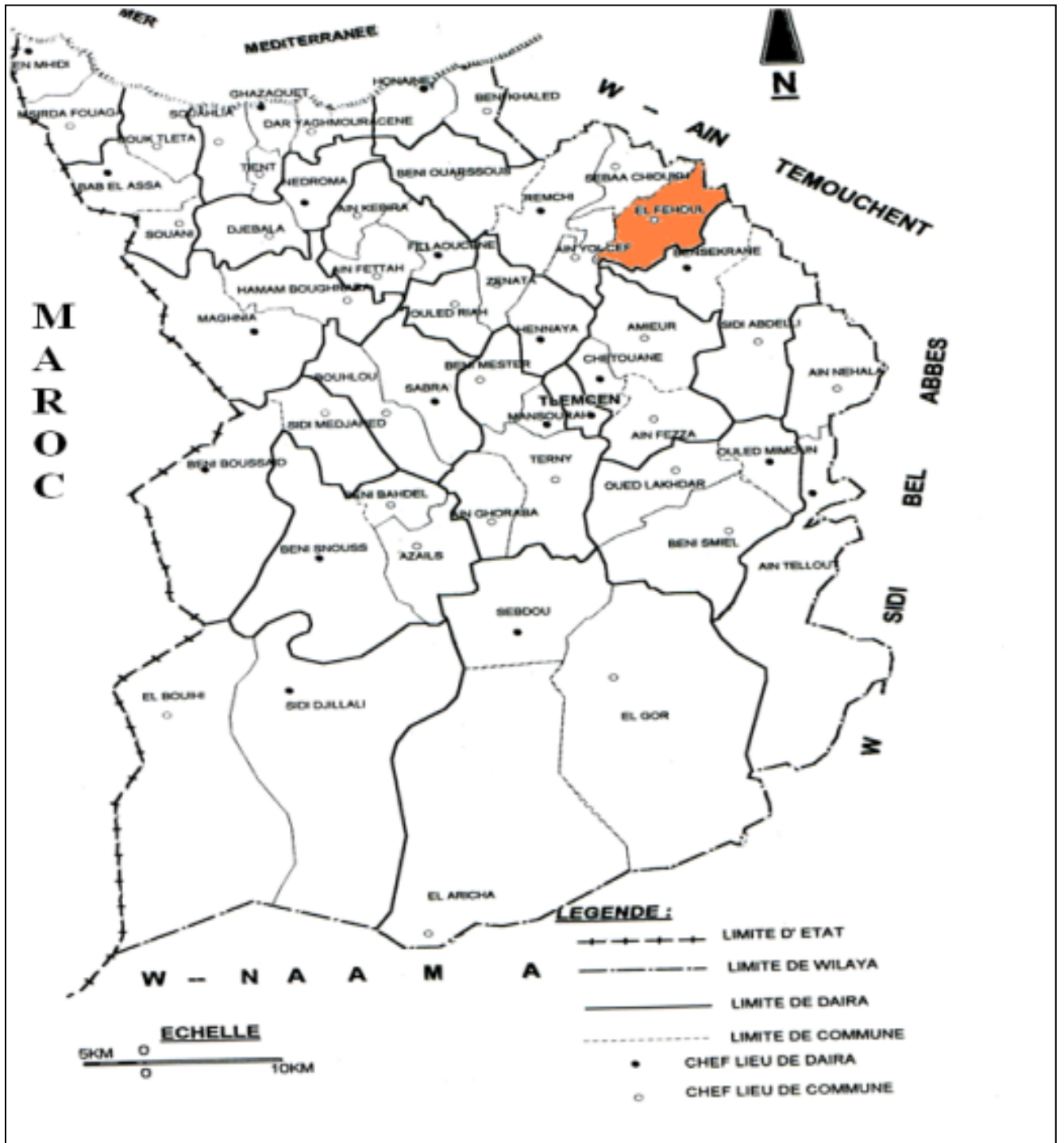
1-2-Etude bioclimatique : Le climat peut être défini comme étant les conditions moyennes qu'il fait dans un endroit donné (températures, précipitations, ...) calculées d'après les observations d'au moins 30 ans (**OMM**).

Notre station d'étude se trouve sous l'influence du climat méditerranéen, ce dernier est un climat de transition entre la zone tempérée et la zone tropicale avec un été très chaud et très sec, tempéré seulement en bordure de la mer, l'hiver est très frais et plus humide (**Daget, 1980**).

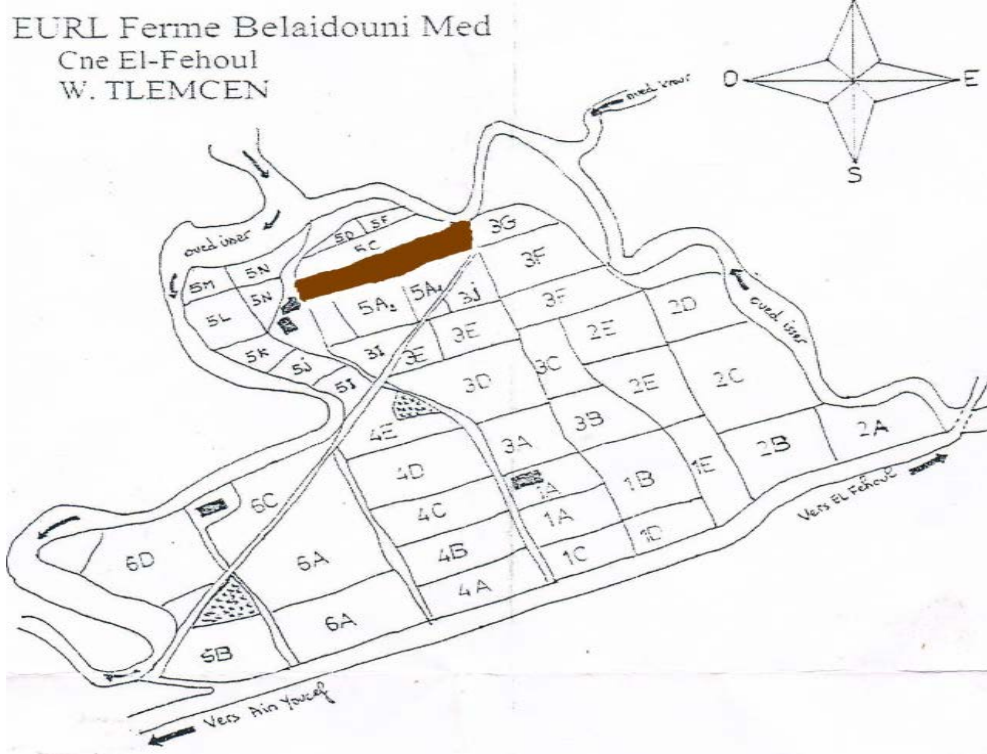
L'étude climatique a pour but de déterminer l'étage bioclimatique du site d'étude à partir du climagramme pluviothermique d'**Emberger (1963)** et la détermination de la période sèche par l'utilisation du diagramme ombrothermique de **Bagnouls et Gaussen(1953)**.

Cette étude a été effectuée à partir des données météorologiques des températures et des précipitations de la station météorologique de Zenata durant la période 2003-2013.

La station de Zenata se situe à proximité de notre station d'étude, ce qui implique qu'elles sont situées dans le même bioclimat, avec une latitude de 35.01 ; une longitude de -1.46 et une altitude de 247m.



A



B

Figure16 : Situation géographique de la station d'étude (El Fhou) (DSA, 2011).



Figure 17 : photographie de la ferme pilote Belaidouni Mouhamed.

1-2-1-Les précipitations : Les précipitations sont toutes les eaux météoriques qui tombent sur la surface de la terre, tant sous forme liquide (bruine, pluie, averse) que sous forme solide (neige, grésil, grêle) et les précipitations déposées ou occultes (rosée, gelée blanche, givre,...). Elles sont provoquées par un changement de température ou de pression.

La tranche ou la lame 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 12 cycles sont représentées par la **figure 18**.

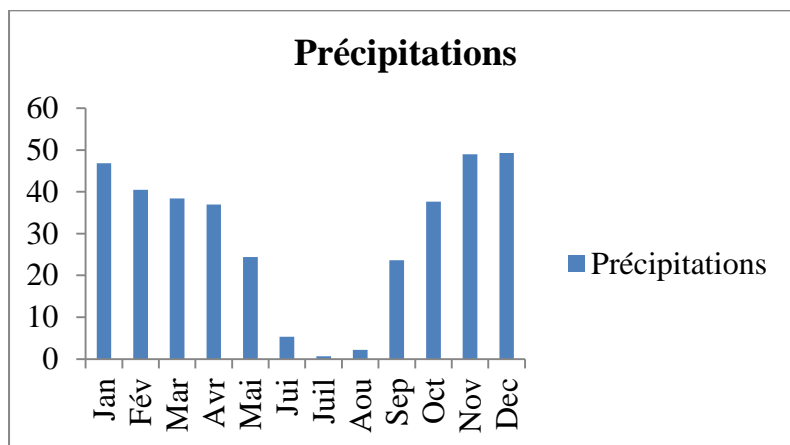


Figure 18 : moyennes mensuelles et annuelles des précipitations (2003-2013).

L'analyse des précipitations pendant la période 2003-2013 montre que janvier est le mois le plus arrosé, juillet étant le mois le plus sec.

1-2-2- Les températures : La température est une grandeur physique mesurée à l'aide d'un thermomètre, elle constitue un facteur écologique fondamental et un élément vital pour la végétation.

Péguy (1970) définit la température comme étant une qualité de l'atmosphère. Les températures moyennes annuelles et mensuelles réagissent directement, en interaction avec les autres facteurs météorologiques : l'insolation, le déficit hygrométrique, les précipitations, le phénomène d'évapotranspiration etc.....

Les températures moyennes mensuelles interannuelles calculées sur la période allant de 2003 à 2013 se présentent comme suit (**Figure 19**).

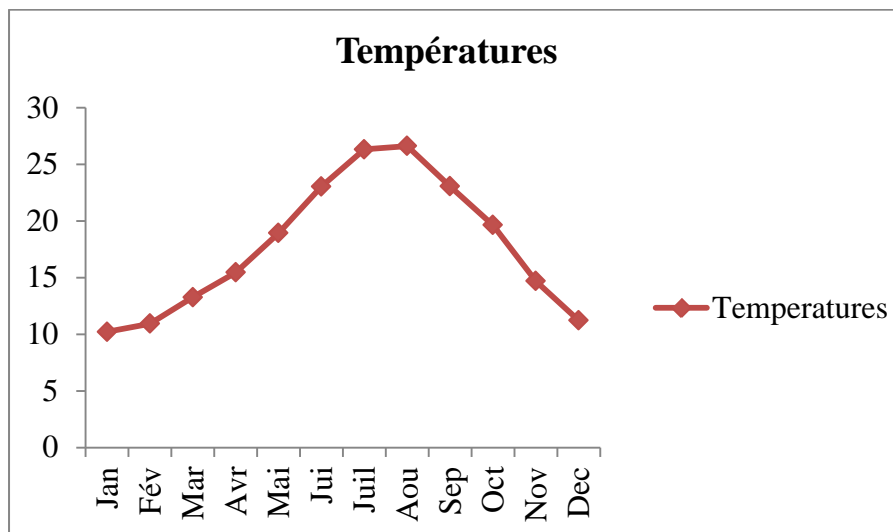


Figure 19 :Moyennes mensuelles et annuelles des températures (2003-2013).

Le mois de janvier représente la température moyenne la plus basse avec 12.1°C ; le mois d'août comporte la température moyenne la plus élevée, 27°C.

1-2-3- Diagramme ombrothermique de Bagnouls et Gaussen (1953) : Un mois est considéré sec lorsque la courbe des températures ($T^{\circ}\text{C}$) est supérieure à celles des précipitations ($P=2T$). La partie du graphe comprise entre les courbes traduit à la fois la durée et l'intensité de la sécheresse. De tels diagrammes établis à partir des moyennes n'ont qu'une valeur indicatrice du régime climatique et du nombre de mois secs.

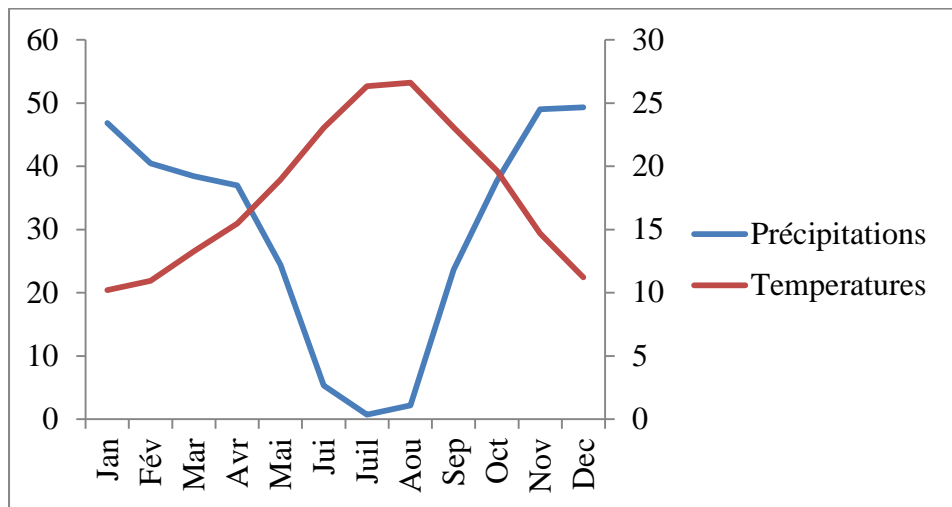


Figure 20 : Diagramme ombrothermique de Bagnouls et Gaussen (1953) de la station d'El Fhoul (2003-2013)

L'examen du diagramme (**figure 20**), montre que la période sèche est de cinq mois et demi, de mai à septembre, elle coïncide avec la saison estivale.

La période pluvieuse, s'étalant sur le reste de l'année, se caractérise par la présence de deux pics pluviométriques (février et novembre).

1-2-4-Quotient pluviothermique et climagramme d'Emberger : C'est le calcul d'indice d'aridité annuelle en tenant compte des précipitations et de la température. Cet indice a pour but la détermination de l'étage bioclimatique.

L'emploi du quotient pluviothermique d'Emberger (Q2) est spécifique au climat méditerranéen ; il a été utilisé avec succès en Afrique du Nord et en France méditerranéenne (**Bestaoui, 2001**), son expression est la suivante :

$$Q2 = \frac{2000P}{M^2 - m^2}$$

P : Précipitation moyenne annuelle en mm.

M : Moyenne des maxima du mois le plus chaud (K°).

m : Moyenne des minima du mois le plus froid (K°).

$$1K = T^\circ + 273$$

En utilisant les deux valeurs « Q2 » et « m », en se référant au climagramme d'Emberger qui définit l'étage bioclimatique.

Les données pour la période 2003-2013 sont :

$$P=290.75$$

$$M=33.5+273.2=306.7 \quad M^2=94064.89$$

$$m=-5.5+273.2=278.7 \quad m^2=77673.69$$

$$M^2-m^2=16391.2$$

$$Q2=35.47$$

Après avoir calculé le quotient d'Emberger, on déduit que notre région d'étude correspond à un bioclimat semi-aride inférieur à hiver tempéré (**figure 21**).

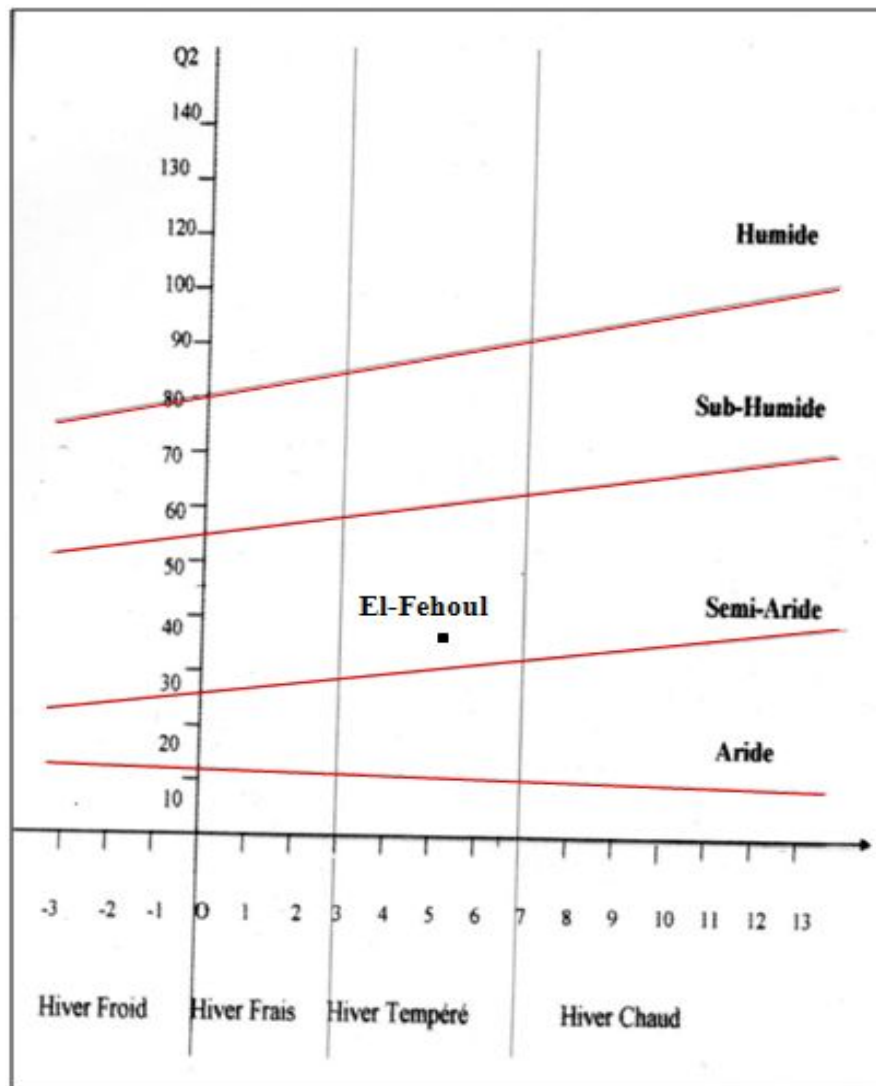


Figure 21: Climagramme d'Emberger pour la commune d'El Fhoul (2003-2013).

2-Matériel utilisé :

2-1 Matériel de piégeage :

- Cinq pièges Jackson (**figure 22 C**);
- Des appâts de Trimédlure (phéromone sexuelle) ;
- Hydrolysate de protéine.

2-2 Matériel d'élevage :

- cuvettes en plastique (**A**) ;

- Sable sec ;
- Eponge mouillée ;
- Substance sucrée ;
- Bocaux (B).



A

B

C

Figure 22 : matériels d'élevage et de capture.

3-Etude parasitologique :

Les principaux caractères étudiés sont :

- Taux d'infestation des oranges par *Ceratitis capitata* estimés à partir des trous de ponte et des fruits chutés.
- Etude bioécologique de ce phytophage dans notre station d'étude, réalisée à partir des élevages effectués au laboratoire.

3-1-Echantillonnage : Les systèmes naturels sont d'une complexité si effarante qu'on ne peut en acquérir une perception acceptable que dans la mesure où les buts de l'étude sont clairement définis (Gaouar et Debouzie, 1991).

Un plan d'échantillonnage adéquat dans le temps, notamment en ce qui concerne les échelles temporelles d'observation et les impératifs du traitement des données est à prévoir en fonction du problème écologique que l'on veut résoudre.

La nécessité de contrôler des surfaces importantes conduit à l'échantillonnage systématique, ce dernier est une technique qui consiste à tirer au hasard une unité $i^{\text{ème}}$ parmi les K premières d'une population à N unités numérotés de 1 à N ; puis on prend à partir du premier élément d'infestation du fruit par ce phytophage : l'arbre échantillonné ; l'orientation ; et la date d'observation.

Douze prélèvements sont effectués au niveau de notre verger de deux hectares, du mois de décembre au mois de mars, date de récolte des fruits ; à raison d'un prélèvement par semaine. Les fruits sont observés à hauteur de portée de 1,5 à 2m.

Les piqûres sont dénombrées sur les arbres pour les fruits non chutés, pour ne pas léser le propriétaire. **Bondenheimer (1951)** a décrit le point de piqûre de la cératite sur citrus, il est facile à remarquer sur les oranges vertes où il présente une zone de décoloration qui le circonscrit. Ce phénomène hâte la maturité (**Fellah, 1996**).

Les points des piqûres sont légèrement soulevés par rapport au niveau de la surface du fruit ou au contraire légèrement affaissés. La tâche finit par s'élargir, devient brunâtre et la chair sous-jacente pourrit. La tâche des piqûres ne renfermant pas d'œufs ou d'individus morts, se cicatrise. La peau se dessèche sous la pourriture (**Fellah, 1996**). Dans notre verger rangé en lignes et en colonnes, nous avons procédé à l'échantillonnage systématique à deux dimensions où les unités (arbres) sont répartis sur une grille rectangulaire virtuelle (échantillons alignés) pour lesquels, non seulement l'abscisse et l'ordonnée du premier point sont tirés au hasard, mais aussi le décalage horizontal et vertical des deux points voisins.

Selon **Debouzie et al. (1987)** ; **Gaouar et Debouzie (1995)** ; et **Gaouar (1996)**, l'échantillonnage systématique est plus apte à détecter les structures spatiales et temporelles des attaques des ravageurs. L'échantillonnage systématique est plus précis que l'échantillonnage aléatoire, il est plus avantageux dans le cas d'une tendance linéaire ; ainsi les données recueillies sont facilement accessibles à l'analyse par une très grande gamme de techniques statistiques permettant d'en extraire le plus d'informations possible.

Dans notre verger (rectangle) qui contient 383 arbres appartenant à la variété sanguine *Citrus sinensis var. sanguinelli*, nous avons choisi une grille rectangulaire de 12 arbres (4 arbres sur l'abscisse et 3 sur l'ordonnée). A chaque date on tire au hasard le premier arbre, les prélèvements

sont effectués de façon à ce qu'il y ait un décalage de deux arbres sur les lignes (abscisse) et un arbre sur les colonnes (ordonnée).

A chaque fois qu'on tire au hasard un numéro de 1 à 12 correspondant à la grille, on le détruit afin d'éviter les arbres déjà échantillonnés dans les prélèvements précédents.

3-2-Capture des adultes : L'information sur l'apparition des premières mouches peut être obtenue au moyen de différents pièges installés dans notre verger.

Nous avons utilisé les pièges Jackson, l'appât utilisé est une phéromone sexuelle avec l'hydrolysate de protéines placé dans un panier en plastique, suspendu au milieu de la partie horizontale d'un fil métallique servant aussi à accrocher le piège sur l'arbre.

Les pièges ont été placés en décembre, à l'abri du feuillage pour éviter l'évaporation trop intense. Nous en avons placé cinq et suivi la dynamique des adultes jusqu'au mois de mars.

Le but de piégeage est de connaître la date d'apparition des premiers adultes, le nombre de générations correspondant à la période d'étude et la nature du parasite ainsi que son taux de parasitisme.

3-3-Mise en élevage : Pour connaître le taux d'infestation au sein de notre verger d'oranger de la variété *Citrus sinensis* var. *sanguinelli*, nous nous sommes limités à l'étude des fruits chutés puisqu'ils ont perdu leur valeur marchande.

Au laboratoire, la méthode est simple, elle consiste à mettre des oranges dans des cuvettes contenant du sable pour permettre l'enfouissement des pupes et des larves issues de ces fruits, une éponge mouillée assure l'hygrométrie nécessaire au développement des différents stades de l'insecte.

Ces fruits sont préalablement observés pour dénombrer le total des larves qui vont nous informer sur les taux de mortalité larvaire et pupal, ainsi que sur les taux d'infestation relatifs à ces stades.

On peut estimer les taux d'infestation à partir des trous de ponte, des larves, ou larve plus pupes plus trous de sortie, représentant le total des larves.

Chaque cuvette est recouverte de tulle pour éviter toute perturbation externe et empêcher les futurs imagos de s'envoler, l'émergence de ces derniers est contrôlée quotidiennement pour les dénombrer

et les nourrir par une substance sucrée (miel industriel + eau) pour les maintenir en vie dans des bocaux, un maximum de temps, afin d'estimer leur longévité aux conditions de laboratoire.

3-4-Etude statistique des données :

3-4-1-Analyse de variance à un critère de classification: Le protocole expérimental a été construit pour tester l'influence de divers facteurs (date, arbre et orientation).

La technique statistique adoptée est l'analyse de variance : compte tenu de l'absence de certaines combinaisons des facteurs, nous avons décomposé l'analyse en plusieurs parties avec des analyses de variance à un ou deux facteurs.

Compte tenu de la méthode d'échantillonnage (ES), l'analyse de variance à un facteur est utilisée pour tester l'influence de la date et de l'arbre sur les trous de ponte et les fruits chutés, car on ne peut les associer tous les deux (à chaque sortie, les arbres échantillonnés ne sont pas les mêmes). L'analyse de variance à un facteur a pour but de comparer les moyennes de plusieurs populations supposées normales et de même variance, à partir d'échantillons aléatoires simples, indépendants les uns des autres.

Le calcul des moyennes permet de définir deux types de variation :

-La variation entre les échantillons ou variation inter S^2_A ;

-la variation à l'intérieur des échantillons mesurée par la variance résiduelle S^2_E ou variance intra ;

-le rapport entre les deux quantités définit la variable F de Snédécour.

L'hypothèse nulle est acceptée si $F_{\text{observé}} < F_{\text{théorique}}$, lu dans la table pour $(P-1)$, $p(n-1)$ degrés de liberté et un risque d'erreur α (5%). Elle est rejetée dans le cas contraire avec un risque d'erreur α (**Dagnélie, 1970**).

3-4-2-Coefficient de corrélation linéaire: Pour savoir s'il existe une liaison entre les larves et les adultes, les larves et les pupes et les pupes et les adultes, nous avons calculé les coefficients de corrélation linéaire, deux à deux. Pour établir une relation d'indépendance X et Y, il suffit de calculer le coefficient de corrélation. Si le $t_{\text{obs}} > t_{\text{th}}$, la corrélation entre les deux variables est jugée significative ; il existe alors une dépendance statistique entre elles.

3-4-3-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 des 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. L'étude statistique est réalisée à l'aide du logiciel Minitab 12.

4-Description des plantes aromatiques utilisées :

4-1-Thymus capitatus : En Algérie, le genre *Thymus* regroupe 12 espèces qui sont : *Thymus fontanesii*, *Thymus commutatus* (Ball.), *Thymus dreatensis*, *Thymus numidicus*, *Thymus guyonii*, *Thymus lanceolatus*, *Thymus pallidus*, *Thymus glandulosus*, *Thymus hirtus*, *Thymus algeriensis*, *Thymus ciliatus*, et *Thymus capitatus* (L.) (Quezel et Santa, 1963).

L'huile essentielle du Thym est caractérisée par un fort potentiel antimicrobien (Cosentino et Palmas, 1999), et par un remarquable effet antioxydant (Dragland et al., 2003). Elle possède une activité antifongique (Ruberto et al., 1993) et acaricide vis-à-vis de *Varroa destructor* (parasite qui affecte les abeilles) (Aviana et al., 2002).

4-1-1-Morphologie : *Thymus capitatus* (Thym, "Zaatar") est une plante spontanée appartenant à la famille des Labiées, raide, dressée, à rameaux étalés. C'est un sous-arbrisseau de 20 à 40 cm de hauteur à feuilles petites linéaires ou linéaires-lancéolées, aiguës, ponctuées-glandulaires. Les fleurs sont roses et visibles de mai à octobre, à odeur très agréable et spécifique.



Figure 23 : *Thymus capitatus*

4-1-2-Utilisation : Le thym est très utilisé en médecine traditionnelle sous plusieurs formes : les feuilles sont utilisées en infusion contre la toux, en décoction pour guérir les maux de tête, hypertension et gastrites, en usage externe comme cicatrisants et antiseptiques (**Le Floc'k, 1983**).

Les feuilles de thym sont riches en huile essentielle dont les propriétés mises à profit en phytothérapie. Elle est très antiseptique et utilisée à ce titre pour soigner les infections pulmonaires. Son action antiseptique s'exerce également sur le système digestif et notamment en cas de diarrhée et il est aussi vermifuge.

4-1-3-Systématique : D'après **Quezel et Santa (1963)**, la systématique de *Thymus capitatus* est la suivante :

Embranchement : Phanérogames ou Spermaphytes

Sous-embranchement : Angiospermes

Classe : Eudicots

Sous-classe : Astéridées

Ordre : Lamiales

Famille : Lamiacées

Genre : *Thymus*

Espèce : *Thymus capitatus* (L.)

4-2-Tetraclinis articulata (Thuja) : De la famille des Cupressacées, *Tetraclinis articulata* (Vahl) Masters (Thuja de Berberie) est géographiquement lié aux trois pays du Maghreb (Maroc, Algérie et Tunisie) puisqu'il couvre plus d'un million d'hectares (**haddad et al.,2006**). C'est la seule espèce représentant ce genre dans l'hémisphère nord (**Boudy 1950**). Il se rencontre aussi dans quelques secteurs très ponctuels, au Sud-est de l'Espagne (région d'Almeria) et sur l'île de Malte (**Achhal A.et al.,1985**).

La majorité de l'aire des tétraclinaies se situe dans l'étage bioclimatique semi-aride tempéré et chaud. Cette espèce se développe aussi dans les domaines sub-humide et aride supérieur, indifféremment de la nature du substrat (calcaire ou siliceux).

4-2-1-Morphologie : *Tetraclinis articulata* (Vahl) Mast ; arbre ou arbuste, souvent petit et buissonnant, rameaux verts et articulés. Feuilles opposées mais paraissant verticillées par 4, en partie soudées à la tige dont chaque entrenœud est entouré par 4 feuilles. Cônes glauques, pruneux, dont les 4 valves sont munies au sommet d'un appendice plat et réfléchi (**Quézel et Santa, 1962**).



Figure 24: *Tetraclinis articulata*

4-2-2-Utilisation : Les forêts de Thuya assurent un rôle très important dans la vie économique et sociale des populations riveraines. Son bois, caractérisé par sa résistance à la pourriture, est utilisé surtout dans le secteur artisanal pour la marqueterie, l'ébénisterie et aussi comme bois de feu. La gomme sandaraque produite par *Tetraclinis articulata* est totalement exportée à l'étranger. Elle est utilisée dans la fabrication de vernis de luxe et en industrie pharmaceutique (**Bellakhadar J., 1997, Boudy P. 1952**).

En médecine populaire, différentes parties sont utilisées principalement pour le traitement des infections intestinales et respiratoires, le diabète et l'hypertension (**Belkhadar J. et al. 1991 ; Ziyat A., 1997**).

4-2-3-Systématique : Classification selon (**Fralish, 2002; Barrero et al., 2003**)

Embranchement:Spermaphyta.

Sous-Embranchement:Gymnospermae.

Division:Pinophyta.

Classe:Pinopsida.

Ordre:Pinales.

Famille:Cupressaceae.

Genre:Tetraclinis.

Espèce: *Tetraclinis articulata*(Vahl)*Mast*

4-3-Daucus crinitus desf. : *Daucus* est un genre appartenant à la famille des Apiacées, regroupant environ 600 espèces qui sont largement distribués dans le monde entier. *D. carota* ou la carotte est la principale espèce de ce genre, et sa forme cultivée, *Daucus carota ssp. sativa*, est la racine la plus populaire dans le monde. Les carottes ont été rapportés être doté de propriétés médicinales, c'est à dire, hypotenseur, diurétique, carminative, stomachique, et hypolipémiant (Gilani et al., 2000; Kumarasamy et al., 2005; Nicolle et al., 2004), en plus des propriétés de son huile essentielle qui est régénératrice hépatocellulaire, dépurative hépato-rénale, tonique, stimulante, neurotonique et hypertensive (Anonyme 2008). En Algérie, le genre *Daucus* est représenté par les espèces vivantes dans les zones arides et incultes et, parmi ceux-ci, *D. crinitus Desf.* syn. *D. meifolius Brot.*, sont répandus le long de la côte ouest de l'Algérie Tlemcen à Mascara (Lamarck M. et Poiret JLM). *D. crinitus* est caractérisé par la présence de nombreuses sous-espèces qui colonisent les sables et falaises (Quezel et Santa, 1963; Sáenz Laín, 1981).

4-3-1-Morphologie : C'est une plante pérenne, de 24-115 cm, dressée, ramifiée ou non au niveau de la base. Dans ce genre, *D. crinitus* est différente des autres espèces, la caractéristique morphologique observée au niveau des feuilles, qui sont disposées alternativement, sauf chez *D. crinitus*, elles apparaissent pseudo verticillées. (Quezel et Santa, 1963; Sáenz Laín, 1981).

4-3-2-Utilisation : Une enquête menée par les herboristes a montré que, dans la médecine populaire, une boisson faite à partir des racines de *D. crinitus* est utilisé en décoction à expulser le placenta après l'accouchement, et ainsi comme tonique.



Figure 25 : *Daucus crinitus* (*Daucus meifolius*).

4-3-3-Systématique : La systématique la plus récente de l'espèce suit la hiérarchie de systema naturae 2000 (brand S.J.1989-2005 ;Botineau M.,2010)

Règne : Plantae ;

Sous règne : Viridiaeplantae

Embranchement : Trageophyta

Sous embranchement : Euphyllloptina

Infra emmarchement : Radiatopses

Classe : Magnoliopsida

Sous classa : Cornidae

Ordre : Araliales

Famille : Apiacae

Sous famille : Apioideae

Tribu : Caucalidea

Genre : *Daucus*

Espèce : *Daucus crinitus*

Synonyme : *Daucus meifolius*.

5- les extractions :

5-1-Préparation des huiles essentielles :

5-1-1-L'hydrodistillation (HD) : C'est la méthode la plus couramment employée pour l'extraction d'une huile essentielle [Meyer-Warnod, 1984] ; dans son principe, elle correspond à une distillation hétérogène. Le procédé consiste à immerger la matière végétale dans un bain d'eau; l'ensemble est ensuite porté à ébullition, à pression atmosphérique. Sous l'effet de la chaleur, les molécules odorantes contenues dans les glandes sécrétrices des végétaux sont libérées sous forme d'un mélange azéotrope. Bien que la plupart des constituants aient des températures d'ébullition supérieures à 100°C, ils sont entraînés mécaniquement avec la vapeur d'eau. Le refroidissement par condensation conduit à la séparation du mélange eau-huile essentielle par décantation.

Le système « Clevenger », préconisé par la pharmacopée européenne [Pharmacopée Européenne, 1997], permet le recyclage de la phase aqueuse du distillat dans le bouilleur par cohobage [Clevenger, 1928]. Ainsi, l'eau et les molécules volatiles sont séparées, par leurs différences de densité, dans l'essencier en une phase aqueuse (hydrolat) et une phase organique surnageante (huile essentielle) (Bagard, 2008). La durée d'hydrodistillation, de trois à six heures en fonction de la matière végétale à traiter, peut avoir une influence sur le rendement en huile essentielle et sur sa composition chimique.



Figure 26 : Montage d'hydrodistillation

5-1-2-Calcul du rendement : Après que les quatre heures sont écoulées l'huile essentielle sera récupérée dans un pilulier fermé hermétiquement et le rendement sera calculé selon la formule suivante :

$$\text{Rdt} = \frac{P_2}{P_1} \times 100$$

P₁: poids de la matière végétale ;

P₂: poids de l'huile essentielle.

5-2-Préparation des extraits à base de solvants : L'extraction par Soxhlet est une méthode simple et convenable permettant de répéter infiniment le cycle d'extraction avec du solvant frais jusqu'à l'épuisement complet du soluté dans la matière première. Le schéma d'un appareil Soxhlet est représenté sur la **figure 27**.

Il est composé d'un corps en verre, dans lequel est placée une cartouche en papier-filtre épais (une matière pénétrable pour le solvant), d'un tube siphon et d'un tube de distillation. Dans le montage, l'extracteur est placé sur un ballon contenant le solvant d'extraction. Le ballon est chauffé afin de pouvoir faire bouillir son contenu. La cartouche contenant le solide à extraire est insérée dans l'extracteur, au dessus duquel est placé un réfrigérant servant à liquéfier les vapeurs du solvant.

Le ballon étant chauffé, le liquide est amené à l'ébullition, les vapeurs du solvant passent par le tube de distillation et rentrent dans le réfrigérant pour être liquéfiées. Ensuite, le condensat retombe dans le corps de l'extracteur sur la cartouche, faisant ainsi macérer le solide dans le solvant.

Le solvant condensé s'accumule dans l'extracteur jusqu'au niveau du sommet du tube-siphon, suivi par le retour dans le ballon du liquide de l'extracteur accompagné de substances extraites. Ainsi le solvant dans le ballon s'enrichit progressivement en composants solubles. L'extraction continue jusqu'à l'épuisement de la matière solide chargée dans la cartouche.

Les extractions sont réalisées par épuisements successifs de la poudre végétale à l'aide de solvants de polarité croissante.

Les solvants utilisés dans cette étude sont : l'hexane, chloroforme, l'éthanol, éther de pétrole et l'eau.



Figure 27 : Appareillage soxhlet

La séparation du solvant de l'extrait est faite à l'aide de l'appareil appelé Rotavapor (**Figure 28**).

Dans cet appareil on réalise une évaporation sous vide en utilisant une pompe à vide avec une vanne de contrôle. Pendant l'évaporation le ballon est mis en rotation et plongé dans un bain liquide chauffé. L'appareil est muni d'un réfrigérant avec un ballon-collecteur de condensat. La rotation du ballon crée une surface d'échange plus grande et permettant donc d'effectuer une évaporation rapide.



Figure 28 : Evaporation du solvant à rotavapor

5-3-Extraction des acides gras et des insaponifiables :

5-3-1-Préparation des échantillons : Les échantillons (racines, feuilles et tiges) ont été séchés à l'air et broyés jusqu'à l'obtention d'une poudre très fine ($\phi = 0.355-0.600$ mm). 50 g de chaque organe ont été extraites avec 2x200 ml de méthanol et d'éther de pétrole sous reflux (soxhlet), séparément. Après évaporation du solvant sous pression réduite, les extraits ont été rassemblés et séchés sur MgSO₄.

5-3-2-Extraction des insaponifiables : 1 g d'extrait d'éther de pétrole est saponifié avec 50 ml de solution d'hydroxyde de potassium méthanolique (2 mol/L), pendant 1 h sous reflux; les composants de l'insaponifiable sont ensuite extraits trois fois avec 100 ml d'éther. Les extraits sont rassemblés et lavés trois fois avec 50 ml d'eau déminéralisée. Le solvant est ensuite éliminé à 35 °C sous pression réduite avec un évaporateur rotatif puis pesé.

5-3-3-Extraction des acides gras : La solution savonneuse aqueuse obtenue précédemment est acidifiée avec du HCl 1N, jusqu'à précipitation des acides gras (pH 5-6). Les acides gras libérés sont extraits à l'éther (3x 50mL) et séchés sur MgSO₄ puis pesés. Les acides gras sont transformés en leurs dérivés ester méthylique par l'ajout d'une solution méthanolique de BF₃ à 10%. Par la suite, les acides gras sont extraits trois fois avec 50 mL d'hexane à température ambiante. La couche organique est évaporée et séchée sur Na₂SO₄.

5-3-4-Calcul du rendement : Le rendement est le rapport de la quantité de l'extrait recueillie après extraction sur la quantité de la biomasse, exprimée en pourcentage.

$$\text{Rdt (\%)} = \frac{\text{P1} - \text{P2}}{\text{P3}} \times 100$$

P1 : poids du ballon après évaporation ; **P2 :** poids du ballon avant évaporation (vide);

P3 : poids de la matière végétale de départ.

6-Etude microbiologique :

6-1-Prélèvement des fruits pour l'étude microbiologique : Au sein du verger, des arbres ont été choisis au hasard afin de cueillir quelques fruits et feuilles destinés à l'étude microbiologique, menés dans des sacs en plastique stériles nous essayons d'attraper le fruit et le mettre dans le sac sans le toucher

avec nos mains pour éviter toute sorte de contamination, nous voulions isoler que la microflore de l'oranger. Les sacs sont fermés hermétiquement et transportés au laboratoire pour analyse.

6-2- Etude mycologique :

6-2-1-Isolement des moisissures pathogènes de l'oranger : Les méthodes de mise en évidence les moisissures présentes sur les produits alimentaires ont fait l'objet d'un grand nombre de travaux et publication (Cole et Kendrish, 1981).

- La méthode directe (Ulster) met en évidence les moisissures de surface ;
- La méthode de dilution met en évidence les moisissures de surface et de profondeur.

Nous avons utilisé la méthode de dilution, 1g d'orange broyés à l'aide d'un mortier est additionné à 45 ml d'eau physiologique ce qui correspond à la dilution 10^{-1} . Ensuite 1 ml de cette dernière est ajouté à 9 ml d'eau physiologique pour avoir la dilution 10^{-2} . A partir des dilutions 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , quatre boîtes de chaque dilution sontensemencées sur milieu PDAA avec 1ml d'inoculum étalé en surface. L'incubation se fait à $25\pm 1^{\circ}\text{C}$ pendant 5à7jours.

L'acidification du milieu PDA par l'ajout de l'acide lactique (25%) à raison de 1 ml par flacon jusqu'à un pH de (4,5-5) a pour but d'empêcher le développement des bactéries.

6-2-2-Purification des souches fongiques isolées : Nous avons procédé à une purification de différentes souches issues des deux méthodes en appliquant plusieurs repiquages successifs sur milieu PDA acidifié pour les moisissures, jusqu'à l'obtention d'isolats purs. Ces derniers sont repris sur des tubes de PDAA inclinés et incubés à $25\pm 1^{\circ}\text{C}$, pendant une semaine ou plus, puis les tubes sont conservés à 4°C .

6-2-3-Identification des moisissures isolées à partir des orangers : L'identification est une étude corrélative entre les caractères macroscopiques qui comportent les critères suivants : texture et couleur du thalle, couleur du revers de la boîte de pétri, présence de pigment diffusible et l'odeur. Et les caractères microscopiques qui sont mise en évidence par deux méthodes.

6-2-3-1-Méthode du scotch : Les caractères microscopiques sont observés grâce à la méthode du scotch qui est la plus facile à utiliser, les lames stériles contiennent quelques gouttes de bleu coton pour l'observation microscopique aux grossissements x10, x40, x100.

Les genres sont déterminés par les caractères macroscopiques et microscopiques en se référant au manuel de **Barnett, Hunter(1972)** et **Breton in Larpent (1990)**.

6-2-3-2-Méthode de microculture : Nous avons procédé à la méthode de microculture (**Haris, 1989**) où le milieu de culture préparé à base de pomme de terre est coulé généreusement dans une boîte de pétri pour éviter la déshydratation. Après solidification nous découpons des carrés de 1 cm², chacun est déposé sur une lame stérilisée auparavant et inoculé des spores de la moisissure à identifier surmonté d'une lamelle. L'ensemble est déposé sur un support mis dans une cuvette rempli à moitié d'eau et couverte du papier. Incuber à 28°C+ou- 4°C pendant 48 à 72 heures.

Une goutte du bleu coton est mise sur une lame stérile pour permettre le gonflement du mycélium collé sur la lamelle enlevée du PDAac. L'observation se fait à x10, x40, x100.

Après avoir identifié les genres, les souches sont envoyées à un laboratoire de biologie moléculaire en Tunisie pour une identification plus avancée.

6-3- Etude bactériologique :

6-3-1-Isolement des bactéries pathogènes de l'oranger : Nous avons procédé à la méthode de dilution, celle qui a été utilisé pour l'isolement des champignons. A partir des dilutions 10⁻¹, 10⁻², 10⁻³, 10⁻⁴, quatre boîtes de chaque dilution sontensemencées sur milieu gélose nutritive , et incubées à 30°C +ou-4°C pendant 24 à 48 heures.

6-3-2-Purification des souches bactériennes isolées : Après incubation, chaque aspect représente une bactérie qui seront calculées puis purifiées en les réensemencant sur une nouvelle boîte de gélose nutritive. Plusieurs repiquages sont fait jusqu'à l'obtention des isolats purs, Ces dernières sont repris sur des tubes de GN inclinés et incubés à 25C° pendant 24h. Puis passer à l'identification.

6-3-3-Identification des bactéries isolées à partir des orangers : L'identification des microorganismes ne peut être conduite que sur une souche isolée à l'état pure. Les souches bactériennes isolées, à partir du milieu GN et purifiées, sont identifiées sur la base des caractères morphologiques, culturaux et biochimiques.

6-3-3-1- Caractères morphologiques:

a-Etat frais : permet l'observation de la forme, du mode de regroupement et de la mobilité. Cette technique doit obligatoirement être réalisée à partir d'une culture jeune, présence éventuelle de spore. L'observation se fait au microscope optique (Grossissement x100) pour les différentes lames préparées pour chacune des colonies isolées.

b-Coloration de Gram : La coloration de Gram est la méthode de coloration la plus utilisée en bactériologie; elle permet de colorer les bactéries et de les distinguer à l'examen direct par leur aptitude à fixer le violet de gentiane (Gram +) ou la fuschine (Gram -). L'intérêt de cette coloration est de donner une information rapide.

La coloration de Gram est fondée sur l'action successive d'un colorant d'aniline, le cristal violet, d'iode puis d'un mélange d'alcool et d'acétone. Dans un premier temps, le colorant pénètre dans la paroi et le cytoplasme. Dans un second temps, l'iode réagit avec le colorant et le rend insoluble. La perméabilité plus grande des bactéries à Gram négatif à l'alcool permet la décoloration. Les bactéries à Gram positif restent colorées en violet ou mauve. Une contre-coloration (par exemple en rose) permet de visualiser à nouveau, les corps cellulaires des bactéries à Gram négatif.

La paroi des bactéries Gram+ est composée d'une 40ème de couche de peptidoglycane ne permettant pas à l'alcool de traverser cette paroi épaisse tandis que la paroi des bactéries à Gram- n'est formée que d'une seule couche de peptidoglycane.

c-Milieux sélectifs : Les milieux sélectifs sont des milieux empêchant la culture de certains micro-organismes. Ils sont utilisés pour l'isolement bactérien dans des produits polymicrobiens. La sélection peut être chimique ou antibiotique. Ce sont des milieux riches ou non et donnant souvent un ou plusieurs caractères biochimiques d'orientations permettant une identification plus simple des germes. Chacune des colonies isolées est repiquée sur les milieux sélectifs suivants :

- Milieu Mac conkey (*Entérobactéries*).
- Milieu King B (*Xanthomonas*)
- Milieu King A
- Milieu citrate de Simmons (*Pseudomonas*).

6-3-3-2-Caractères biochimiques:

a-Type respiratoire: La détermination du type respiratoire (ou type énergétique) d'une bactérie consiste en la détermination du rapport qu'a cette bactérie avec l'oxygène.

Les bactéries ont des besoins respiratoires spécifiques, elles sont soit:

- Des bactéries aérobies strictes: Bactéries ayant besoin d'oxygène pour leur respiration.
- Des bactéries anaérobies strictes: La présence de l'oxygène est toxique pour ces bactéries.
- Des bactéries aéro-anaérobies facultatives: La présence de l'oxygène est facultative, elles peuvent se développer en présence ou en absence d'oxygène.
- Des bactéries micro-aérophiles: Bactéries se développent sous une faible pression d'oxygène.
- Des bactéries anaérobies aéro-tolérantes: Bactéries se développent en absence d'oxygène mais elles tolèrent la présence de ce dernier dans le milieu (**Delarras, 2007; Joffin et al.,2006**)

La mise en évidence expérimentale de ces cinq types respiratoires peut être réalisée sur la gélose viande foie (gélose VF), l'ensemencement se fait par piqure centrale.

b-La catalase: La recherche de la catalase présente un intérêt taxonomique en ce qui concerne les bactéries à Gram +. La plupart des bactéries à Gram négatif possèdent une catalase (catalase +).

Cette enzyme est utilisée en bactériologie systématique pour l'identification des bactéries. Il s'agit de mettre en contact une colonie de la bactérie à étudier en présence d'eau oxygénée (à 10 volumes). Une effervescence (dû à un dégagement de dioxygène) signe la présence d'une catalase.

c-L'oxydase : Ce test est essentiel pour l'identification des bacilles et coques Gram -. Le réactif utilisé est le chlorhydrate ou l'oxalate de N-diméthyl paraphénylène diamine (PDA).

On peut utiliser ce réactif en solution mais le plus souvent on utilise des disques imprégnés de ce réactif (disques oxydases).

Déposer un disque imprégné de réactif sur une lame, l'imbiber avec une goutte d'eau distillée stérile. Prélever une colonie parfaitement isolée avec une pipette Pasteur boulée et l'écraser sur le disque pendant une dizaine de secondes. Observer immédiatement.

d- Test LDC ODC ADH : La recherche des enzymes: LDC (lysine décarboxylase), ODC (ornithine décarboxylase) et ADH (arginine dihydrolase) est d'une grande importance pour l'identification des bactéries de la famille des *Enterobacteriaceae* (bacille gram -, oxydase -) et d'autres bacille gram-

Ensemencer le milieu avec une goutte de suspension bactérienne dense, agiter, Si le tube n'est pas plein, le recouvrir par de la vaseline stérile afin de placer le milieu en anaérobiose. Incuber 24 heures à 37°C, le bouchon vissé complètement.

S'il y'a une coloration jaune ont dit qu'il y a eu acidification du milieu liée à l'utilisation du glucose mais il n'y a pas eu réalcalinisation.

Le substrat (arginine; lysine ou ornithine) n'a donc pas été dégradé donc La bactérie ne possède pas l'ADH- ou la LDC- ou l'ODC-.

S'il y'a une coloration violette c'est-à-dire il y a eu acidification du milieu liée à la fermentation du glucose PUIS il y eu réalcalinisation du milieu liée à la dégradation du substrat (arginine; lysine ou ornithine) par la bactérie qui possède l'ADH+ ou la LDC+ ou l'ODC+

e- Test MEVAG (Milieu d'Etude de la Voie d'Attaque des Glucides) : Gélose semi solide.

Pour l'étude d'une souche bactérienne on utilise deux tubes, l'un sera recouvert de vaseline (tube fermé) l'autre non recouvert (tube ouvert) l'ensemencement se fait par piqure centrale.

Après incubation :

- Si les deux tubes sont jaunes la bactérie a un métabolisme fermentaire ;
- Si tube ouvert seul jaune la bactérie a un métabolisme oxydatif/ respiratoire ;
- Si les deux tubes sont rouges (pas de virage) la bactérie est inactive vis-à-vis des sucres.

f-Test d'identification par les plaques API 20E :

La galerie API 20 E est une version miniaturisée des tests biochimiques classiques destinés à l'identification des *Enterobacteriaceae*. Ce système regroupe vingt trois tests biochimiques.

A la suite d'une période d'incubation permettant à la bactérie de réagir avec les substrats, les diverses réactions sont notées afin de déterminer le code d'identification composé de sept chiffres.

g-Inoculation de la galerie API 20 E : Remplir les tubes et les cupules par la suspension bactérienne, et pour créer une anaérobiose dans les tests suivant : LDC, ODC, URE, nous rajoutons dans ces cupules de l'huile de paraffine.



Figure 29 : Plaque Api20E

7-Activités biologiques :

7-1-Activité antifongique : Les huiles essentielles de thym sont largement utilisées comme agents antiseptiques dans plusieurs domaines pharmaceutiques et comme aromatisants pour de nombreux types de produits alimentaires (**Papageorgio, 1980**). Le genre *Thymus* englobe de nombreuses espèces et variétés et la composition chimique de leurs huiles essentielles a été étudiée depuis longtemps (**Papageorgio, 1980 ; Baser et al., 1992 ; 1998 ; Vila et al., 1995 ; Guillen et al., 1998 ; Lozeine et al., 1998 ; Saez, 1998 ; Tumen et al., 1998**).

Les huiles essentielles de plusieurs espèces de thym ont déjà prouvé leurs propriétés antibactériennes et antifongiques (**Pellecuer et al., 1980 ; Benjilali et al., 1987a ; 1987b ; Agnihotri et al., 1996**).

7-1-1-Activité antifongique des extraits : Afin de tester l'activité antifongique des extraits obtenus par des solvants organiques, nous avons utilisé la méthode du contact direct ou la croissance radiale.

Une quantité de l'extrait est solubilisée dans 2 ml de DMCO, des volumes de 25,50 et 100µl ont été ajoutés à 10ml de PDA à 45°C dans un tube à essai, après agitation le contenu des tubes est versé dans une boîte de pétri de 9 cm de diamètre.

L'inoculation se fait par dépôt au centre de la boîte d'un disque du mycélium d'environ 0.5 cm de diamètre d'une culture jeune de 5 à 7 jours. Pour chaque concentration trois répétitions ont été réalisées.

Une boîte de pétri contenant 10 ml de PDA sans solution des extraits est inoculé pour servir d'un témoin. Autre boîte de pétri est inoculé de la même façon mais cette fois ci avec les différents volumes du DMCO afin d'ignorer la possibilité de son activité vis à vis les moisissures.

Après incubation à $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ pendant 2 à 7 jours en tenant compte la croissance du témoin, on calcule l'indice antifongique qui est déterminé par la formule suivante :

$$\text{Indice antifongique} = (\text{Da} - \text{Db}) / \text{Db} \times 100$$

Da : le diamètre de la zone de croissance de l'essai ;

Db : le diamètre de la zone de croissance du témoin.

Pour les boîtes qui ne présentent pas de croissance de la moisissure, le disque mycélien est transféré dans un milieu PDA neufs pour confirmer s'il s'agit d'un effet fongicide ou fongistatique.

7-1-2-Activité antifongique des huiles essentielles : Pour savoir l'effet anti fongiques des huiles essentielles nous avons suivi le même protocole sauf que les essences ont été ajoutées directement au PDA à 45°C afin d'éviter la dégradation de l'huile essentielle et son évaporation, le tout est mélangé à laide d'un vortex, et coulé directement dans des boîtes de pétri.

7-1-3-Activité antifongique des hydrolats : A fin d'évaluer l'effet de nos hydrolats nous avons procédé à des tests in vivo, suivant le protocole de **Neslihan D. et al., 2008** avec quelques modifications.

Après désinfection à l'éthanol 70% environ 2 min et rinçage deux fois à l'eau distillée environ 10 min chacune, puis séchage entre deux becs benzène ou dans un endroit stérile, les oranges sont trempées dans l'hydrolat environ 10 minutes.

A l'aide du revers d'une pipete pasteur stérile nous avons fait des trous pour inoculer 100 μl de la suspension fongique à 10^6 spores/ml, et laisser incuber dans des boîtes fermées hermétiquement.

Des témoins sont préparés de la même façon sans d'être trempées dans l'hydrolat. Mesurer les diamètres des colonies sur chaque orange en les comparants avec les témoins.

7-2- l'activité antibactérienne : La méthode utilisée est celle de diffusion par puits sur gélose Muller Hinton telle que décrite par **Berghe et Vlietinck (1991)**.

Grace a la technique d'ensemencement en tapis, on obtient après incubation un tapis bactérien, c'est-à-dire des colonies isolées mais confluentes. La technique est fort simple :

- réaliser dans un premier temps une dilution appropriée de la souche à tester ;
- inonder ensuite la boîte de gélose avec cette dilution. On laisse reposer quelques minutes ;
- aspirer ensuite tout le liquide présent à l'aide d'une pipette Pasteur ;
- laisser sécher 15 minutes à l'étuve ou près du bec de gaz, boîte légèrement ouverte ;
- disposer soit les disques de l'extrait ou l'huile essentielle à tester,
- ou bien creuser des puits a l'aide d'une pipete pasteur stérile et les remplir avec de l'huile essentielle.

Après 24 heures d'incubation à la température adéquate pour le développement du germe en question. La présence ou non d'une zone d'inhibition autour des puits a été observée (**Bssaibis F.2009**). L'interprétation a été faite selon **Duraffourd et al.,(1990) Ponce et al., (2003)**.

7-3-1-Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) : La CMI est la plus faible concentration de la substance pour laquelle il n'y a pas de croissance visible à l'œil nu après un temps d'incubation de 18 à 24 heures. Elle été évaluée par l'utilisation de microplaque à 96 puits. Sa détermination a été faite par observation du trouble induit par la croissance des germes étudiés dans chaque puits. La CMI a été la plus petite concentration pour laquelle il n'y a pas eu de trouble observé à l'œil nu.

7-3-2-Détermination de la concentration minimale bactéricide (CMB) : La concentration minimale bactéricide (CMB) est la plus faible concentration de substance qui laisse au plus 0,01% de germes survivants. A l'aide d'une anse calibrée à 2µl, les contenus des puits dans lesquels aucun trouble n'a été observé ont été prélevés et ensemencés sur une gélose Mueller-Hinton en commençant par le tube de la CMI. L'ensemencement a été fait par stries parallèles de 5cm de long à la surface de la gélose. Après 24h d'incubation à l'étuve à 37 °C, le nombre de colonies sur les stries a été comparé à celles de la boîte de numération de l'inoculum.

7-3-Activité antioxydante : Ces dernières années, l'intérêt porté aux antioxydants naturels, en relation avec leurs propriétés thérapeutiques, a augmenté considérablement. Des recherches

scientifiques dans diverses spécialités ont été développées pour l'extraction, l'identification et la quantification de ces composés à partir de plusieurs substances naturelles à savoir, les plantes médicinales et les produits agroalimentaires (**Sanchez-Moreno C.2002 ; Marc Fr.et al. 2004 ; Huang, D.et al 2005**).

Les huiles essentielles des plantes ont trouvé leur place en aromathérapie, en pharmacie, en parfumerie, en cosmétique et dans la conservation des aliments. Leur utilisation est liée à leurs larges spectres d'activités biologiques reconnues (**Paster et al., 1990 ; Caccioni et al., 1994 ; Cowan, 1999 ; Nielsen et al., 2000 ; Lamiri et al., 2001 ; Cimanga et al., 2002**).

7-3-1-Test DPPH :

Le test antioxydant a été réalisé avec la méthode au DPPH (**Sanchez-Moreno C.et al 1998**)

Le DPPH, un radical libre de couleur violette, est réduit en un composé de couleur jaune en présence de composés anti-radicalaires (**Molyneux, 2004**)

1 ml de 0.006% solution éthanolique de DPPH est mélangé avec un volume égal d'extrait d'essai à différentes concentrations. L'absorbance est lue à 517 nm à l'aide d'un spectrophotomètre (U.V/VIS Spectrophotometr, Optizen POP) pendant 30 minutes.

Le contrôle (blanc) est composé de 1ml de la solution éthanolique au DPPH et 1 ml d'éthanol.

7-1-2-Expression des résultats : Le pourcentage de l'activité anti-radicalaire est calculé selon l'équation suivante :

$$I (\%) = [(Ac - At) / Ac] \times 100 \text{ (Sanchez-Moreno C.2002)}$$

Ac : absorbance du contrôle.

At : Absorbance du test.

La concentration effectrice (EC50) ou concentration inhibitrice (IC50) définie comme la concentration de l'échantillon qui produit 50% d'effet piègeur du radical DPPH est déterminée.

Les IC50 sont calculés graphiquement par les régressions linéaires des graphes tracés, pourcentage d'inhibition en fonction des différentes concentrations des fractions testées (**Scherer R., Godoy HT.,2009**).

L'activité antiradicalaire est déterminée en calculant l'inverse des valeurs IC50 (**Fabri RL.et al.,2009**).

$$A_{AR} = 1/IC50$$

8-Activité insecticide des huiles essentielles:

La gestion intégrée des ennemis des cultures est une méthode décisionnelle qui consiste à avoir recours à toutes les techniques nécessaires pour réduire les populations d'organismes nuisibles de façon efficace et économique, dans le respect de la santé et de l'environnement.

Les problèmes de la résistance et de la nocivité des insecticides synthétiques ont abouti à la nécessité de trouver des alternatives plus efficaces et plus saines. Ainsi, les huiles essentielles sont les produits les plus testés actuellement. Ces insecticides naturels, dits insecticides de plantes, présentent plusieurs avantages par rapport aux composés synthétiques à cause de leur biodégradation rapide et la réduction des risques de l'environnement.

8-1- Evaluation de l'efficacité des huiles essentielles sur *Ceratitis capitata*:

Dix individus de *C. capitata* (adultes ou larves) sont mis dans des bocaux en verre contenant une quantité du milieu de culture composé de 30% de levure et 70% de sucre, ainsi qu'une éponge mouillée pour assurer l'humidité. Celle-ci sont traitées à différentes doses de l'huile essentielle des trois plantes étudiées *Thymus capitatus*, *Tetraclinis articulata* et *Daucus crinitus*. Des lots de témoin sont réalisés en parallèle sans avoir mis de l'huile essentielle. Trois répétitions sont effectuées pour les doses et pour le témoin. les bocaux sont fermés hermétiquement pour éviter l'évaporation de notre produit et maintenu dans les mêmes conditions de température et d'humidité.

8-2- Analyse statistique:

Les séries de données concernant les effets biocides des huiles essentielles testées sont comparées en utilisant le test Fisher- Snedecor (ANOVA) au seuil de 5% à un facteur en utilisant le logiciel Stat Box. Dans le cas où les différences s'avèrent statistiquement significatives, un test complémentaire de Tukey (HSD) au seuil de 5 % à fin de déterminer les groupes homogènes.

8-3- Correction de la mortalité et calcul des doses létales 50 et 90:

Nous avons estimé les mortalités des populations pour chaque bioessai. Les pourcentages de mortalité sont corrigés par la formule de Schneider-Orelli :

$$MC (\%) = 100x (M-MT) / (100xMT)$$

MC : pourcentage de mortalité corrigée ;

M : pourcentage d'individus morts dans la population traitée ;

MT : pourcentage d'individus morts dans la population témoin.

Les (DL50) et les (DL90) sont déterminées à partir de l'équation de la droite de régression obtenue théoriquement, en prenant en compte les probits des mortalités corrigées en ordonnées et le log base de 2 des doses en abscisse.

On détermine la dose qui correspond à un probit de 5 (50% de mortalité) d'où la DL50 et la dose qui correspond à un probit de 6.28 (90% de mortalité) d'où la DL90. Les valeurs de la dose létale de 50% de la population est calculée grâce au logiciel Polo Plus version 1.0

Résultats et Discussion

PARTIE I : ETUDE ENTOMOLOGIQUE

Les dommages causés par la cératite sont des piqûres de pontes et des galeries dans les fruits engendrées respectivement par des femelles et des larves. En outre, ces galeries et ces piqûres constituent une voie de pénétration des champignons et bactéries qui sont responsables de la décomposition et la chute prématurée des fruits. Ces dégâts constituent un obstacle majeur pour des exportations en raison de la dévalorisation de la marchandise et des mesures de quarantaine imposées par certains pays importateurs.

Nous avons évalué l'impact des attaques de la mouche méditerranéenne *Ceratitis capitata* en fonction de la date d'observation, de l'orientation et de l'arbre échantillonné durant une période bien définie allant de décembre 2011 jusqu'à mars 2012 ; durant l'année suivante, en 2013, les piqûres étaient toutes stériles en raison des traitements insecticides administrés lors de cette période, les prélèvements sont restés infructueux.

A-Résultats :

L'estimation du taux d'infestation est faite à partir des nombres de trous de ponte, puis à partir des fruits chutés.

Les pièges à phéromone placés dans le verger ont permis de récolter des mouches mâles, permettant de connaître la cinétique des adultes en fonction de la date d'observation.

Des élevages sont menés chaque semaine au laboratoire à partir des fruits chutés, ramassés sous les arbres échantillonnés. Ces élevages ont pour but la connaissance du cycle biologique de la cératite, son taux de mortalité, son degré de parasitisme et enfin pour estimer sa longévité.

1-Etude de l'infestation en fonction des trous de ponte :

1-1- Effet de l'orientation : Les parties sud et ouest présentent les moyennes les plus élevées des trous de ponte. Les infestations restent moyennes de décembre à mars pour chaque orientation.

Les taux moyens d'infestation varient d'une orientation à une autre selon la date d'observation avec une moyenne de 0.239 piqûres par orange.

source	SC	CM	F _{obs}	P
Orientation	521,1	173,7	5,27	0,004

Les analyses de variance montrent qu’il existe des différences significatives entre les orientations puisque $F_{obs}=5,27$ pour $P=0,004$.

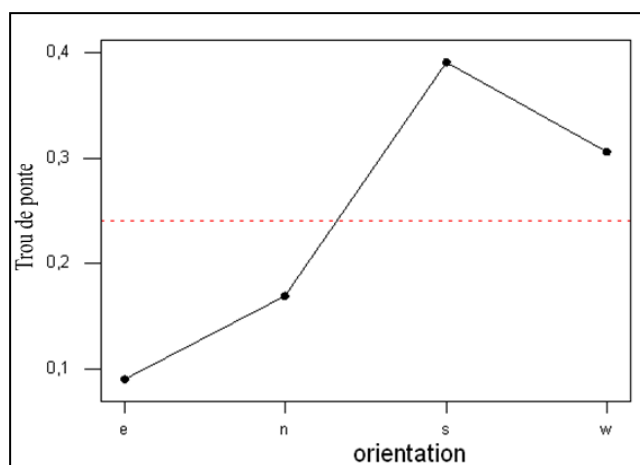


Figure 30 : Répartition des trous de ponte selon l’orientation

En effet, les taux d’infestation varient selon l’orientation des fruits dans l’arbre. Une infestation plus importante est notée vers les orientations sud et ouest de l’arbre, puis nord et est (**Fig. 30**).

1-2 Effet de la date : Le nombre de trous de ponte varie selon la date d’échantillonnage avec un taux moyen d’infestation de 0,942 piqûres par fruit.

Les variations temporelles sont significatives avec $F_{obs} = 3,08$ pour $P = 0,006$.

Source	SC	CM	F _{obs}	P
Date	1115,7	101,4	3,08	0,006

La cinétique des piqûres (**figure 31**) montre que l’infestation atteint son maximum le 14/12/2011 (à la date 2), le 20/01/2012 (à la date 5) et le 28/03/2012 (à la date 8). Ces pics correspondent aux trois générations hivernales de la cératite dans notre région. Ces résultats fort intéressants nous

permettent de mieux cibler nos traitements insecticides dans le cas d’une lutte intégrée puisqu’ils doivent être administrés à l’apparition de chaque nouvelle génération. Ces dernières sont spécifiques pour chaque région, il est donc important de les définir dans le cadre de la bioécologie du ravageur pour une lutte efficace.

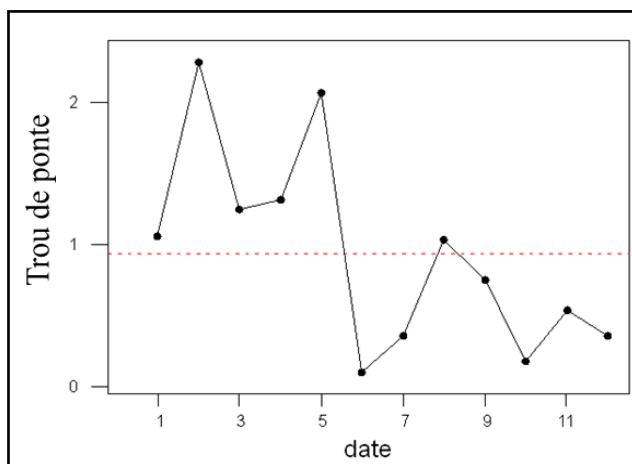


Figure 31: Répartition temporelle des infestations.

1-3 Effet de l’arbre : Il existe une différence hautement significative des moyennes pour le facteur « arbre » avec $F_{obs} = 0,79$ pour $P = 0,000$.

Source	SC	CM	F_{obs}	P
Orientation	600,58	1,913	0,79	0.000

Les arbres présentent de grandes variations d’infestation durant notre période d’étude, cela est principalement dû à leur phénologie, aux facteurs intrinsèques (substances volatiles qu’ils dégagent) ainsi qu’à leur position spatiale puisque souvent les arbres situés aux bords du verger sont les plus touchés car c’est les premiers qui interceptent les mouches provenant des vergers voisins.

2-Etude de l’infestation à partir des fruits chutés :

Dans notre verger, au niveau des quatre orientations, on dénombre et prélève les fruits trouvés par terre pour effectuer les élevages des mouches.

2-1 Effet de l'orientation : Avec $F_{obs} = 2,57$ pour $P = 0,071$ les fruits chutés ne varient pas d'une manière significative d'une orientation à une autre. Ce résultat s'explique par le fait que les oranges ne chutent pas forcément sous la branche d'où elles proviennent, en plus des déplacements qu'elles subissent par le piétinement des animaux.

Le taux moyen de fruits chutés par orientation est de 40,25, ce qui illustre bien les dégâts occasionnés par la cératite à la production agrumicole (**Fig.32**).

Source	SC	CM	F_{obs}	P
Orientation	873	291	2,57	0,071

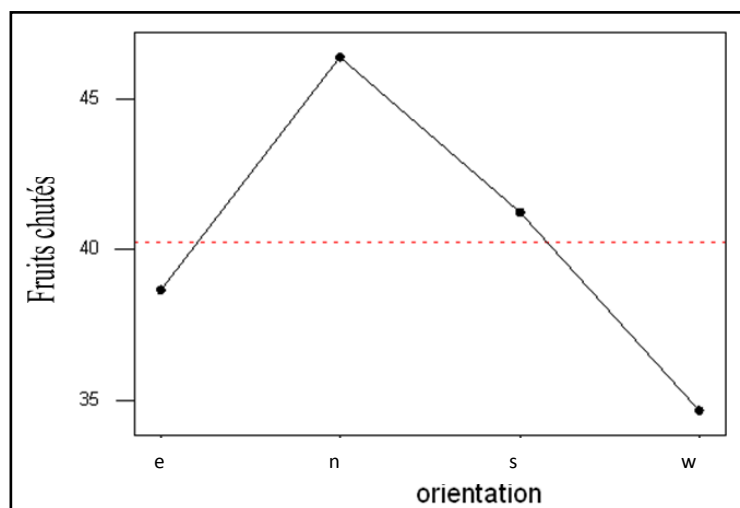


Figure 32: Effet de l'orientation

2-2 Effet de la date : L'analyse factorielle des variances révèle qu'il existe une différence significative en fonction des dates d'observation avec $F_{obs} = 2,85$ pour $P = 0,000$.

La cinétique des fruits chutés présente des pics importants pour la date du 20/01/2012 (date 5) et à la date 7 ; elle diminue jusqu'à atteindre le minimum pour la date du 28/03/2012 (date 8) (**Fig.33**).

Source	SC	CM	F_{obs}	P
Orientation	3561	324	2.85	0,001

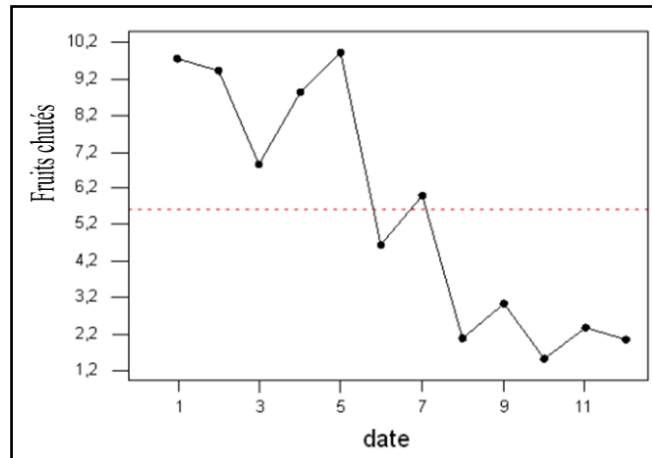


Figure 33 : Effet de la date

Le taux moyen de fruits chutés par date est de 40,20 pour chaque arbre échantillonné. Nous constatons que les fruits chutés sont fortement attaqués par la cératite, ce qui réduit leur résistance et explique leur chute prématurée. A la fin de la période d'étude, le nombre de fruits chutés a diminué du fait que seuls les moins infestés ont continué à se développer sur l'oranger, ce qui confirme la nocivité de ce phytophage.

2-3 Effet de l'arbre : Durant la période d'étude, l'arbre a un impact hautement significatif sur le nombre de fruits chutés avec $F_{obs} = 6,67$ pour $P = 0,000$.

Source	SC	CM	F_{obs}	P
Orientation	9598,52	30,57	6,67	0,000

Le taux moyen de fruits chutés par arbre est de 5,54. Ces résultats confirment ceux obtenus pour les trous de ponte.

3- Bioécologie de la mouche méditerranéenne de fruit *C.capitata*:

Il est important de signaler que chez les agrumes, le développement des stades pré-imaginaux des Thephritidae est lié au degré de maturité physiologique des fruits et à la composition chimique de leur pulpe dont principalement leur teneur en sucre et en jus. Les fruits trop mûrs causent la mort des œufs et des jeunes larves car ils les asphyxient par leur jus tout comme les fruits trop verts qui ne permettent pas l'oviposition des mouches.

3-1- Capture des adultes : Pour la surveillance du verger et le suivi de la biologie des populations de la mouche, les pièges attractifs sont essentiels pour la capture des adultes.

L'analyse de variance à un facteur contrôlé montre qu'il n'existe pas une différence significative entre les différentes dates d'observation pour le nombre de mouches capturées puisque $F_{obs} = 1,27$ pour $P = 0,270$

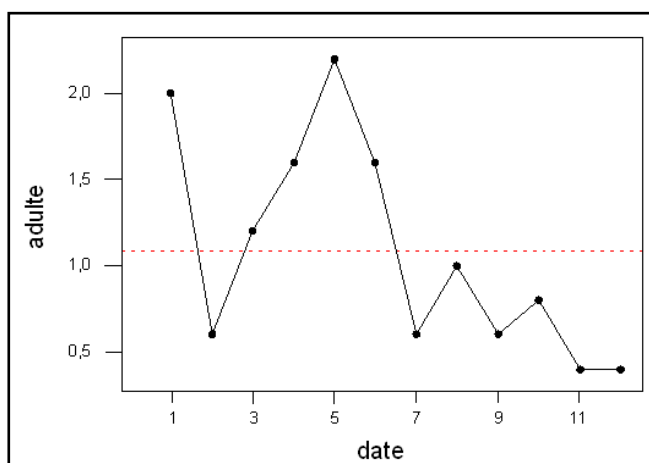


Figure 34 : Cinétique des adultes au cours des différentes dates d'observation.

Le taux moyen d'adultes capturés par date est de 1,08 ce qui reste faible par rapport aux dégâts commis par ce phytophage ; les pièges Jackson utilisés semblent peu efficaces par rapport aux populations d'adultes qui sévissent.

3-2 Biologie des différents stades de la mouche : Les élevages nous permettent de connaître la durée des développements larvaire et nymphal, leurs mortalités ainsi que la date d'émergence des adultes aux conditions de laboratoire.

3-2-1 Mortalité larvaire : Durant la période d'élevage, les pupes obtenues à partir des larves contenues dans les fruits chutés représentent 84,5 % donc la mortalité larvaire est de 15,5 %.

Dans les fruits, les larves les plus grosses et les plus actives vont entraîner la mort des larves les plus jeunes et les plus faibles, cela est dû à la compétition intraspécifique (Duyck, 2005).

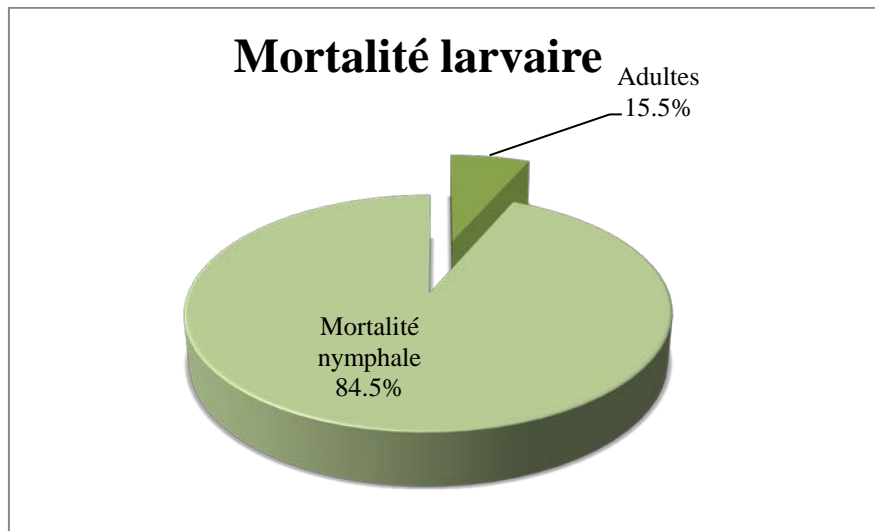


Figure 35 : Mortalité larvaire au niveau des élevages.

3-2-2 Développement nymphal : Les élevages menés au laboratoire ont permis de connaître la durée de la nymphose qui varie selon la date de mise en élevage et d’obtenir de jeunes mouches (imagos) de *Ceratitis capitata*. La pupaison dure 25 jours en moyenne de décembre jusqu’au mois de mars.

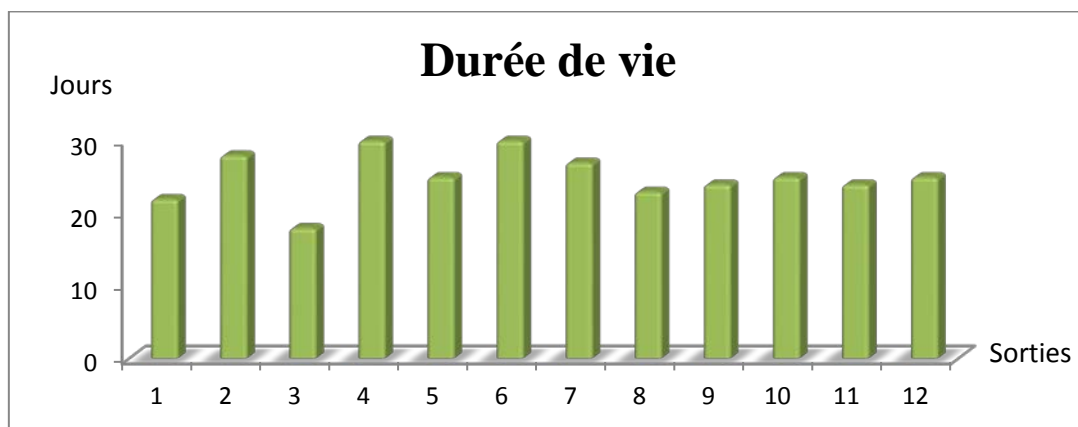


Figure 36 : Durées moyennes des nymphoses aux différentes dates.

3-2-3 Mortalité nymphale : Le taux d’émergence des adultes est de 6,5 % donc la mortalité nymphale de *Ceratitis capitata* estimée à partir des élevages effectués au laboratoire est de 93,5 %, ce qui est particulièrement élevé.

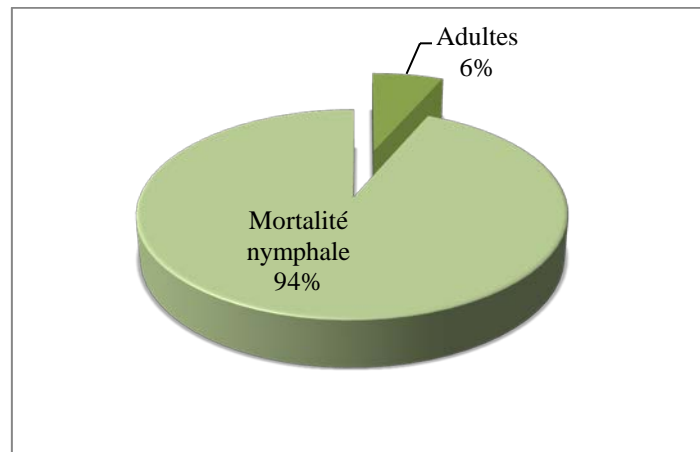


Figure 37 : Mortalité nymphale estimée à partir des élevages.

L'étude des corrélations linéaires montre qu'il n'existe pas une relation significative entre le nombre de pupes et de larves avec un $R^2=60,2\%$

Nous ne pouvons donc pas prédire le taux de nymphes à partir de celui des larves et inversement.

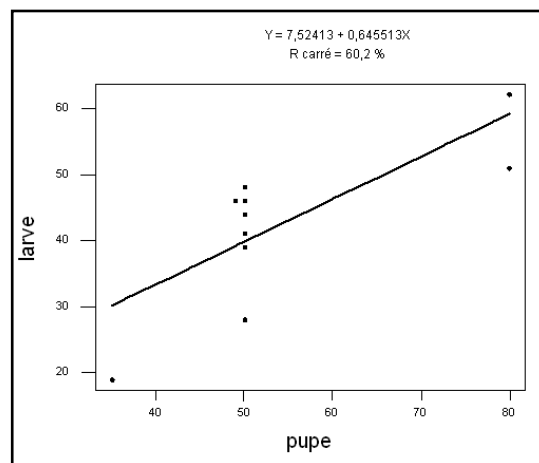


Figure 38: Régression se rapportant au nombre de nymphes/larves

3-2-4 Taux d'émergence des adultes estimé à partir des pupes : La biologie de *Ceratitis capitata* dépend entièrement du bioclimat dans lequel l'insecte se développe. Aux conditions de laboratoire dans lequel nous avons effectué les élevages, pendant la période d'étude, la température était en moyenne de 25° C.

Les résultats toujours variables, semblent liés au degré de maturité des fruits.

La droite de régression linéaire avec $R^2 = 0,1\%$ (Fig. 39) montre que l'on ne peut pas prédire le nombre d'adultes qui vont émerger à partir du nombre de nymphes.

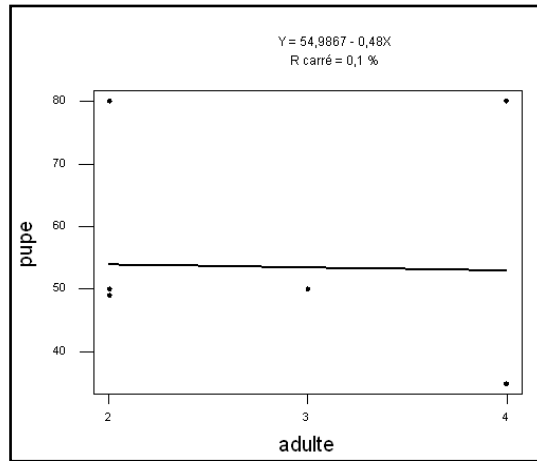


Figure 39: Régression du nombre d'adultes/nombre de nymphes.

3-2-5-Taux d'émergence des adultes à partir des larves: La droite de régression linéaire (Fig. 40) montre qu'il n'existe pas une relation significative entre les nombres de larves et des adultes obtenus car $R^2 = 1,4\%$, ce qui ne nous permet pas de prédire le nombre d'adultes à partir du nombre de larves.

Ces résultats sont décevants car si on avait pu estimer le nombre d'adultes d'une population en connaissant le nombre de larves, cela nous aurait été utile lors d'un programme de lutte où on aurait traité avec plus de précision les populations à venir, ce qui serait nettement plus efficace.

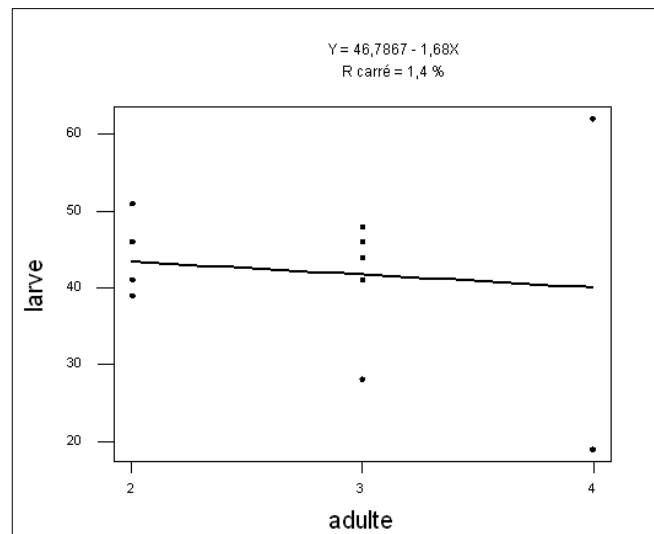


Figure 40 : Relation entre le nombre d'adultes et celui des larves.

B- Discussion :**1- Cycle évolutif :**

Le cycle de la mouche méditerranéenne passe par quatre stades : œuf-larve-pupe-et adulte.

La durée du cycle de *Ceratitis capitata*, déterminée à partir des élevages effectués au laboratoire est de 34 jours en moyenne, ce qui est similaire à celle relevée par **Selka (2007)** durant la même période et qui est de 34 jours également.

Le développement nymphal a duré 25 jours pour nos élevages et 23 jours pour ceux de **Selka (2007)** pour la même variété d'oranger étudiée, la Sanguinelli. Alors que **Duyck et Quilici S.(2002)** ont donné des durées des stades immatures de *C. capitata*, *C. rosa* et *C. catoirii* qui variaient de 14.5 à 63.8, de 18.8 à 65.7 et de 16.8 à 65.8 jours, respectivement, à 30-15 ° C

2- Taux de mortalité et longévité des différents stades :

Durant nos élevages, le taux de mortalité larvaire est de 15,15 %, ce qui est faible en le comparant avec celui obtenu par **Selka (2007)** avec 33 % et celui obtenu par **Hassani (2003)** avec 22% pour la variété Valencia, 14,2 % pour la variété Washington et 25 % pour la variété Thomson.

En revanche, en comparant nos résultats à ceux de **Hassani (2003)**, nous avons une très forte mortalité nymphale (93,5%) alors que chez lui, elle était de 9.27% pour Valencia, 9.72% pour Washington et 16,66% pour Thomson ; **Selka (2007)** a obtenu 20% pour la même variété que la notre, Sanguinelli. Cela est probablement dû aux conditions de laboratoire qui n'étaient pas très favorables pour le développement nymphal.

Le seuil de développement des pupes est de 13°C et cette étape dure de 9 à 10 jours (**Boller. 1985**), autre études démontrent qu'à 26°C ce stade dure 10 à 11 jours et quand les conditions ne sont pas favorables cette étape peut être prolongé sur plusieurs jours (**Mavrikakis et al. 2000**).

Par conséquent, l'émergence des adultes est faible avec 6,5 % contrairement à celle obtenue par **Hassani (2003)** avec 90,7% pour Valencia, 90,2 % pour Washington et 83,3 % pour Thomson et **Selka (2007)** avec 67 % pour la variété Sanguinelli. et par **Zucoloto (1993)** avec 69.8% et un temps d'émergence de 18 jours.

La longévité des adultes est de 15 jours en moyenne ; en effet, elle varie entre 5 et 22 jours, ce qui est proche des résultats de **Boller (1985)** alors qu'elle était de 34 jours pour les élevages de **Selka (2007)**. Dans des conditions de laboratoire, les males vivent en moyenne de 36 jours à 25°C, alors à la même température longévité des femelles est de 31 jours (**Field et al., 2002**).

La durée de vie de l'adulte varie entre 21 et 30 jours ; la mouche préfère pondre dans les fruits qui ne sont pas très mûrs, car le jus des fruits mûrs cause la mort des œufs et des jeunes larves (**Thomas et al., 2001**).

3- Nombre de générations :

La dynamique des populations de *Ceratitis capitata* avec ses taux d'infestation, ses captures d'adultes et la cinétique des différents stades de développement permettent de donner une approximation du nombre de générations car cela est très compliqué en raison de leur chevauchement (**Wilson., 1994**), (**Papaj et Messing, 1996**), (**Quilici et al., 2002**).

Au cours de notre travail, nous avons trouvé deux principaux pics d'infestation dans notre verger, tant sur le graphe de la cinétique des piqûres que sur le graphe des adultes capturés, correspondant à la mi-décembre et la mi-janvier (**Fig.31 et 34**).

Fellah (1996), a estimé qu'il existe deux générations hivernales de la mouche, correspondant à la saison pendant laquelle le ravageur se développe sur les agrumes en pleine maturité, après avoir effectué cinq générations estivales sur les fruits à noyaux et à pépins, la huitième génération printanière se déroule souvent sur le néflier.

4-Cinétique des infestations :

Les études menées par **Verra et al., (2002)** montrent que la distribution de la mouche méditerranéenne est conditionnée par les facteurs climatiques, la sécheresse dans le sud de l'Espagne, du Portugal et en Afrique du nord et par le froid du nord de l'Europe.

La cinétique des infestations étant liée au comportement de la mouche au cours de la période étudiée, la **figure 34** montre qu'il apparaît une première génération hivernale à la mi-décembre (date1), suivie d'une décroissance à la fin décembre (date 2), puis apparition de la deuxième génération hivernale à la mi-janvier (date 5). A partir de la fin janvier (date 6), les infestations diminuent pour devenir moyennes jusqu'à la fin de notre période d'étude, à la mi-mars (date12).

5-Incidence des trois facteurs écologiques testés :

Lors de nos prélèvements, nous avons testé l'impact de quelques facteurs sur les attaques de la cératite ; l'orientation des fruits dans l'arbre ne semble pas influencer son comportement, ce qui confirme les résultats de **Hassani (2003)** et **Selka (2007)**. Etant dans un pays fortement ensoleillé, la cératite n'a pas besoin d'aller vers les orientations sud et ouest pour pondre ses œufs comme elle le fait dans les pays plus nordiques tels que ceux de l'Europe méditerranéenne (**Cayol et Cause, 1993**) ; (**Quillici, 2003**).

Par contre, l'effet de la date est très significatif pour les attaques de la mouche, comme chez **Hassani (2003)** et **Selka (2007)**; en effet, la date étant liée aux variations climatiques, et connaissant l'impact de ces dernières sur la biologie de tous les organismes vivants en général et sur les invertébrés en particulier (**Lamy, 1997**), il est donc normal que ce facteur ait autant d'influence sur ce phytophage.

L'arbre, de par sa position spatiale a un impact significatif car lorsqu'il est situé aux bords du verger, il subit les premières attaques de la mouche provenant des champs avoisinants. De plus, chaque arbre émet des substances volatiles de quantité et de qualité variables, donc d'intensité variable, ce qui explique ces différences d'infestation significatives.

En parallèle, nous avons travaillé sur les fruits chutés, endommagés par les piqûres de la mouche ou par d'autres agents pathogènes, nous avons cherché les causes principales qui provoquent cette chute, et suivant nos recherches et nos résultats nous avons trouvé que l'orientation a peu d'effet ce qui est le cas chez **Selka (2007)** alors que **Hassani (2003)** avait des résultats positifs pour les variétés Valencia et Washington.

Par ailleurs, les résultats obtenus indiquent que la date d'observation et l'arbre échantillonné ont aussi un impact significatif sur les attaques de la cératite ce qui est le cas pour les travaux de **Hassani (2003)** et **Selka (2007)**.

Ceci nous permet de conclure que la date et l'arbre sont des facteurs qui favorisent les attaques de ce ravageur qui provoque des dégâts importants sur les fruits; causant des pertes de rendement très lourdes pour l'agriculteur.

6-Parasitisme :

Différents travaux menés en Algérie en général et à Tlemcen en particulier ont permis d'identifier la nature du parasite de *Ceratitis capitata* dans notre région, il s'agit d'un hyménoptère Braconidae appartenant à l'espèce *Opius concolor* (**Sbiaa et Yahiaoui Yousfi (2004)** et **Hassani (2005)**). Nos captures d'adultes et nos élevages ne nous ont permis d'obtenir aucun parasite ; ce parasitisme nul serait dû à la sensibilité du parasite aux traitements insecticides ainsi qu'au fait qu'il parasite un autre Tephritidae en même temps et dans les mêmes régions, en l'occurrence la mouche de l'olive *Bactrocera oleae*. Ces résultats négatifs ne laissent espérer aucune lutte parasitologique naturelle dans notre région.

PARTIE II : ETUDE MICROBIOLOGIQUE

Les champignons sont des organismes uni ou pluricellulaires dépourvus de chlorophylle, se nourrissant par absorption de substances très diverses, et se multipliant par des spores sexuées ou asexuées. Ils sont des parasites, saprophytes ou symbiotes. Généralement aérobies, ils se développent à des températures variables entre 0 et 50° C avec une température optimale entre 20 et 27° C. Les champignons exercent chez leurs hôtes à la fois des actions favorables (fermentation, fertilisation, synthèse) et défavorables (maladies végétales, animales ou humaines).

A-Résultats:

l'identification et la comparaison entre la mycoflore pathogène des oranges saines et de celles qui sont attaquées par la mouche des fruits *Ceratitis capitata*, a permis d'obtenir des résultats intéressants.

1-Analyse mycologique :

1-1-Identification des moisissures : L'impact des moisissures sur la qualité des oranges étant de mieux en mieux perçu, le besoin de mieux les connaître conduit à élaborer des méthodes permettant de déterminer la nature des microorganismes présents.

Nous avons trouvé une biodiversité fongique importante qui a révélé, après les analyses effectuées sur les prélèvements, différents genres: *Aspergillus niger*, *Aspergillus fumigatus* ; *Aspergillus oryzae* ; *Alternaria sp* ; *Fusarium solani* ; *Trichoderma sp* ; *Penicilium sp1* ; *Penicilium sp2* et *Cladosporium sp* .



Figure 41 : Aspects macroscopique (recto-verso) et aspect microscopique du genre *Aspergillus fumigatus* (originale)

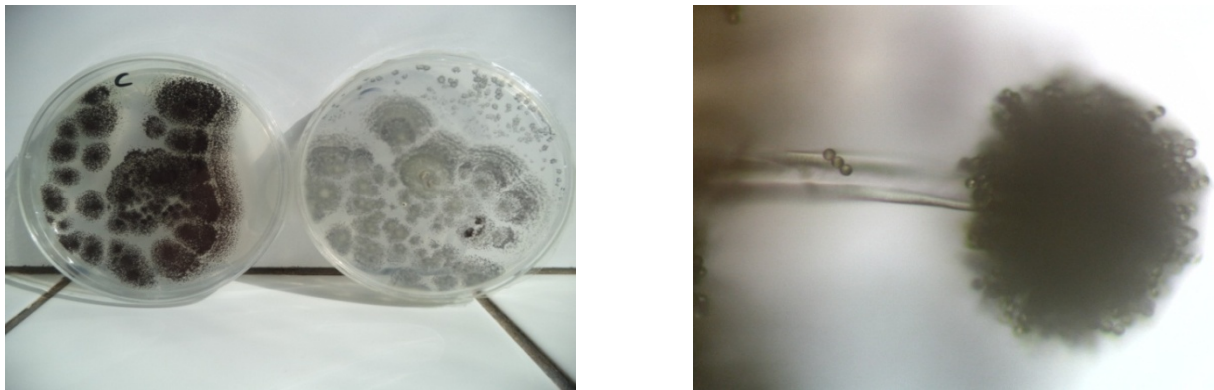


Figure 42 : Aspects macroscopique (recto-verso) et aspect microscopique du genre *Aspergillus niger* (originale)

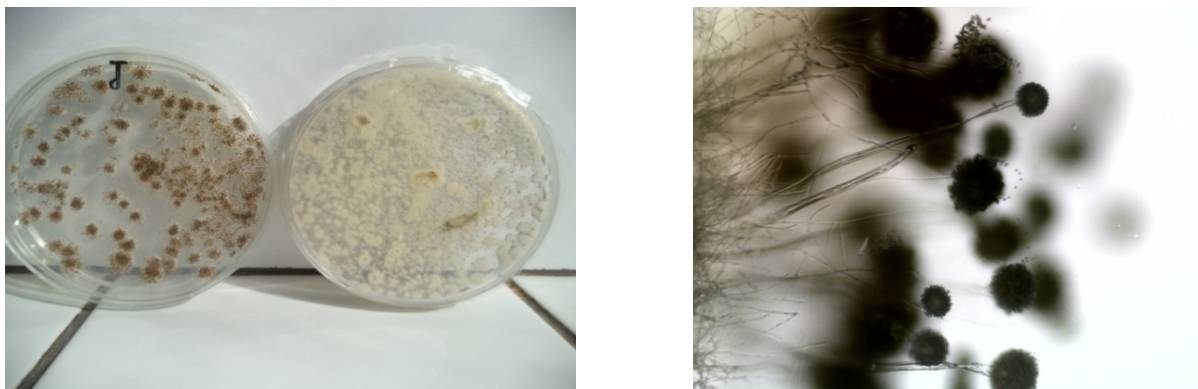


Figure 43: Aspects macroscopique (recto-verso) et aspect microscopique du genre *Aspergillus oryzae* (originale)

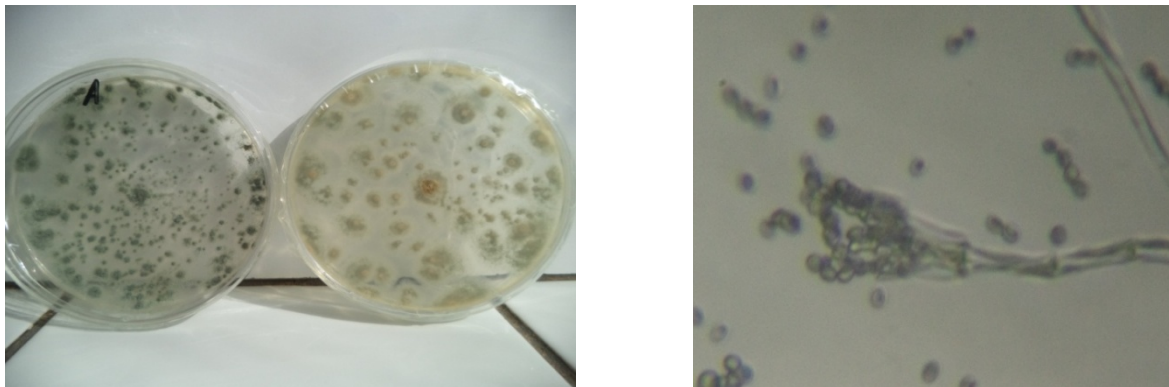


Figure 44: Aspects macroscopique (recto-verso) et aspect microscopique du genre *Penicillium sp1*.(originale)

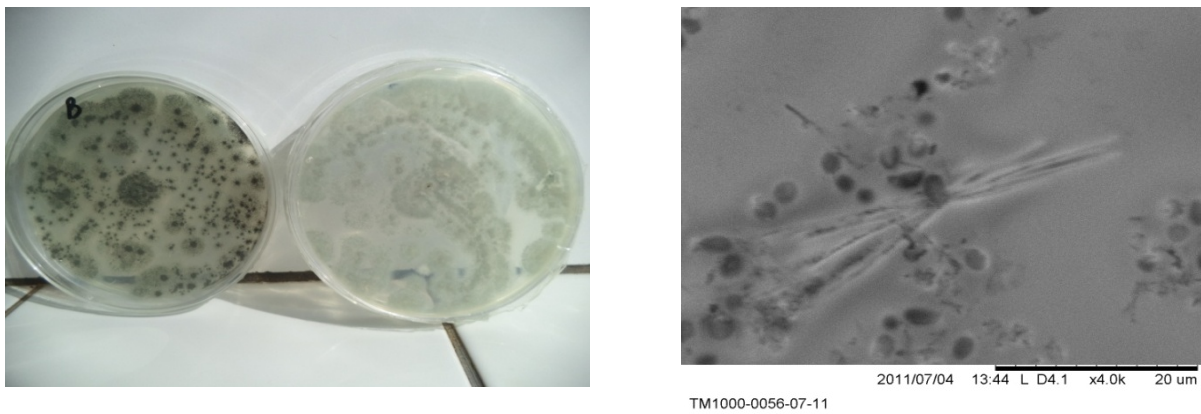


Figure 45: Aspects macroscopique (recto-verso) et aspect microscopique du genre *Penicillium sp2*.(originale)

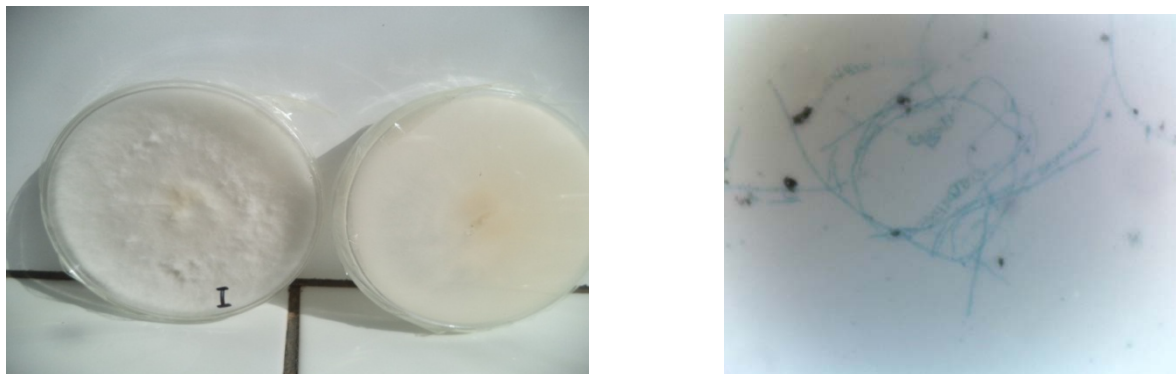


Figure 46: Aspect macroscopique (recto-verso) et aspect microscopique du genre *Fusarium solani* (originale)

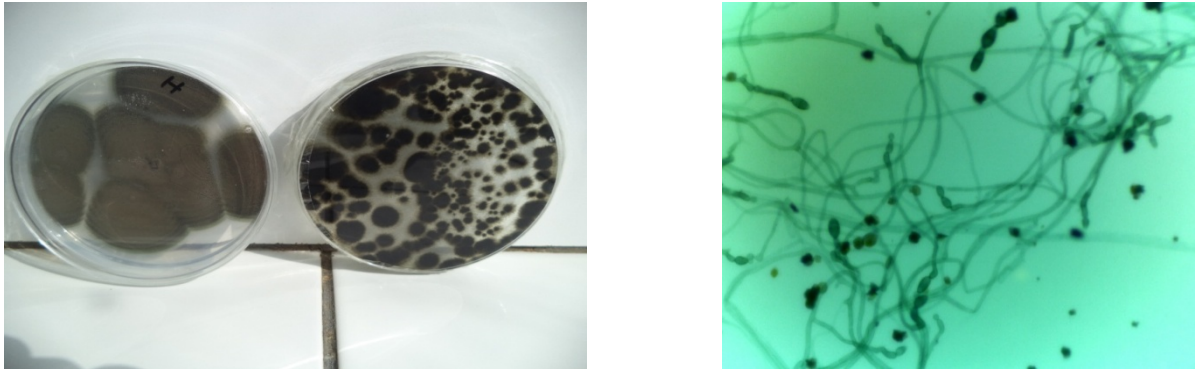


Figure 47: Aspects macroscopique (recto-verso) et aspect microscopique du genre *Cladosporium* sp. (originale)

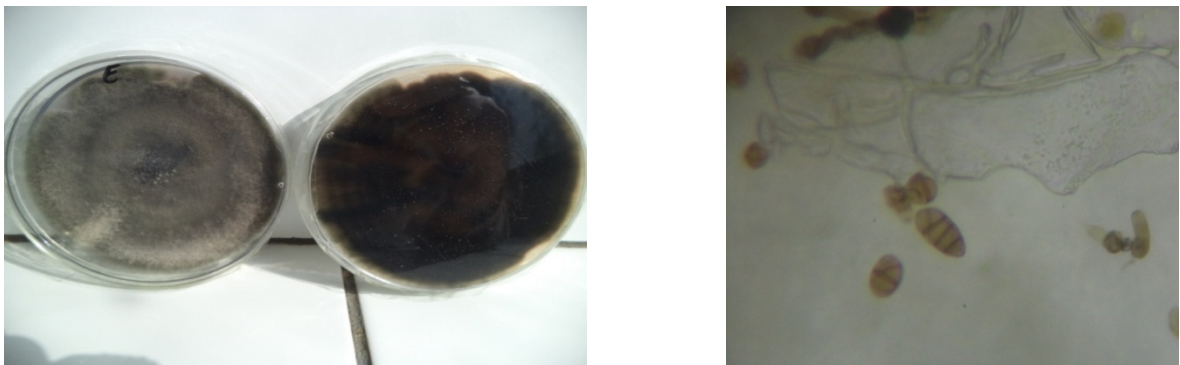


Figure 48: Aspects macroscopique (recto-verso) et aspect microscopique du genre *Alternaria* sp. (originale)

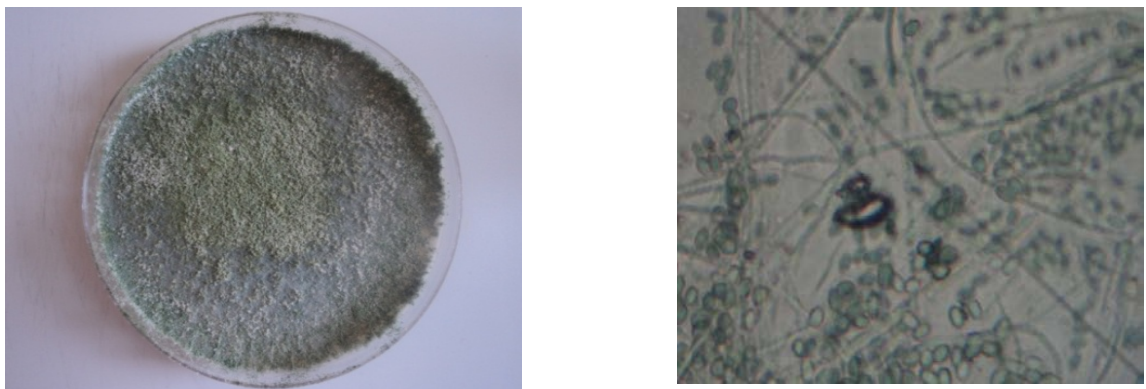


Figure 49: Aspect macroscopique et aspect microscopique du genre *Trichoderma* sp. (originale)

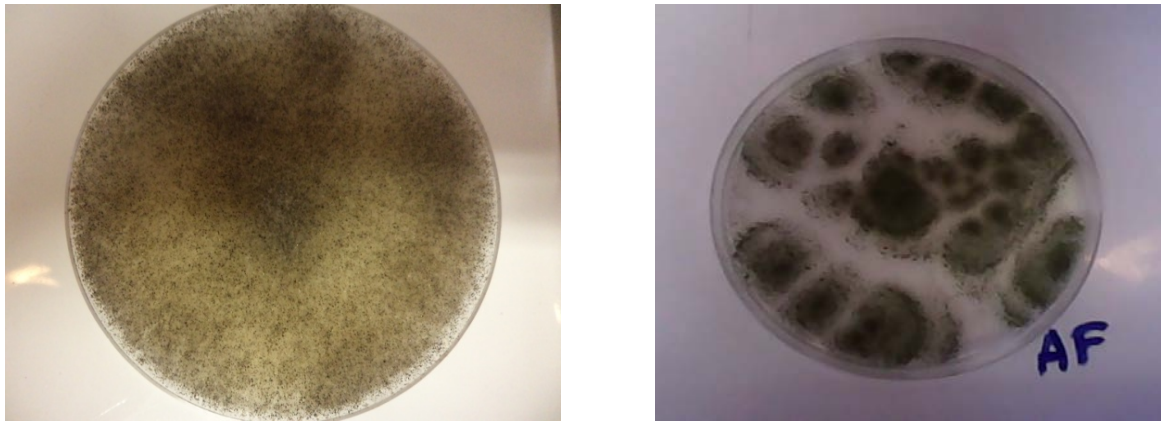


Figure 50: Aspects macroscopiques des genres *Rhizopus sp.* et *Aspergillus flavus*

Le tableau 3 résume les principales caractéristiques qui nous ont permis d'identifier ces différentes souches .

Tableau 3 : Caractères macroscopiques et microscopiques des moisissures isolées.

Genre	Aspect macroscopique	Aspect microscopique
<i>Alternaria sp.</i>	Aspect velouté en moquette, gris-brun à noir. Revers noir. La surface des colonies présente des zones blanches constituant des hyphes.	Conidiophores bruns et simples ; Conidies cloisonnées ; Spores lisses en forme de mures, produites en chaîne en forme de massue.
<i>Aspergillus niger</i>	Croissance rapide à 25°C ; Mycélium aérien, blanc à jaune citron, se ponctuant rapidement de noir (tête). Revers incolore à jaune pâle.	Conidiophores lisses, jaunes ou bruns renflés ; Vésicule globuleuse ou elliptique ; Conidies globuleuses ; lisse puis rugueuses, brun sombre ; Mycélium cloisonné ; Les hyphes sont septés.
<i>Penicillium sp.</i>	Colonies veloutées à poudreuses, de couleur verte, bleu vert ; Souvent des gouttelettes d'exsudat en surface ; Croissance rapide.	Conidiophores ramifiés, portant des métules sur lesquelles se placent des bouquets de phialides productrices de longues chaînettes de spores rondes ; Le mycélium est ramifié.
<i>Fusarium sp.</i>	Croissance rapide ; Colonies cotonneuses blanches puis rose violacé ; Pigment jaune diffusible au revers de la culture.	Macrospores en forme de faux, multiseptées, lisses, sur de petites conidiophores ; Microconidies unicellulaires très nombreuses portées par des phialides courts.
<i>Trichoderma sp.</i>	Colonies laineuses se couvrant d'amas verdâtres ; Revers incolores à beige-orangé.	Conidiophores très courts portant un amas de spores nombreuses et rondes en paquet.
<i>Cladosporium sp.</i>	Thalle vert olive ou noir ; Les colonies ont une croissance lente ; Le revers de la boîte noir ;	Les conidiophores sont simples ou ramifiés ; Le mycélium est rapidement pigmenté ; Les hyphes sont cloisonnés et bruns ;

1-2- dénombrement des moisissures isolées : Les résultats de dénombrement montrent une dominance de champignons filamenteux dans les oranges infectées et saines douées d'un grand pouvoir de dissémination : *Aspergillus* et *Penicillium*, ce qui peut s'expliquer par le grand pouvoir compétiteur de ces moisissures et leur rapidité de croissance. D'après **Manner et al., (2005)**, ces moisissures s'attaquent aux fruits mûrs, ce qui est le cas pour nos prélèvements, car ceux effectués lors de cette étude ont été réalisés juste avant la récolte.

Le tableau 4 et la figure 45 présentent les pourcentages des moisissures que nous avons isolées des oranges saines et infectées par *Ceratitis capitata*.

Tableau 4: Pourcentages des moisissures dans nos échantillons.

Moisissures	Fruits Sains	Fruits Infectés
<i>Penicillium sp.1</i>	2.6	9,74
<i>Penicillium sp.2</i>	4.5	11,68
<i>Aspergillus niger</i>	2,8	6,17
<i>Aspergillus fumigatus</i>	1,12	16,85
<i>Aspergillus oryzea</i>	0,56	0
<i>Alternaria sp.</i>	1,68	5,05
<i>Fusarium solani</i>	3,37	2,8
<i>Cladosporium sp.</i>	12,92	5,05
<i>Trichoderma sp.</i>	8.52	4.98
<i>Rhizopus sp.</i>	2.8	3.37
<i>Aspergillus flavus</i>	1.68	3.93

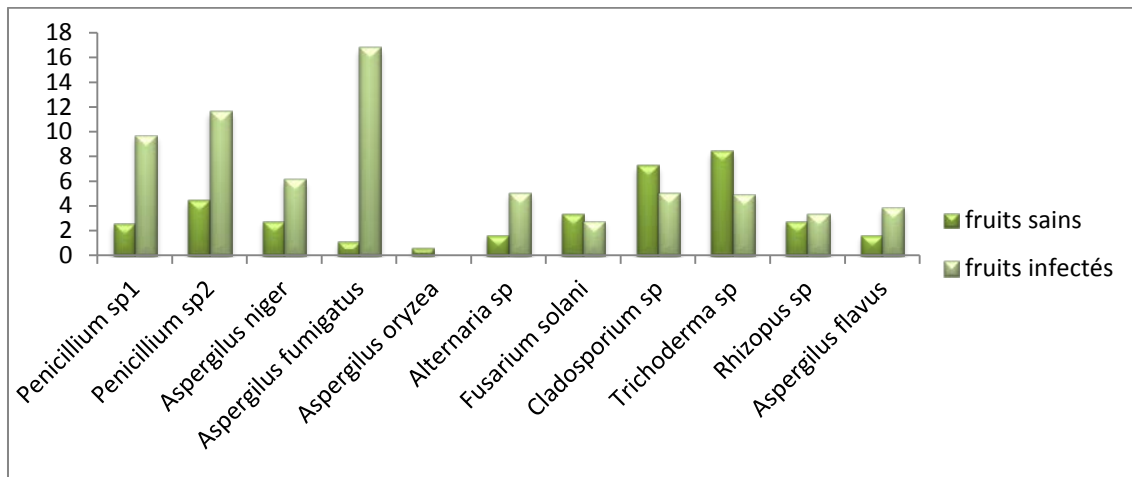


Figure 51 : Pourcentage des champignons isolés des oranges saines et contaminées.

2-Analyses bactériologiques :

2-1-Identification des genres de bactéries : Les bactéries sont ubiquitaires et sont présentes dans tous les types de biotopes rencontrés sur Terre. Les bactéries pathogènes pour les plantes sont connues pour leur responsabilité dans la dévastation de cultures agricoles.

L'identification des différents genres bactériens est réalisée en utilisant des tests morphologiques, culturels et biochimiques (les plaques API20E et les plaques API20NE).

Nous n'avons pas pu aller jusqu'à l'espèce par manque de moyens matériels (PCR).

Nous avons identifié les genres bactériens suivants (**Tableau 5**): *Pantoea sp.* (ou *Acinetobacter*) ; *Xanthomonas sp.*; *Bacillus sp.* ; *Pseudomonas sp.* ; *burkholderia sp.* ; et *Rhodotorula sp.*.

Tableau 5 : Résultats des caractères morphologiques, cultureux et biochimiques des bactéries isolées de nos échantillons d’orange.

Aspects	Gram	Mac Conkey	King A	King B	Respiration	Catalase	Oxy	Mevag	Genres
Bacille	-	+	-	+	Aéro- anaérobie	-	-	Métabolisme oxydatif	<i>Pantoea citrea</i>
Bacille	-	+	+	+	Aérobie stricte	+	+	Métabolisme fermentaire	<i>Xanthomonas</i>
Bacille	+	-	-	+	Aéro- anaérobie	+	+	/	<i>Bacillus</i>
Bacille	-	+	-	+	Aérobie stricte	+	+	Métabolisme oxydatif	<i>Pseudomonas</i>
Bacille	-	+	-	+	Aéro- anaérobie	+	+	Métabolisme oxydatif	<i>burkholderia</i>
coque	+	-	+	+	Aérobie stricte	+	+	/	<i>Rhodotorula</i>
Bacille	+	-	-	+	Aéro- anaérobie	+	+	/	<i>Bacillus</i>

Les pourcentages des genres de bactéries obtenus dans nos échantillons d’oranges sont représentés dans le **Tableau 6** et la **figure 46**.

Tableau 6: Pourcentages des bactéries dans nos échantillons.

Bactéries	fruits sains	fruits infectés
<i>Pantoea</i>	1,68	2,94
<i>Xanthomonas</i>	1,68	1,68
<i>Pseudomonas</i>	0	1,68
<i>Burkholdria</i>	0	1,68
<i>Rhodotorula</i>	4,2	5,04
<i>Bacillus sp1</i>	13,86	2,52
<i>Bacillus sp2</i>	15,12	21

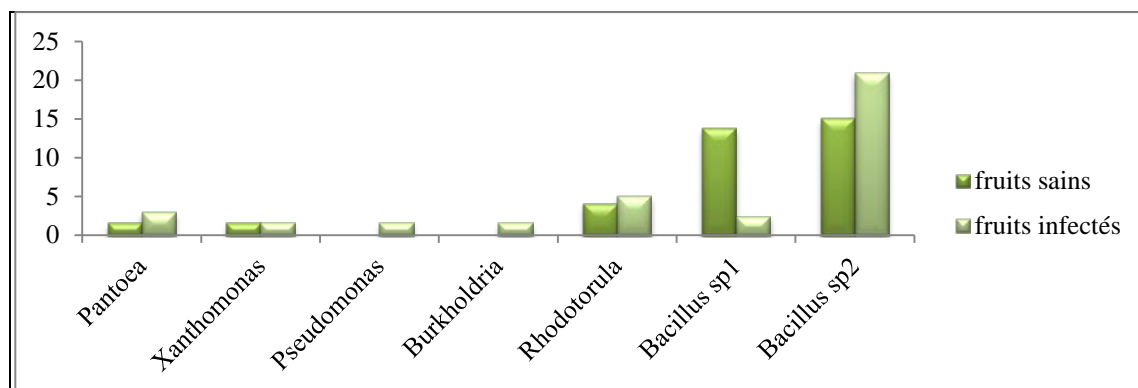


Figure 52: Pourcentages des bactéries sur les oranges saines et infectées.

B-Discussion:

1-Analyse mycologique:

Les résultats obtenus vont dans le même sens que ceux de **Matallah (1970)** et **Ahmed et al., (1997)** qui ont montré que les moisissures se développent généralement sur les fruits à teneur élevée en humidité. En développant leur mycélium à l'extérieur de l'orange, elles sont capables de fermenter ces sucres. Les moisissures qui causent le plus de dégâts appartiennent aux genres *Aspergillus*, *Penicillium* et *Alternaria*.

Akintobi et al., (2011) ont trouvé trois espèces fongique associées à la détérioration de *Citrus sinensis* à savoir *Aspergillus niger* (50.0%), *Penicillium digitatum* (100.0%) et *Rhizopus stolonifer* (50.0%);

D'après **Cuq (2007)**, les moisissures telles que: *Aspergillus*; *Rhizopus*, *Penicillium*, *Trichothecium*, *Bothrytis*, *Fusarium* etc... sont présentes plus fréquemment dans le sol et dans l'eau.

Dans le cas de *Penicillium sp.*, c'est un champignon responsable de plus de 80% de la pourriture des agrumes, toutes les espèces et variétés y sont sensibles (**Olsen et al., 2000**). Dans notre travail, c'est le genre le plus dominant que ce soit pour les fruits sains ou infectés, suivi du genre *Aspergillus sp.* qui est un pathogène très fréquent sur de nombreuses variétés d'agrumes.

Quant au genre *Fusarium*, les champignons de ce genre sont considérés comme étant les champignons telluriques les plus agressifs. Ils sont largement distribués dans le sol, représentant 40% de la mycoflore au niveau de la rhizosphère (**Mhiri, 2003**). Ces pathogènes sont capables de se

maintenir dans le sol, soit en menant une vie saprophytique sur des débris végétaux, soit sous forme d'organes de conservation comme les zygotes ou les sclérotés (**Boisson et Renard, 1987**).

Le genre *Alternaria sp.* est un champignons très commun et cosmopolite, il est trouvé en très faible pourcentage dans notre verger. Les spores d'*Alternaria sp.* sont présentes toute l'année dans les vergers, c'est un champignon phytopathogène des blessures (grattage d'épiderme, plaie de coupe du pédoncule), mais il pénètre surtout dans les fruits par les ouvertures naturelles (ombilic, cicatrice stellaire, craquelures de base du pédoncule) (**Olsen et al., 2000**). Par conséquent, les attaques des fruits par *Ceratitits capitata* favorisent son implantation.

Les études de **Mohammed et al., (2013)** ont montré que les souches fongiques isolées du *Citrus sinensis* de Nigeria sont *Rhizopus stolonifer*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus flavus*, *Fusarium oxysporum*, *Candida tropicalis*, *Fusarium solani*, *Penicillium digitatum* et *Penicillium chrysogenum*.

Le genre *Trichoderma* est aussi présent dans nos échantillons de fruits sains et contaminés. La capacité de cette moisissure à contrôler les pathogènes du sol est connue depuis les années 1920 (**Lepoivre, 2003**).

Aspergillus flavus est un phytopathogène s'attaquant à des récoltes économiquement importantes, telles les récoltes de maïs et d'arachides. Il est commun sur les arachides, les épices, les graines de lin, les céréales et parfois sur les fruits secs (les figues par exemple). *Aspergillus flavus* est souvent étudié en tant que contaminant produisant des mycotoxines comme les aflatoxines.

2-Analyse bactériologique:

La bactérie *Xanthomonas* provoque le chancre des agrumes. Le symptôme est la formation d'un tissu brun spongieux sur les branches, les feuilles et les fruits. On prévient la maladie en utilisant des cultivars résistants. Il n'existe aucune méthode de lutte chimique contre le chancre bactérien (**Simone, 1999**).

Pabitra et al., (1997) ont isolé quatre espèces de bactéries (*Bacillus subtilis*, *B. polymyxa*, *Pseudomonas fluorescens* et *Serratia marcescens*) à partir de la surface des feuilles de citron. Lorsque les antagonistes ont été testés pour leur efficacité dans le contrôle du chancre des agrumes en les appliquant sur le feuillage des cultures de l'Assam citron, ils ont

également réduit l'incidence du chancre citrique dans des conditions de terrain. *B. subtilis* a été le plus efficace antagoniste présentant un maximum d'inhibition (14,7 mm) de l'agent pathogène, réduisant l'incidence de la maladie de 61,9% (**Pabitra et al., 1997**).

Des espèces bactériennes du genre *Bacillus* utilisant des mécanismes d'action autres que celui employé par *B. thuringiensis* peuvent également protéger les plantes. Il y a, parmi ces espèces, des souches de *Bacillus licheniformis*, *Bacillus amyloliquefaciens* ou *Bacillus subtilis*. Ces dernières sont capables de coloniser les racines des plantes et de produire des molécules de nature lipopeptidique qui sont les surfactines, les iturines et les fengycines. Ces dernières peuvent soit activer les défenses des plantes, soit avoir un effet antibactérien ou antifongique direct (**Pérez-García et al., 2011**).

Une bactérie du genre *Pseudomonas* pourrait agir contre les champignons phytopathogènes par antibiose directe, par concurrence spatiale et nutritive ou en activant les défenses des plantes (**Boulon, 2010**).

Des bactéries ont été isolées de tissus de feuilles désinfectées en surface de plusieurs rhizomes de citron. Les principales espèces isolées sont *Alcaligenes* sp., *Bacillus* spp. (incluant *B. cereus*, *B. lentus*, *B. megaterium*, *B. pumilus* et *B. subtilis*), *Burkholderia cepacia*, *Curtobacterium flaccumfaciens*, *Enterobacter cloacae*, *Methylobacterium extorquens* et *Pantoea agglomerans*, *P. agglomerans* et *B. pumilus* furent les espèces retrouvées le plus souvent (**Wellington, 2001**).

PARTIE III : ETUDE PHYTOCHIMIQUE

A-Résultats:

1-Extraction des huiles essentielles de *T. capitatus*, *D. crinitus* et *T. articulata* :

1-1-Rendement des huiles essentielles : Les parties aériennes de *D. crinitus* ont été recueillies dans la zone forestière de Bensekrane (Tlemcen) au stade de la floraison, en Juin 2011. Les parties aériennes de *T. capitatus* ont été recueillies à Beni Snous dans la wilaya de Tlemcen au stade de la floraison, durant le mois de Juin 2011. Les parties aériennes de *T. articulata* ont été recueillies dans la région de Oujlida, Daira de Tlemcen au cours du mois de Juin 2011.

Les trois espèces de plantes sont stockées à -18 °C après récolte. Une portion (550 à 600 g) de matière fraîche et sèche de chaque espèce de plante est soumise à une hydrodistillation avec un appareil de type Clevenger selon la Pharmacopée européenne (**European Pharmacopoeia, 2004**). Les huiles essentielles sont séchées sur du sulfate de sodium anhydre et, après filtration, elles sont stockées dans des flacons ambrés stérilisés, à 4 °C jusqu'à leur utilisation.

Tableau 7: Rendements en huiles essentielles de *T. capitatus*, *D. crinitus* et *T. articulata*.

Huiles essentielles	<i>T. capitatus</i>		<i>T. articulata</i>	<i>D. crinitus</i>		
	frais	séché		Racines	Feuilles	Racines
Rendement (%)	0.28	3.2	0.001	0.23	0.45	0.37

Les résultats présentés dans le tableau 7 montrent que les rendements moyens obtenus de l'extraction par hydrodistillation au niveau du laboratoire sont de l'ordre de 0.001, 0.23, 0.28, 0.37, 0.45 et 3.2%. Nous remarquons une grande différence dans les rendements de la même espèce de *T. capitatus* selon les états considérés.

Si nous rassemblons les rendements de la même espèce, nous remarquons que *T. capitatus* est très riche en huile essentielle, *D. crinitus* vient en deuxième position et enfin *T. articulata* est celui qui possède le moins d'huile par rapport aux autres.

1-2- Composition chimique de l'huile essentielle et l'hydrolat de *Thymus capitatus* : Un total de 32 éléments représentant 99,2% de la composition de l'huile essentielle de *T. capitatus* qui sont identifiés par comparaison de leurs spectres EI-masse et leurs indices de rétention (RI) avec ceux des composés authentiques.

Tableau 8: Composition chimique de l'huile essentielle (HE) et de l'extrait d'hydrolat de *T. capitatus*

No. ^a	Components	/RI _a ^b	RI _a ^c	RI _p ^d	HE	HY	Identification ^e
1	α -Thujene	932	924	1028	0.2	-	RI, MS
2	α -Pinene	936	931	1028	0.9	-	RI, MS
3	Camphene	950	945	1071	0.2	-	RI, MS
4	Oct-1-en-3-ol	962	962	1441	0.5	0.2	RI, MS
5	β -Pinene	978	972	1113	0.1	-	RI, MS
6	Myrcene	987	982	1160	2.1	-	RI, MS
7	3-Octanol	981	982	1366	tr	0.1	RI, MS
8	α -Phellandrene	1002	999	1161	0.2	-	RI, MS
9	3-Carene	1005	1006	1149	0.1	-	RI, MS
10	α -Terpinene	1008	1011	1270	1.7	-	RI, MS
11	<i>p</i> -Cymene	1015	1015	1270	12.4	-	RI, MS
12	(<i>Z</i>)- β -Ocimene	1029	1022	1234	0.6	-	RI, MS
13	γ -Terpinene	1051	1050	1245	4.3	-	RI, MS
14	(<i>E</i>)-Sabinene hydrate	1051	1054	1445	0.1	0.6	RI, MS
15	Terpinolene	1082	1079	1281	0.2	-	RI, MS
16	Linalool	1083	1085	1538	1.7	0.5	RI, MS
17	Phenylacetaldehyde	1112	1108	1591	-	0.1	RI, MS
18	Camphor	1123	1124	1506	0.1	-	RI, MS
19	Isoborneol	1143	1144	1670	-	0.5	RI, MS
20	Borneol	1148	1150	1688	0.3	-	RI, MS
21	Terpinen-4-ol	1164	1162	1591	1.1	-	RI, MS
22	α -Terpineol	1176	1176	1690	0.1	0.2	RI, MS
23	<i>trans</i> -dihydroCarvone	1180	1182	1607	tr	-	RI, MS
24	<i>trans</i> -Myrtanol	1241	1242	1859	tr	-	RI, MS
25	Thymol	1266	1263	2181	0,6	0.1	RI, MS
26	Carvacrol	1278	1286	2193	69.6	95.1	RI, MS

27	Eugenol	1330	1329	2164	0.1	0.2	RI, MS
28	cis-Carvylacetate	1343	1345	1858	0.1	0.2	RI, MS
29	(E)- β -Caryophyllene	1421	1416	1591	1.6	-	RI, MS
30	(E)- α -Bergamotene	1434	1435	1573	tr	-	RI, MS
31	α -Humulene	1455	1448	1668	0.1	-	RI, MS
32	γ -Humulene	1483	1480	1702	tr	-	RI, MS
33	β -Bisabolene	1503	1499	1721	0.1	-	RI, MS
34	δ -Cadinene	1520	1511	1760	tr	-	RI, MS
35	(E)- α -Bisabolene	1530	1531	1755	0.1	-	RI, MS
36	Spathulenol	1572	1560	2120	-	0,1	RI, MS
37	Caryophylleneoxide	1578	1567	1969	0.1	1.1	RI, MS
38	Humuleneepoxide II	1602	1599	2044	-	0.1	RI, MS
Total identification %					99.2	99.1	
% Hydrocarboncompounds					12.6	-	
% Monoterpenehydrocarbons					10.7	-	
% Sesquiterpenehydrocarbons					1.9	-	
% Oxygenatedcompounds					86.7	99.1	
% Oxygenated monoterpenes					3.5	2.2	
% Oxygenated sesquiterpenes					0.1	1.3	
% Non terpenic oxygenated compounds					0.5	0.4	
% Aromaticterpenes					82.6	95.2	

a Ordre d'élution donné sur colonne polaire (Rtx-1), b indice de retention sur colonne Rtx-1 apolaire (RIa), c indice de retention sur colonne Rtx-Wax polaire (RIp), d indice de retention sur colonne Rtx-Wax polaire (RIp), e RI: indice de retention; % abondances normalisée; MS: Masse Spectrometrie en mode EI; EO: huile essentielle de la partie aérienne; HY: Extrait d' hydrolat de la partie aerienne obtenu par extraction liquide-liquide.

L'huile essentielle est très dominée par des composés oxygénés (87,1%) avec une quantité élevée de composants aromatiques terpéniques (82,6%). Toutefois, les monoterpènes hydrocarbonés sont apparus aussi en proportion appréciable (10.7 %). En effet, les principaux constituants de l'huile essentielle sont le carvacrol (69,6%), le p-cymène (12,4%), suivis par le γ -terpinène (4,3%), le myrcène (2,1%), α -terpinène (1,7%), le linalol (1,7%) et le terpinène-4-ol (1,1%). Ces résultats sont en accord avec ceux rapportés dans la littérature (**Ruberto et al., 2000; Bounatirou et al., 2007; Amarti et al., 2008; Tawaha et Hudaib, 2012**). D'autre part, les différents profils chimiques des huiles essentielles (thymol, cavacrol ou thymol/carvacrol comme composants principaux) sont

rapportés selon les origines géographiques de *T. capitatus* (Karouso et al., 2005; Miceli et al., 2006). Inversement, l'analyse de l'extrait de l'hydrosol a montré la présence de 14 composés oxygénés (7 monoterpènes, 3 sesquiterpènes, 3 composants non-terpeniques et un phénylpropanoïde), aucun composé hydrocarboné n'a été signalé. La composition chimique de l'extrait de l'hydrolat est dominée par le carvacrol (95,1%) et de très faible quantité de monoterpènes (Tableau 8).

1-3- Composition chimique de *D. crinitus* et *T. articulata*: L'analyse de l'huile essentielle de parties aériennes de *D. crinitus* récolté dans la forêt de Bensekrane (Tlemcen) a permis d'identifier 30 éléments, qui représentent 91,3% de la composition totale.

Tableau 9: Composition chimique des huiles essentielles de *D. crinitus* et *T. articulata*

No. ^a	Composants	IR	<i>D. crinitus</i>	<i>T. articulata</i>
01	Nonane	910	0.6	-
02	α -Thujene	936	-	tr
03	α -Pinene	939	0.5	32.0
04	α -Fenchene	941	-	0.6
05	Camphene	953	-	0.3
06	Oct-1-en-3-ol	962	-	-
07	Sabinene	976	0.6	4.3
08	β -Pinene	980	0.1	1.4
09	Myrcene	991	0.6	3.3
10	α -Phellandrene	1005	-	1.5
11	3-Carene	1011	-	9.6
12	<i>p</i> -Cymene	1015	0.2	0.5
13	α -Terpinene	1018	-	-
14	β -Phellandrene	1028	-	1.4
15	Limonene	1031	0.9	4.3
16	(E)- β -Ocimene	1041	0.6	0.7
17	(Z)- β -Ocimene	1029	-	-
18	γ -Terpinene	1051	1.6	0.7
19	(E)-Sabinene hydrate	1051	-	0.2
20	Nonanal	1076	0.1	-

21	Terpinolene	1082	0.4	3.2
22	(Z)-Sabinene hydrate	1087	-	0.8
23	Linalool	1083	0.2	0.2
24	Undecane	1100	4.1	-
25	3-Octyl acetate	1113	-	0.2
26	Veratol	1112	-	0.1
27	Camphor	1123	-	-
28	(Z)-Verbenol	1037	-	0.3
29	Isoborneol	1143	-	-
30	Borneol	1148	-	-
31	Terpinen-4-ol	1177	0.1	2.0
32	α -Terpineol	1176	-	0.1
33	Decanal	1188	1.4	-
34	Octylacetate	1192	2.3	-
35	Linalylacetate	1239	-	0.2
36	Bornylacetate	1259	-	0.7
37	Thymol	1266	-	-
38	Carvacrol	1279	-	-
39	Eugenol	1332	-	-
40	α -Terpinylacetate	1337	-	1.8
41	Dodecanal	1391	3.1	-
42	β -Funebrene	1419	-	1.6
43	(E)- β -Caryophyllene	1423	0.6	4.0
44	Thujopsene	1435	-	0.2
45	α -Humulene	1455	-	2.5
46	γ -Curcumene	1475	-	0,3
47	Germacrene D	1479	-	1,3
48	γ -Humulene	1480	0.7	-
49	β -Selinene	1481	-	0,1
50	Pentadecane	1500	5.1	-
51	δ -Cadinene	1526	0.1	0.3
52	β -Elemol	1541	-	0,4
53	Isochavicolisobutyrate	1551	44.9	-
54	Germacrene B	1556	-	0,2

55	Dodecanoicacid	1559	1.1	-
56	Caryophylleneoxide	1581	-	0.4
57	Dodecylacetate	1589	2.5	-
58	Globulol	1592	-	0.9
59	Cedrol	1599	-	11.0
60	Humuleneepoxide II	1605	-	0.1
61	epi-Cedrol	1619	-	0,2
62	α -Acorenol	1633	-	0,3
63	γ -Eudesmol	1629	-	0,1
64	τ -Cadinol	1636	-	0,2
65	α -Eudesmol	1639	-	0,3
66	Isochavicol 2-methyl butyrate	1659	9.7	-
67	Bulnesol	1662	-	0,2
68	Heptadecane	1700	3.4	-
69	Tetradecanoicacid	1766	3.1	-
70	Cedrylacetate	1769	-	0,6
71	Neophytadiene	1806	0.4	-
72	Hexadecanoicacid	1963	1.1	-
73	Manool	2075	-	0,3
74	(E)-Phytol	2123	1.7	-
Total identification %			91.8	95.9
% Hydrocarbon compounds			20.5	74.3
% Monoterpene hydrocarbons			5.5	63.8
% Sesquiterpene hydrocarbons			1.4	10.5
% Non terpenichydrocarnon compounds			13.2	-
Diterpenes hydrocarbons			0.4	-
% Oxygenated compounds			71.3	21.6
% Oxygenated monoterpenes			0.3	6.4
% Oxygenated sesquiterpenes			-	14.7
% Non terpenic oxygenated compounds			14.7	0.2
% Aromatic compounds			54.6	-
Oxygenated diterpenes			1.7	0.3

Leurs indices de rétention et les pourcentages relatifs sont présentés dans le Tableau 8.

Les principaux composants de l'huile des parties aériennes sont des phénylpropanoïdes, principalement l'isobutyrateisochavicol (44,9%). Les autres composants majeurs identifiés sont: isochavicol 2 méthylbutyrate (9,7%), pentadécane (5,1%) et undécane (4,1%) (tableau 9). Ce résultat est en accord avec les données de la littérature (**Lanfranchi et al., 2010**).

Un total de 54 éléments représentant 95,9% de l'huile totale de *T. articulata* sont identifiés. Les huiles essentielles sont fortement dominées par les monoterpènes hydrocarbonés (63,8%), suivis par les sesquiterpènes oxygénés (14,7%) et les sesquiterpènes hydrocarbonés (10,5%). Toutefois, les monoterpènes oxygénés sont apparus en faible proportion (6,4%).

Les composés les plus abondants sont les α -pinène (32,0%), le cédrol (11,0%), 3-carène (9,6%), le limonène (4,3%), sabinène (4,3%) et le (E)- β -caryophyllène (4,0%). **Ben Jemia et al., (2013)** ont isolé et identifié, par CPG/SM, 66 composés, les principaux constituants de l'huile sont: l'acétate de bornyle (31,4%), α -pinène (24,5%) et le camphre (20,3%). Tandis que **Toumi et al., (2011)** ont identifié, par CPG/SM, plus de 45 composés, le camphre (23,4-31,6%), acétate de bornyle (17,1-25,8%), de bornéol (6,6-14,3%), limonène (3,7-10,1%) et α -pinène (6,5-11,3%) sont les principaux composants de l'huile essentielle de *T. articulata*. Il a été observé que le pourcentage de α -pinène (19,8 à 24,9%) et de l'acétate de bornyle (de 40,2 à 59,2%) pour les feuilles huiles provenant de deux sites différents en Algérie sont les principaux constituants (**Chikhouné et al., 2013**). En outre, le pourcentage de cédrol et 3-carène trouvés dans l'huile essentielle est plus élevé que le cédrol et le 3-carène dans les études précédentes. En général, la qualité et la quantité de composants présents dans les huiles essentielles peuvent être affectées par plusieurs facteurs tels que le génotype de la plante, la situation géographique, la saison et l'état agronomique (**Gümüş et al., 2010**).

2- Extraction à base de solvants organiques:

2-1- Rendements des extraits de *T. capitatus*, *D. crinitus* et *T. articulata* : Le tableau 10 représente les rendements des différents extraits à base de solvants organiques des trois plantes utilisées dans cette étude.

Le thuya de barbarie *Tetraclinis articulata* et *Daucus crinitus* ont donné des rendements importants pour les extraits de solvants (hexane, chloroforme, éthanol, eau et ether de pétrole) (Tableau 10). Le thym aussi a de bons rendement sauf pour l'hexane qui est le plus faible (0.57%).

Tableau 10 : Rendements des extraits de *T. capitatus*, *D. crinitus* et *T. articulata*

Extraits	<i>T. capitatus</i>	<i>D. crinitus</i>	<i>T. articulata</i>
Hexane	0.57	2.08	12.10
Chloroforme	3.37	3.66	4.94
Ethanol	13.17	6.63	4.95
Eau	5.85	3.24	4.32
Ether de pétrole	1.60	7	6.03

2-2- Profil des acides gras de *T. capitatus*: L'analyse par chromatographie en phase gazeuse (CG) et couplage chromatographique en phase gazeuse-spectrométrie de masse (CG-SM) réalisée sur les parties aériennes a révélé que les acides gras sont tous à majorité : l'acide α -linoléique (29,6%), palmitique (16,6%), linoléique (15,1%) et l'acide béhénique (9,6%). Les autres composés présents dans des quantités appréciables dans cette plante sont le 1,2-benzendicarboxylic (3,9%), l'acide stéarique (3,8%), arachidique (3,5%) et oléique (2,2%) (Tableau 11). L'acide linoléique et l'acide linoléique sont des acides gras essentiels; de nombreuses activités de ces lipides ont été rapportées.

Tableau 11 : Composition en acides gras des parties aériennes de *T. capitatus*

N ^o ^a	Composantes acides	IRI ^a ^b	RI ^a ^c	RI ^p ^d	Parties aériennes ^e	Identification ^f
1	Myristique (Tetradecanoïque)	1707	1708	2000	0.5	RI, MS, Ref.
2	Pentadecanoïque	1810	1808	2126	0.2	RI, MS, Ref.
3	Palmitique (Hexadecanoïque)	1907	1910	2208	16.6	RI, MS, Ref.
4	Margarique (Heptadecanoïque)	2011	2009	2309	0.2	RI, MS, Ref.
5	Linoléique((Z,Z)-9,12-	2073	2073	2481	15.1	RI, MS, Ref.

	octadecadienoïque)						
6	α -Linolénique ((Z,Z,Z)-9.12.15- octadecatrienoïque)	2078	2078	2549	29.6	RI, MS, Ref.	
7	Oleïque ((Z)-9-Octadécénoïque)	2081	2081	2433	2.2	RI, MS, Ref.	
8	(Z)-6-Octadécénoïque	2104	2087	2437	0.9	RI, MS, Ref.	
9	Stéarique (Octadécénoïque)	2113	2111	2414	3.8	RI, MS, Ref.	
10	Nonadécénoïque	2210	2210	2517	0.2	RI, MS, Ref.	
11	Arachidique (Eicosanoïque)	2311	2310	2622	3.5	RI, MS, Ref.	
12	Hénéicosanoïque	2410	2411	2724	0.8	RI, MS, Ref.	
13	1,2-Benzendicarboxyloïque	2500	2505	2884	3.9	RI, MS, Ref.	
14	Behénique (Docosanoïque)	2512	2513	2829	16.7	RI, MS, Ref.	
15	Tricosanoïque	2611	2613	2929	0.8	RI, MS, Ref.	
	% identification				95.0		
	Acides gras saturés				43.3		
	Acides gras insaturés				47.8		
	Autres				3.9		

^a Ordre d'éluion donné en colonne apolaire (Rtx-1). ^b indice de rétention de la littérature pour esters correspondant en colonne apolaire (IRIa). ^c indice de rétention d'esters correspondant en colonne Rtx-1 apolaire (RIa). ^d indice de rétention d'esters correspondant en colonne Rtx-1 polaire (RIp). ^e pourcentages Relative (%) en colonne apolaire (Rtx-1); ^f RI: indice de rétention; MS: Masse Spectrométrie en mode EI; Ref.: composés identifiés dans la littérature data ^{16,17}.

2-3-Criblage phytochimique: Les résultats du criblage phytochimique de l'extrait à l'hexane sont représentés dans le tableau ci-dessous.

Tableau 12 : Prospection Phytochimique de l'extrait à l'hexane du *T. capitatus*

Metabolites					
Extract	1	2	3	4	5
Hexane	+	+	+	-	-

1: flavononols; 2: polyterpénoides ; 3: stéroïdes; 4: alcaloïdes; 5: coumarines ; +: présence; - : absence

À partir de ces résultats, nous observons que l'extrait de l'hexane montre une inférence positive au test pour les flavonoïdes, polyterpénoides et stéroïdes. Cependant, l'essai produit une inférence négative pour les coumarines et les alcaloïdes (tableau 12).

PARTIE IV : ACTIVITES BIOLOGIQUES

A- Résultats:

1- Activité insecticide des huiles essentielles étudiées vis-à-vis de *Ceratitis capitata*

Au cours des dernières années, l'utilisation des huiles essentielles (OE) dérivées de 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.

1-1- Activité insecticide de l'huile essentielle de *T. capitatus* :

Cette huile essentielle s'est révélée très biocide vis à vis des adultes de *Ceratitis capitata*, avec une dose de 1.2 µl nous avons remarqué une mortalité de 100% de la population après une demie heure, ce qui nous a conduit à faire des dilutions de l'huile essentielle dans le DMSO (Diméthylsulfoxyde) qui, à lui seul n'a pas d'activité sur les insectes.

A la dose de 0.5µl de l'OE de *T. capitatus* frais, nous avons observé une mortalité de 90% des individus, Le même taux de mortalité est observé pour une concentration de 0.1 µl de l'OE de *T. capitatus* sec. La dose létale DL50 est très faible, elle est de 0.057µl/ml pour le thym sec et de 0.067µl/ml pour le thym frais, ce qui signifie que notre essence est très biocide.

En revanche, l'huile essentielle de *Thymus capitatus* ne présente pas une activité larvicide importante puisque à une concentration de 0.2µl, nous avons remarqué un taux de mortalité très faible, avoisinant seulement 4.66%.

Les pourcentages de toxicité des deux huiles essentielles de *T. capitatus* frais et sec vis-à-vis *C. capitata* par ces tests de fumigation sont représentés dans le **tableau 13** suivant:

Tableau 13 : Toxicité des huiles essentielles de *T. capitatus* vis-à-vis des adultes de *C. capitata*

<i>T. capitatus</i> frais		<i>T. capitatus</i> sec	
Concentrations (µl/ml)	Pourcentages (%)	Concentrations (µl/ml)	Pourcentages (%)
Témoin	0.0	Témoin	0.0
0,2	87	0,05	17
0,5	90	0,1	93
0,8	100	0,15	100
1.0	100	0,2	100

Nous remarquons que l'huile essentielle de *T. capitatus* sec est plus biocide que celle à l'état frais puisque elle est efficace à des concentrations très faibles (**Tableau 13**).

Comme la valeur de la probabilité pour le test F est inférieure à 0.05, il y a une différence statistiquement significative entre les moyennes de mortalité d'un niveau de concentration à l'autre au niveau de confiance de 95.0%.

Source	SC	CM	F _{obs}	P
Dose	329.167	65.8333	592.50	0.000

1-2- Activité insecticide de l'huile essentielle de *T. articulata*:

Les molécules des substances bioactives des deux concentrations 5 µL et 10µL de l'essence du *Tetraclinis articulata* semblent très toxiques pour les populations des adultes puisque les pourcentages de toxicité sont supérieurs à 65% excepté pour la concentration de 2µL qui présente une toxicité moyenne de plus de 30%. La concentration 10µl a provoqué une mortalité de 100% de la population pour tous les essais biologiques effectués.

En revanche, la molécule bioactive de 1µL est faiblement toxique pour la population des adultes de *C. capitata*, ce qui explique le pourcentage 10%.

La dose létale DL50 est très faible, elle est de 4.36µl/L air ce qui signifie que notre essence est très biocide.

Les pourcentages de toxicité des deux huiles essentielles de *T. articulata* vis-à-vis des adultes de *C. capitata* par le test de fumigation sont représentés dans le **tableau 14** suivant:

Tableau 14: Toxicité de l'huile essentielle de *T. articulata* vis-à-vis des adultes de *C. capitata*

T.articulata	
Doses (μl / L air)	Pourcentages (%)
Témoin	0
1	10
2	32
5	65
10	100

La valeur de la probabilité pour le test F est inférieure à 0.05, donc il y a une différence statistiquement significative entre les moyennes de mortalité d'un niveau de concentration à l'autre au niveau de confiance de 95.0%.

Source	SC	CM	F _{obs}	P
Dose	163.778	32.7556	73.70	0.000

1-3- Activité insecticide de l'huile essentielle de *Daucus crinitus*:

Les doses de l'huile essentielle du *D. crinitus* des parties aériennes et souterraines sont les suivantes: 1 μl ; 1.5 μl ; 2.5 μl ; 5 μl ; et 15 μl . Le taux de mortalité est nul pour toutes les concentrations testées, même après 24 heures.

Alors les essences de la carotte sauvage ne présentent aucun pouvoir insecticide ni larvicide.

2- Activités antifongiques in vitro des plantes étudiées:

2-1- Activité antifongique in vitro des huiles essentielles de *T. capitatus*: Les maladies des plantes continuent à jouer un rôle majeur dans la limitation de la production agricole, en particulier dans les cultures gérées de manière intensive. Toutefois, les préoccupations concernant la sécurité alimentaire, la qualité de l'environnement et la résistance aux pesticides ont dicté la nécessité pour les techniques de lutte antiparasitaire (**Zambonelli et al., 1996**).

Tableau 15 : pourcentages d'inhibition du développement mycélien à différentes concentrations d'huile essentielle de *T. capitatus*.

Moisissures	<i>Penicillium</i> <i>m sp.</i>	<i>A. niger</i>	<i>Alternaria</i> <i>sp.</i>	<i>Cladosporium</i> <i>sp.</i>	<i>Fusarium</i> <i>sp.</i>	<i>A. oryzae</i>	<i>A. flavus</i>
Huile essentielle du Thymus							
0.1µl/ml	88	100 EF	100 EF	100 EF	100EF	100EF	50
0.5µl/ml	100 EC	100 EC	100 EC	100 EC	100EC	100EC	100EC
1µl/ml	100 EC	100 EC	100 EC	100 EC	100EC	100EC	100EC
Extrait hydrolat							
0.1µl/ml	100 EF	100 EF	100 EF	100 EF	100EC	100EC	100EF
0.2µl/ml	100 EF	100 EF	100 EC	100 EC	100EC	100 EC	100EF
0.5µl/ml	100 EF	100 EF	100 EC	100 EC	100EC	100EC	100EC

EF: effet fongistatique; **EC:** effet fongistatique.

Les effets inhibiteurs de l'huile essentielle et de l'extrait d'hydrolat ont été évalués sur quatre champignons pathogènes des agrumes: *A. Niger*, *A. Oryza*, *P. italicum* et *F. solani*. Les résultats obtenus pour l'activité antifongique de l'huile essentielle et de l'extrait d'hydrolat par la technique de croissance radiale sont rapportés dans le **tableau 15**. Ces résultats indiquent que l'inhibition de la croissance du mycélium de chaque souche est fortement influencée par les concentrations des deux extraits.

L'huile essentielle et l'extrait d'hydrolat ont complètement inhibé toutes les souches. L'activité la plus élevée est observée contre *P. italicum* avec une valeur de concentration minimale provoquant 100% d'inhibition de la croissance mycélienne à 0,1 µg/mL. La deuxième activité la plus élevée est observée contre *A. oryzae* et *F. solani* avec une valeur de concentration minimale causant 100% d'inhibition de la croissance mycélienne à 0,2 µg/mL. Cependant, la concentration minimale provoquant 100% d'inhibition de la croissance du mycélium de la souche *A. nqiger* est de 0,5 µg/mL. L'huile essentielle et l'extrait de l'hydrolat sont plus forts par rapport au fongicide témoin Amphotéricine B. En outre, l'huile essentielle et l'extrait de l'hydrolat sont fongicides pour les trois agents pathogènes de *Citrus sinensis* : *A. Niger*, *A. Oryza* et *F. solani* et fongistatique pour *P. italicum*.

2-2- Activités antifongiques in vitro des extraits de *T. capitatus*: Nous observons des activités antifongiques significatives des extraits de *Thymus capitatus* à savoir l'extrait hexanique qui a exercé une forte action vis à vis des moisissures testées, dans le cas de *Penicilium sp*, *A. niger*, *Alternaria sp*, *Cladosporium sp.*, *Fusarium sp.*, *A.oryzae* une concentration de 1.25mg/ml est fongicide c'est-à-dire que lorsque nous avons transféré le disque mycélien dans une boîte de milieu PDA neuf, il n'y a pas eu un développement du mycélium. Et pour *A. flavus* une concentration de 2.5mg/ml avait une action fongistatique.

Quant à l'extrait chloroformique, l'activité est aussi importante; pour une concentration de 2.5mg/ml, *A. flavus* résiste avec un pourcentage d'inhibition de 2.5% et *A. niger* est sensible avec un pourcentage d'inhibition de 90%. Par ailleurs, il a une action fongicide pour *Penicilium sp.*

Tandis que *Alternaria sp*, *Cladosporium sp.*, *Fusarium sp.*, *A.oryzae* sont très sensibles pour la concentration de 1.25mg/ml où l'action est fongistatique (**Tableau 16**).

L'activité antifongique de l'extrait éthanolique est de plus en plus importante en augmentant sa concentration, le genre *Alternaria sp.* est le plus sensible, l'action est fongistatique pour la concentration de 2.5mg/ml. *A. flavus* est toujours le plus résistant même si la concentration de l'extrait atteint 5.55mg/ml.

Penicillium sp, *A. niger*, *Cladosporium sp.*, *Fusarium sp.* et *A. oryzae* sont sensibles avec un pourcentage d'inhibition de 81.11%, 71.42%, 88.57%, 73.33%, 80% respectivement (**Tableau 16**).

L'extrait de l'éther de pétrole est moins actif par rapport aux autres extraits à base de solvants polaires, nous avons augmenté la concentration jusqu'à 927.5mg/ml pour avoir une action fongistatique vis à vis de *Alternaria sp*, *Cladosporium sp.*, *Fusarium sp.* et une action fongicide pour *A. oryzae*. *Penicilium sp.* est aussi sensible avec un pourcentage d'inhibition de 90%; alors que *A. niger* et *A. flavus* sont moyennement sensibles (**Tableau 16**).

Tableau 16 : pourcentages d'inhibition des extraits de *T. capitatus*.

Moisissures	<i>Penicillium</i> <i>sp.</i>	<i>A. niger</i>	<i>Alternaria</i> <i>sp.</i>	<i>Cladosporium</i> <i>sp.</i>	<i>Fusarium</i> <i>sp.</i>	<i>A.oryzae</i>	<i>A. flavus</i>
Hexane							
0.5mg /ml	100 EC	33.33	100 EF	100EF	100 EF	100 EC	83.33
1.25mg/ml	100 EC	100 EF	100 EC	100 EC	100 EC	100 EC	100 EF
2.5mg/ml	100 EC	100 EC	100 EC	100 EC	100 EC	100 EC	100 EF
Chloroforme							
0.5mg /ml	70	57.14	72.22	75.71	72.22	72	0
1.25mg/ml	90	71.42	100 EF	100 EF	100 EF	100 EF	0
2.5mg/ml	100 EC	90	100 EF	100 EF	100 EF	100 EF	2.5
Ethanol							
0.5mg/ml	10	35.71	62.5	28.57	21.11	10	0
1.25mg/ml	25.55	42.85	87.5	54.28	33.33	26	11.11
2.5mg/ml	65.66	64.28	100 EF	72.85	72.22	58	17.77
5.55mg/ml	81.11	71.42	100 EF	88.57	73.33	80	27.27
Ether de pétrole							
371mg/ml	33.33	22.22	65	78.57	38.88	54	16.66
927.5mg/ml	90	13.33	100 EF	100 EF	100 EF	100 EC	57.77

EF: effet fongistatique; EC: effet fongistatique.

2-3- Activités antifongiques in vitro des huiles essentielles de *T. articulata*: Nos résultats démontrent que l'huile essentielle de *T. articulata est* efficace contre le développement des sept moisissures *Penicilium sp.*, *A. niger*, *Alternaria sp.*, *Cladosporium sp.*, *Fusarium sp.*, *A.oryzae*, *A. flavus* avec des pourcentages de réduction du mycélium de 62.22%, 55.55%, 68.75%, 75.71%, 67.77%, 76% et 55.55% respectivement (**Tableau 17**).

Tableau 17 : Pourcentages d’inhibition de l’huile essentielle de *T. articulata*

Moisissures	<i>Penicilium</i> <i>sp.</i>	<i>A. niger</i>	<i>Alternaria</i> <i>sp.</i>	<i>Cladosporium</i> <i>sp.</i>	<i>Fusarium</i> <i>sp.</i>	<i>A.oryzae</i>	<i>A. flavus</i>
0.2µl/ml	31.33	14.71	32.5	30.57	36.36	24.61	28.39
0.5µl/ml	62.22	55.55	68.75	75.71	67.77	76	55.55

2-4- Activités antifongiques in vitro des extraits de *T. articulata*: En analysant les résultats présentés dans le tableau 16, nous constatons que tous les extraits de *Tetraclinis articulata* montrent une action importante vis-à-vis des champignons phytopathogènes de *Citrus sinensis*.

Avec une concentration de 1 mg/ml de l’extrait de l’hexane, *Fusarium sp.* est le plus sensible avec un pourcentage d’inhibition de 90% suivi de *Penicillium sp.*, *Cladosporium sp.*, *Alternaria sp.*, *A.oryzae*, *A. flavus* et *A. niger*.

Pour la même concentration de l’extrait de chloroforme *Cladosporium sp.* est totalement inhibé, mais *A. niger* montre une résistance avec un pourcentage d’inhibition de 2.43%.

Une élévation de concentration des extraits à base d’éthanol et de l’éther de pétrole a exprimé une bonne activité antifongique de ces derniers contre toutes les moisissures testées (**Tableau 18**).

Tableau 18: Pourcentages d’inhibition des extraits de *T. articulata*.

Moisissures	<i>Penicilium</i> <i>sp.</i>	<i>A. niger</i>	<i>Alternaria</i> <i>sp.</i>	<i>Cladosporium</i> <i>sp.</i>	<i>Fusarium</i> <i>sp.</i>	<i>A.oryzae</i>	<i>A. flavus</i>
Hexane							
1 mg/ml	88.88	50	87.5	88.57	90	80	55.55
Chloroforme							
0.25mg/ml	22.22	1.23	11.11	75.71	46.66	16.66	25
0.5mg/ml	33.33	2.43	44.44	80	50	36.66	50
1mg/ml	58.88	2.43	71.11	100EC	88.88	73.33	56.25
Ethanol							
0.625mg/ml	25	2.5	40	77.14	47.5	26.66	0
1.25mg/ml	37.05	4.87	55.55	81.42	51.25	30	12.5

2.5mg/ml	81.25	57.31	77.77	88.57	81.25	50	62.5
Ether de pétrole							
0.625mg/ml	11.11	26.82	37.77	75.71	44.44	33.33	12.5
1.25mg/ml	55.55	14.63	51.11	85.71	55.55	40	37.5
2.5mg/ml	88.88	39.02	71.77	87.14	81.11	56.66	50

2-5- Activités antifongiques in vitro des huiles essentielles de *D. crinitus*: Les huiles essentielles des différentes parties de *Daucus crinitus* exercent une activité antifongique significative à seulement 1µl/ml d'essence de la partie aérienne, *Cladosporium sp.* Est inhibé avec un pourcentage supérieur à 71%.

Avec le même pourcentage d'inhibition *A. oryzae* montre une sensibilité avec une concentration un peu plus élevée de 3.5µl/ml (**Tableau 19**).

Tableau 19 : Pourcentages d'inhibition des huiles essentielles de *D. crinitus*

Moisissures	<i>Penicillium</i> <i>sp.</i>	<i>A. niger</i>	<i>Alternaria</i> <i>sp.</i>	<i>Cladosporium</i> <i>sp.</i>	<i>Fusarium</i> <i>sp.</i>	<i>A.oryzae</i>	<i>A. flavus</i>
Racines du <i>Daucus</i>							
0.5µl/ml	31.25	25.88	5.45	37.14	0	8.57	0
1µl/ml	43.75	35.29	45.45	65.71	58.75	42.85	0
3.5µl/ml	50.32	64.7	50.9	68.57	57.5	71.42	12.5
Feuilles du <i>Daucus</i>							
0.5µl/ml	12.5	17.64	5.45	51.42	0	34.28	0
1µl/ml	13.6	23.52	21.81	71.42	72.5	45.71	6.25

2-6-Activités antifongiques in vitro des extraits de *D. crinitus*: Les extraits de *D. crinitus* ont réussi à inhiber les moisissures, sauf pour *A. oryzae* qui a été très sensible par rapport à l'extrait chloroformique de la partie aérienne, alors que l'extrait aqueux n'a aucune activité vis-à-vis de cette moisissure. Les résultats sont présentés dans le **tableau 20**.

Tableau 20 : Pourcentages d'inhibition des extraits de *D. crinitus*.

Moisissures		<i>Penicillium</i> <i>sp.</i>	<i>A.</i> <i>niger</i>	<i>Alternaria</i> <i>sp.</i>	<i>Cladosporium</i> <i>sp.</i>	<i>Fusarium</i> <i>sp.</i>	<i>A.</i> <i>oryzae</i>	<i>A.</i> <i>flavus</i>
Racines du <i>Daucus</i>								
Chloroform	1mg/ml	54.44	78.88	81.25	85.71	78.88	74	72.22
Ethanol	2.25mg/ml	11.11	12.22	21.25	71.42	44.44	58	25.56
Eau	1.5mg/ml	22.22	11.11	43.75	1.42	33.33	0	11.11
Feuilles du <i>Daucus</i>								
Chloroforme	1mg/ml	62.22	64.44	81.25	82.85	66.66	100	73.33
Ethanol	2.25mg/m	11.11	11.11	0	74.28	52.22	60	22.22
Eau	1.5mg/ml	55.55	33.33	51.25	28.57	33.33	0	11.11

3- Activités antifongiques in vivo :

3-1- Activité antifongique in vivo de *T. capitatus* contre le développement de *P. italicum*: Les résultats in vivo du traitement du champignon *Penicillium italicum*, responsable de la pourriture des agrumes, par l'hydrolat de *T. capitatus* sont présentés dans le tableau 19 et la figure 47. L'hydrolat a montré une forte activité antifongique. Même à la fin du 15^{ème} jour d'entrepôt, il n'y avait aucune différence significative dans les diamètres des lésions chez les oranges traitées par rapport au témoin négatif. Les moyennes des diamètres de détérioration (mm) mesurés après 3, 6, 9, 12 et 15 jours sur les oranges avec des concentrations de 0,1 et 0,2 µg/ml d'huile essentielle, d'extrait de l'hydrolat et de l'hydrolat de *T. capitatus* sont présentées dans le **Tableau 21**.

Suivant l'augmentation de la concentration, la diminution de l'incidence de la maladie est notable. Les résultats obtenus prouvent que les diamètres des lésions sur les fruits, avec les deux concentrations (0,1 et 0,2 µg/mL) de l'huile essentielle et de l'extrait de l'hydrolat ont montré une forte activité antifongique, même au bout de 15 jours d'entrepôt

De faibles concentrations de l'hydrolat sont nécessaires pour la protection des oranges des infections par les champignons.

De plus, l'extrait d'hydrolat a montré une absence totale d'infection des oranges et aucune incidence de la maladie. Le résultat obtenu à partir de l'extrait d'hydrolat est montré sur la figure 47 ci-dessous.

Tableau 21: Moyennes des diamètres de détérioration (mm)

Traitements	Diamètre de détérioration (mm)				
	3 ^{ème} jour	6 ^{ème} jour	9 ^{ème} jour	12 ^{ème} jour	15 ^{ème} jour
Contrôle	1.1±0.2	2.8±0.3	5.7±0.5	8.1±0.8	13.2±0.2
Huile essentielle					
0.1 µg/mL	0.0±0.0	0.0±0.0	0.5±0.01	1.5±0.2	2.5±0.5
0.2 µg/mL	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.5±0.01	1.0±0.2
Extrait d'hydrolat					
0.1 µg/mL	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.5±0.06	1.5±0.2
0.2 µg/mL	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.5±0.02
Hydrolat	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0

L'orange pourrie (à gauche) qui a été inoculée par le pathogène de *P. italicum* (témoin), et l'orange non pourrie (à droite) à laquelle l'hydrolat est appliqué 30 minutes avant l'inoculation de l'agent pathogène, est entreposée pendant 15 jours à 25°C. Ces photos montrent l'efficacité de l'hydrolat, visible à l'œil nu.



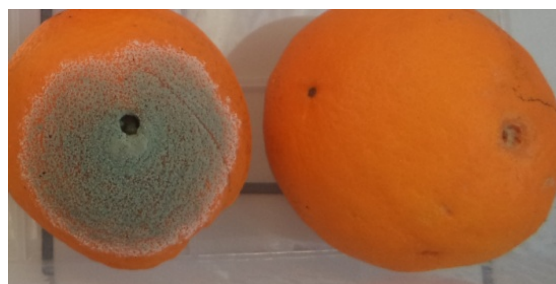
3^{ème} jour

6^{ème} jour



9^{ème} jour

12^{ème} Jour



15^{ème} jour

Figure 53: Effet de l'hydrolat de *T. capitatus* sur le développement de *P. italicum*.

3-2- Traitement des oranges non infectées par l'hydrolat de *T. capitatus* :

Les résultats in vitro du traitement de *P. italicum* responsable de la pourriture des agrumes par l'hydrolat de *T. capitatus* sont présentés dans les photos A à D de la **figure 48**. Selon les résultats, l'hydrolat a montré une forte activité antifongique. Même à la fin du 45^{ème} jour, nous avons remarqué qu'il n'y avait pas des lésions chez les oranges traitées par rapport au témoin négatif.

Les résultats des tests ne montrent aucune incidence de la maladie (photos A et B) après 2 mois de stockage à une température ambiante (16-20°C), alors que pour les oranges non traitées, nous avons remarqué une forte incidence de la maladie (photos C et D).

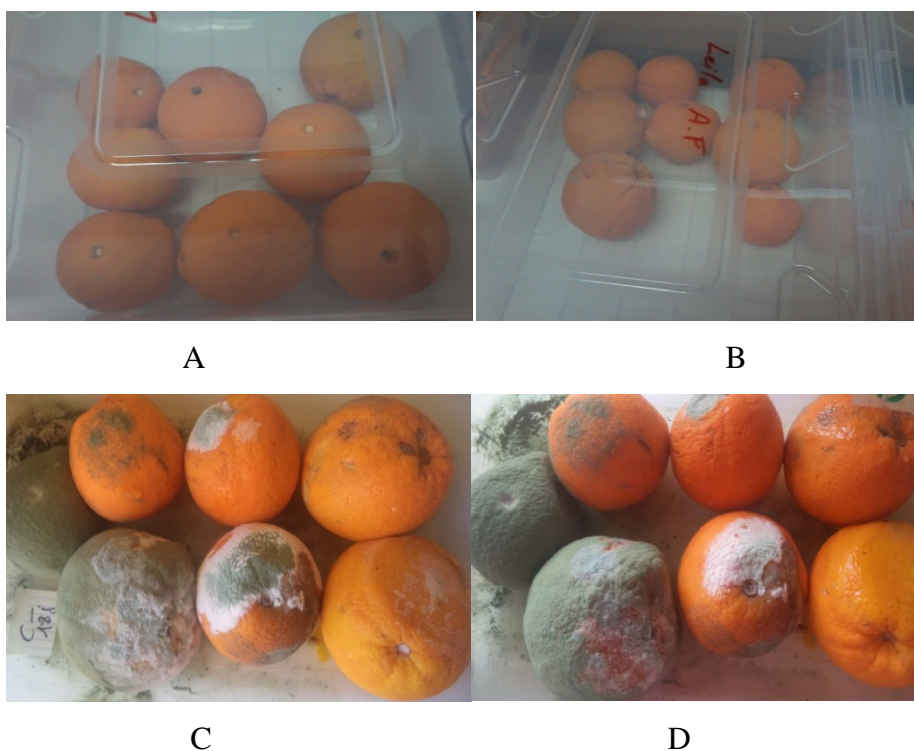


Figure 54 : Traitement des oranges non infectées par l'hydrolat sous une température de 16-20 °C

De faibles concentrations de l'hydrolat sont nécessaires pour la protection des oranges des infections par les champignons.

3-3- Activité antifongique in vivo de *T. articulata* contre le développement de *P. italicum*:

Selon l'augmentation de la concentration, la diminution de l'incidence de la maladie est notable. Les résultats obtenus prouvent que les diamètres des lésions sur les fruits, pour les trois concentrations

(0,2 et 0,4 et 0,6 µg/mL) de l'huile essentielle et de l'extrait de l'hydrolat ont montré une forte activité antifongique, même au bout de 15 jours d'entrepôt, il n'y avait pas de différence significative dans les diamètres des lésions par rapport au témoin négatif.

De faibles concentrations de l'hydrolat de *T. articulata* sont suffisantes pour la protection des oranges des infections par les champignons. Les photos suivantes montrent que les oranges traitées (à gauche) sont indemnes alors que les témoins (à droite) sont fortement infestés.

Tableau 22 : Moyennes des diamètres de détérioration (mm)

Traitements	Diamètre de détérioration (mm)				
	3 ^{ème} jour	6 ^{ème} jour	9 ^{ème} jour	12 ^{ème} jour	15 ^{ème} jour
Contrôle	1.1±0.2	2.8±0.3	5.7±0.5	8.1±0.8	13.2±0.2
H.E					
0.2 µg/mL	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	1.3±0.5
0.4 µg/mL	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.6±0.2
0.6 µg/mL	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.3±0.01
Hydrolat	0.0±0.0	0.0±0.0	0.25±0.1	0.75±0.3	1.25±0.2



Figure 55 : oranges traitées (à gauche) et témoin (à droite) après 15 jours d'entrepôt

4- Test du goût:

Nous avons fait goûter des oranges traitées par les hydrolats de *T.capitatus* et *T.articulata* et des oranges non traitées considérées comme témoins à plus de 30 collègues du laboratoire et nous les avons demandé de noter la qualité du goût et l'odeur du fruits.

Le tableau 23 montre les résultats de l'acceptabilité des échantillons des oranges.

Tableau 23: Effet des hydrolats des trois plantes étudiées sur l'acceptabilité sensorielle des oranges

Traitement	Hy. <i>T.capitatus</i>	Hy. <i>T.articulata</i>	Contrôle
Acceptabilité ^a	4.06	3.5	3.12

Les résultats sont exprimés comme la moyenne de toutes les qualités, 1= Extrêmement inapprécié, 2 = Inapprécié, 3 = indifférent, 4 = apprécié; 5 = extrêmement apprécié.

Les résultats montrent qu'il n'y a pas de différences significatives dans les propriétés sensorielles entre les échantillons traités avec les hydrolats et le contrôle (sans hydrolat), puisque les propriétés sensorielles des oranges traitées avec hydrolats sont jugées acceptables par les intervenants au niveau des suppléments. Cependant, l'hydrolat de *T.capitatus* semble donner le meilleur résultat puisque il est classé comme étant apprécié avec une moyenne de 4,06.

Des travaux sur l'acceptabilité de cet extrait en tant que conservateur des oranges seront nécessaires. D'autre part, l'influence des huiles essentielles et des hydrolats sur la saveur et l'arôme des agrumes n'ayant pas été étudiée, d'autres travaux doivent être menés pour prouver l'efficacité de l'utilisation de composants volatils dans des applications réelles en tant que fumigants (huile essentielle) ou par pulvérisation (solution d'hydrolat).

5-Activités antibactériennes des huiles essentielles et les extraits des trois plantes étudiées :

Des activités antibactériennes significatives vis-à-vis de la quasi-totalité des germes étudiés suivants : *Pantoea sp.*, *Xanthomonas sp.*, *Pseudomonas sp.*, *Borkholdrea sp.*, et *Bacillus sp.* ont été mises en évidence pour les huiles essentielles et les extraits des trois plantes étudiées : *Thymus capitatus*, *Tetraclinis articulata* (Thuya) et *Daucus crinitus* (**Tableau 24**).

Les résultats de l'activité antibactérienne de trois plantes sont résumés dans le tableau 24. Les diamètres des zones d'inhibition sont importants, ce qui explique une forte activité bactéricide des huiles essentielles vis-à-vis des germes étudiés.

Selon **Debillerbeck**, la répartition des espèces en trois classes : espèces sensibles, espèces modérément sensibles (ou de sensibilité intermédiaire) et espèces résistantes est établie suivant les diamètres des zones d'inhibition.

- Espèces sensibles : quand le diamètre de la zone d'inhibition est supérieur à 13mm ;
- Espèces intermédiaires : quand le diamètre de la zone d'inhibition est entre 6mm et 13 mm ;
- Espèces résistantes : quand le diamètre de la zone d'inhibition est inférieur à 6 mm.

Tableau 24 : Diamètres des zones d'inhibition (mm) :

Bactéries	<i>Pantoea1</i>	<i>Xanthomonas2</i>	<i>Pseudomonas4</i>	<i>Borkholdrea16</i>	<i>Bacillus17</i>
HE Thymus					
0.2µl/ml	77.29	23.33	17.00	37.52	76.26
CMI(µl/ml)	0.39	3.12	0.78	0.78	12.5
HE Thuya					
1.5 µl/ml	34	0	14	20	20
2.0 µl/ml	90	9	16.33	90	46.66
2.5 µl/ml	90	39	20	90	60
CMI(µl/ml)	31.25	250	62.5	1.95	125
HE Daucus feuilles					
0.4 µl/ml	90	23	12	90	90
CMI (µl/ml)	50	78	103	45	45
HE Daucus racines					
0.4 µl/ml	76	50	28	90	75
CMI(µl/ml)	62	51.9	74.5	48.2	62



Figure 56: Effet de H.E de *T. capitatus* contre *Xanthomonas* sp.



Figure 57: Effet de H.E de *T. capitatus* contre *Pseudomonas* sp.



Figure 58: Effet de H.E de *T. articulata* contre *Pantoea* sp.



Figure 59: Effet de H.E de *T. articulata* contre *Xanthomonas* sp.



Figure 60: Effet de H.E de *T. articulata* contre *Pseudomonas* sp.

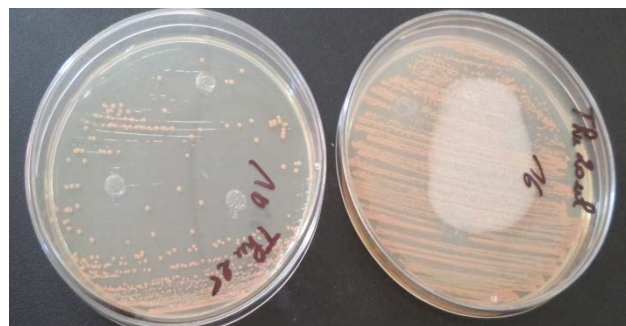


Figure 61: Effet de H.E de *T. articulata* contre *Borkholdrea* sp.



Figure 62: Effet de H.E de *T.articulata* contre *Bacillus* sp

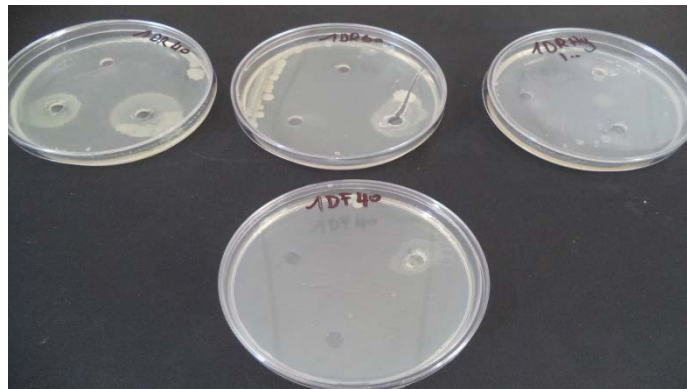


Figure 63: Effet de H.E de *D. crinitus* contre *Pantoae* sp.



Figure 64: Effet de H.E de *D. crinitus* contre *Xanthomonas* sp



.Figure 65: Effet de H.E de *D. crinitus* contre *Borkholdrea* sp.

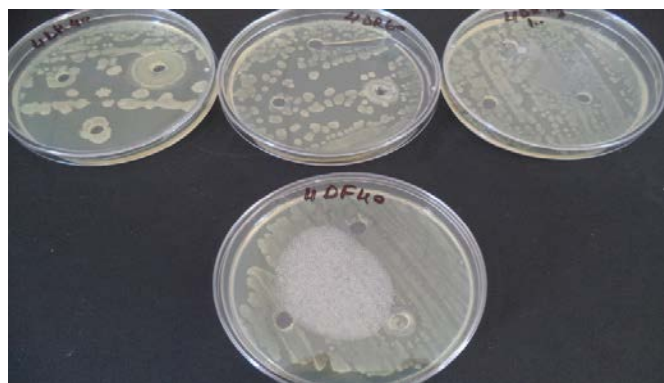


Figure 66: Effet de H.E de *D. crinitus* contre *Pseudomonas* sp.

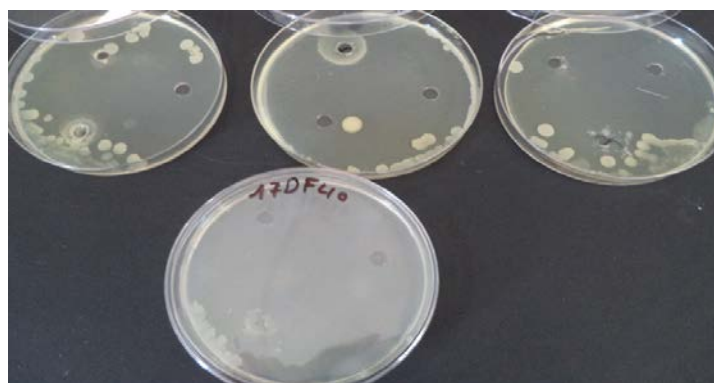


Figure 67: Effet de H.E de *D. crinitus* contre *Bacillus* sp.

6- Activités antioxydantes des huiles essentielles et les extraits des trois plantes étudiées :

Pour compléter les activités biologiques des trois plantes aromatiques étudiées, nous avons jugé intéressant de connaître leurs pouvoirs antioxydants.

En effet, les risques et les effets néfastes des antioxydants synthétiques utilisés comme additifs alimentaires ont été discutés au cours des dernières années et la nécessité de les substituer par des antioxydants naturels, issus de plantes médicinales, est évidente. Les plantes médicinales constituent une source inépuisable de substances ayant des activités biologiques et pharmacologiques très variées.

6-1-Propriétés antioxydantes de l'huile essentielle et des extraits du *T. Capitatus*:

La méthode de piégeage du radical libre DPPH est utilisée pour comparer l'activité antioxydante des extraits de *T. capitatus* avec l'acide ascorbique en tant que antioxydant de référence.

Une solution de DPPH fraîchement préparée affiche une couleur pourpre ($\lambda_{\max} = 517 \text{ nm}$) qui disparaît progressivement en présence d'un bon donneur d'hydrogène, c'est à dire, un puissant antioxydant. Le tableau 25 montre l'activité de balayage DPPH, exprimée en pourcentage, causée par différentes concentrations de l'huile essentielle et des extraits de solvants du *T. capitatus*.

La comparaison de l'activité de balayage DPPH de l'huile essentielle et des extraits de solvants avec ceux exprimés par l'acide ascorbique ont montré que tous les extraits examinés ont des effets antioxydants notables. La plus faible activité de piégeage des radicaux libres (82 et 78%) est obtenue par l'extrait d'hexane et d'huile essentielle à une concentration de 200 $\mu\text{g/ml}$, alors que l'activité la plus forte (88%) est obtenue par l'extrait éthanolique à une concentration de 80 $\mu\text{g/ml}$.

Comme le montre le tableau 23, l'activité antioxydante des extraits et de l'huile essentielle a également augmenté avec une augmentation de leurs concentrations.

A des concentrations plus élevées, l'activité antioxydante des extraits est plus proche de l'effet de piégeage de l'acide ascorbique. Par exemple, à 2,0 $\mu\text{g/ml}$, l'activité de piégeage de l'acide ascorbique est d'environ 86%, et l'extrait éthanolique à 80 $\mu\text{g/ml}$ présente une activité de piégeage de 88%. La même valeur est obtenue pour l'extrait hexanique et l'huile essentielle à une concentration de 200 $\mu\text{g/mL}$.

Tableau 25: Activité antiradicalaire des extraits de *T. capitatus* à différentes concentrations.

Activité antioxydante				
Huile essentielle du thym frais				
Concentration de l'extrait (µg/mL)	50	100	150	200
Effet du balayage sur DPPH (%)	39± 1.0	48 ± 3.1	63± 2.5	78± 4.1
DPPH IC₅₀ (µg/mL)	102 ± 1.01			
Ethanol				
Concentration de l'extrait (µg/mL)	20	40	60	80
Effet du balayage sur DPPH (%)	43 ± 3.1	56 ± 2.8	68± 4.5	88 ± 3.0
DPPH IC₅₀ (µg/mL)	31 ± 0.92			
Hexane				
Concentration de l'extrait (µg/mL)	80	100	150	200
Effet du balayage sur DPPH (%)	41 ± 3.2	55 ± 1.0	63 ± 2.6	82 ± 5.1
DPPH IC₅₀ (µg/mL)	99 ± 1.06			
Acide ascorbique				
Concentration de l'extrait (µg/mL)	0.4	0.5	1.0	2.0
Effet du balayage sur DPPH (%)	28 ± 0.7	38 ± 06	59 ± 1.1	86 ± 2.6
DPPH IC₅₀ (µg/mL)	0.95± 0.12			

La valeur est exprimée sous forme de moyenne ± écart type (n = 3)

L'activité DPPH est généralement présentée par la valeur IC₅₀ (Concentration de l'inhibiteur causant 50% d'inhibition) ; calculée pour chaque extrait, elle permet de les classer entre eux. Plus la IC₅₀ est petite, plus la molécule est antioxydante. Les résultats présentés dans le Tableau 23 révèlent que tous les extraits testés ainsi que l'acide ascorbique pris comme référence, sont des antiradicalaires.

L'extrait éthanolique de *T. capitatus* a l'activité de piégeage des radicaux la plus élevée avec la valeur de CI₅₀ la plus basse (31 µg/ml). Ce qui est plus élevé que l'extrait à l'hexane avec une valeur de la IC₅₀ de 99 µg/ml, et de l'huile essentielle avec une valeur de la IC₅₀ de 102 µg/ml.

Les plantes produisent divers composés phytochimiques qui sont utiles pour le développement de nouveaux médicaments.

Ces composés phytochimiques sont pour la plupart des métabolites secondaires constamment synthétisés par la plante à des fins défensives (Chew et al., 2009). Dans cette étude, nous avons

évalué l'activité antioxydante de différents extraits de solvant du *T. capitatus* par le procédé du radical 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl libres (DPPH).

Les résultats montrent que l'extrait d'éthanol par rapport à l'huile essentielle et extrait à l'hexane de *T. capitatus* est plus actif avec une CI_{50} de $31 \pm 0,92 \mu\text{g} / \text{ml}$, comparable avec l'acide ascorbique, un agent antioxydant synthétique ($0,95 \pm 0,12 \mu\text{g} / \text{ml}$).

6-2-Propriétés antioxydantes de l'huile essentielle et des extraits du *T. articulata*: Le radical libre DPPH permet l'estimation de l'activité antioxydante, l'intensité de la couleur jaune reflète la capacité antiradicalaire de l'extrait, et dépend de la nature, la concentration et la puissance de cet extrait. Les résultats sont exprimés en pourcentage de réduction de DPPH causée par différentes concentrations de l'huile essentielle et de l'extrait d'éthanol du thuya *T. articulata* (**Tableau 25**).

Tableau 25 : Activité antiradicalaire de *T. articulata* à différentes concentrations

Activité antioxydante				
Huile essentielle				
Concentration de l'extrait ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	150	300	700	1000
Effet du balayage sur DPPH (%)	48 ± 1.0	66 ± 3.1	80 ± 2.5	98 ± 4.1
DPPH IC_{50} ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	167 ± 0.04			
Ethanol				
Concentration de l'extrait ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	250	350	450	800
Effet du balayage sur DPPH (%)	49 ± 3.1	59 ± 2.8	60 ± 4.5	91 ± 3.0
DPPH IC_{50} ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	272 ± 0.52			
Acide ascorbique				
Concentration de l'extrait ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	0.4	0.5	1.0	2.0
Effet du balayage sur DPPH (%)	28 ± 0.7	38 ± 06	59 ± 1.1	86 ± 2.6
DPPH IC_{50} ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	0.95 ± 0.12			

La valeur est exprimée sous forme de moyenne \pm écart type (n = 3)

En analysant les résultats représentés dans le tableau 24, nous remarquons que l'huile essentielle et l'extrait éthanolique dérivés du *Tetraclinis articulata* réduisent la concentration du radical libre du DPPH avec un pourcentage de 98% et 91% respectivement, ils sont plus élevés que celui de l'antioxydant synthétique : l'acide ascorbique.

Ces résultats montrent que l'huile essentielle par rapport à l'extrait éthanolique de *T. articulata* est plus active avec une CI_{50} de $167 \pm 0,04 \mu\text{g} / \text{ml}$,

6-3-Propriétés antioxydantes de l'huile essentielle *D.crinitus* : Le tableau 26 montre que les essences de *Daucus crinitus*, que ce soit la partie aérienne ou la partie souterraine, ont montré un pouvoir antiradicalaire intéressant, l'effet du balayage sur la DPPH le plus faible est celui de l'huile essentielle des feuilles ($77\% \pm 3.0$) avec une IC_{50} de 597 ± 0.33 , tandis que l'huile essentielle des racines a montré une activité antiradicalaire plus importante avec $80\% \pm 3.2$ à une concentration de 4 mg/ml.

Tableau 26: Activité antiradicalaire de *D.crinitus* à différentes concentrations.

Activité antioxydante				
Huile essentielle des racines				
Concentration de l'extrait ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	1000	1500	2000	4000
Effet du balayage sur DPPH (%)	40 ± 3.0	57 ± 2.1	65 ± 0.5	80 ± 3.2
DPPH IC_{50} ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	1200 ± 0.03			
Huile essentielle partie aérienne				
Concentration de l'extrait ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	500	600	800	1000
Effet du balayage sur DPPH (%)	27 ± 3.1	58 ± 2.8	64 ± 4.5	77 ± 3.0
DPPH IC_{50} ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	597 ± 0.33			
Acide ascorbique				
Concentration de l'extrait ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	0.4	0.5	1.0	2.0
Effet du balayage sur DPPH (%)	28 ± 0.7	38 ± 0.6	59 ± 1.1	86 ± 2.6
DPPH IC_{50} ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	0.95 ± 0.12			

La valeur est exprimée sous forme de moyenne \pm écart type (n = 3)

B-Discussion:

1- Activité insecticide:

Les résultats obtenus lors des essais de l'activité insecticide des huiles essentielles de *Thymus capitatus* et de *Tetraclinis articulata* vis-à-vis des différents stades de *C. capitata* ont donné des résultats très encourageants puisqu'ils ont été très efficaces même à de très faibles

concentrations et par simple fumigation, nous pouvons donc les préconiser comme biocide contre ce ravageur notoire des fruits, en particulier des oranges *Citrus sinensis*.

Par contre, l'huile essentielle de *Daucus crinitus* n'a pas montré d'activité insecticide.

Des études similaires ont été faites par **Passino et al. (1999)** sur les effets toxiques des huiles essentielles de *Thymus capitatus* (Linnaeus), *Thymus herba-barona* et *Cinnamomum zeylanicum* (camomille) vis à vis les adultes de *C. capitata*. Ces derniers ont été nourris pendant trois jours avec des formulations contenant une concentration de 1% de chacun de ces trois huiles essentielles, elles ont provoqué plus de 90% de mortalité après 72 heures. Pendant l'étude, la mouche a montré un comportement anormal quelques heures après l'exposition (mauvaise coordination, des difficultés à voler), qui indique que les premières conséquences de l'ingestion même de petites quantités d'huiles essentielles produit un effet négatif sur le système nerveux (**Passino et al., 1999**). Ceci pourrait être expliqué par l'activité de l'aldéhyde cinnamique (environ 80% de *Cinnamomum*) et le carvacrol (68% de *Th. capitatus* et environ 45% de *Th. herba barona*).

Selon les résultats obtenus par **Benazzeddine et al. (2010)**, on constate que l'huile essentielle de l'eucalyptus est plus efficace sur *Tribolium confusum* avec un taux de mortalité de 97,47%, suivi par la menthe verte avec 96,19%, le thym avec un taux de 90,41%, puis le romarin avec 88,16% ; en dernière position la citronnelle avec 69,47% de mortalité.

Testés sur *Sitophilus oryzae*, le thym et la menthe verte ont provoqué 100% de mortalité, suivis par le romarin avec un taux de 97,37%, l'eucalyptus 72,63% et enfin la citronnelle avec 52,26% (**Benazzeddine et al. (2010)**).

Siskos et al. (2009) ont testé l'extrait de l'écorce de *Citrus aurantium* sur les adultes de deux espèces de la mouche des fruits *Ceratitis capitata* et *Bactrocera oleae* ; après 96 heures les valeurs des DL_{50} pour les mâles et les femelles de *B.oleae* sont respectivement de 44.8 et 40.1µg/insecte et pour le males et les femelle de *C. capitata* les DL_{50} sont respectivement de 38.8 et 67.8µg/insecte.

Les essais de toxicité par ingestion de l'huile de *Thuya occidentalis* ont montré que celle-ci est la plus toxique, avec une CL_{50} de 5371 ppm. À la dose la plus élevée (2,5% p/v). Les applications

topiques ont révélé que toutes les concentrations employées avaient une bonne activité insecticide à 24 h. À 0,1 ul /insecte de *C.capitata*.

Rosmarinus officinalis, *Lavendula angustifolia* et *T. occidentalis* ont causé des taux de mortalité supérieurs à 70%. Dans les essais de fumigation, les huiles essentielles de *L. angustifolia* et *R. officinalis* étaient les plus toxiques à 24 h, avec des CL₅₀ de 9,09 et 16,73 g / L d'air, respectivement (**Benelli et al., 2012**).

Les huiles essentielles des écorces d'agrumes sont considérés comme facteur de résistance le plus important des agrumes contre les mouches des fruits. Les huiles essentielles qui ont été obtenues à partir de trois variétés orange douce, orange amère et une variété de citron, ont montré une toxicité contre les imagos de la mouche méditerranéenne des fruits *C. capitata*. Les huiles essentielles d'oranges douces et amères étaient plus toxiques que les huiles essentielles de citron. La présence d' α -pinène et β -pinène semble amoindrir la toxicité des huiles essentielles de citron par rapport à d'autres huiles essentielles d'agrumes.

Il est important de comprendre la toxicité des huiles essentielles par rapport à leur composition et de leur rôle en ce qui concerne la résistance des agrumes pour *Ceratitis capitata* (**Papachristos et al., 2009**).

Bouchikhi et al., (2013) ont trouvé que *Thymus capitatus* présente une toxicité un peu variable avec DL₅₀ égale à 1,29 μ L, entraînant chez les femelles de la mite *Tineola bisselliella*, une réduction très significative de la ponte par rapport à celle des témoins.

L'activité biologique d'une huile essentielle est liée généralement à sa composition chimique. Ainsi, la forte activité de l'huile essentielle du thym vis-à-vis des adultes serait le fait des composés phénoliques tels que le carvacrol connu pour ses remarquables activités biologiques.

2-Activité antimicrobienne:

Dans cette étude, la réduction de la croissance des colonies du mycélium en présence de l'huile essentielle et de l'extrait de l'hydrolat de *T. capitatus* montre que ces produits testés contrôlent efficacement toutes les souches. Cette efficacité s'explique par la présence de molécules actives qui inhibent la croissance des champignons phytopathogènes. Les propriétés antifongiques de l'huile

essentielle et l'extrait de l'hydrolat de *T. capitatus* sont probablement associées à la grande quantité de terpènes phénoliques, en particulier à la composante principale : le carvacrol.

En effet, le carvacrol est utilisé en tant que désinfectant, fongicide, et dans des préparations cosmétiques, comme ingrédient de parfum. En ce qui concerne le mécanisme d'action; une fois que le composé phénolique a traversé la membrane cellulaire microbienne, les interactions avec les enzymes et les protéines membranaires provoqueraient un flux inverse de protons, ce qui affecte l'activité cellulaire (Davidson, 2001).

Selon Rasooli et Abyaneh (2004), les huiles de *Thymus eriocalyx* et *Thymus x-porlock* ont fortement inhibé *Aspergillus parasiticus* tandis que la production de l'aflatoxine a été significativement réduite par les deux huiles. Cependant, l'huile de *Thymus eriocalyx* a exercé une activité antifongique ainsi que des effets antitoxigéniques plus que celle de *Thymus x-porlock*. Les auteurs suggèrent que la présence de thymol dans les huiles peut être responsable, au moins en partie, des résultats obtenus. Les composés phénoliques tels que le thymol, le carvacrol et l'isoeugénol présentent l'activité antifongique la plus élevée. Ces résultats ont mis en évidence que, en plus du groupe fonctionnel, d'autres propriétés telles que de légères différences de structure peuvent affecter les propriétés physiques ou chimiques de ces composés, en modifiant leur bioactivité.

Dans la littérature, peu de travaux ont été réalisés sur les activités biologiques des huiles essentielles de *Tetraclinis articulata* (Vahl) Masters. Les quelques études effectuées ont montré que ces essences sont antibactériennes, antifongiques et cytotoxiques (Buhagiar et al., 1999 ; Bourkhiss et al., 2007 ; Bourkhiss et al., 2010).

Cette activité peut être réalisée par un composé majeur unique ou par l'effet synergique ou antagoniste de divers composés (Deba et al., 2008). Plusieurs auteurs ont attribué la capacité antifongique des huiles essentielles de cette plante à la présence de ses composants phénoliques et terpéniques (Beuchat, 1994; Nychas, 1995 ; Davidson, 1997) .

El Ouali Lalami et al. (2013) ont testé l'huile essentielle de *Thymus vulgaris* et de *Thymus satureioidis* sur les germes suivants *Salmonella sp.*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, ils témoignent d'une activité antibactérienne intéressante par rapport à la concentration utilisée (1,5µl) surtout contre la bactérie *Staphylococcus aureus*.

Boukhiss et al. (2007) ont choisi six souches microbiennes et pour leur pathogénicité et pour leur implication fréquente dans la contamination des denrées alimentaires : quatre souches bactériennes

(*Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* et *Micrococcus luteus*) et deux souches fongiques (*Penicillium parasiticus* et *Aspergillus niger*). Seuls *Staphylococcus aureus* et *Micrococcus luteus* sont inhibés à des concentrations élevées 1/250 et 1/100 (v/v) de l'huile essentielle du bois de *Tetraclinis articulata*

3-Activité antioxydante:

L'activité antiradicalaire du *Thymus capitatus* peut être due à des composés phénoliques. En fait, il a été prouvé que les molécules antioxydantes telles que les polyphénols, les flavonoïdes et les tanins sont capables de réduire et décolorer DPPH en raison de leur capacité de donneur d'hydrogène

(**Kruma et al., 2008**).

Des résultats similaires ont été trouvés dans la littérature, ils ont montré que les extraits méthanoliques des fleurs de *T. capitatus* sont capables de réduire le DPPH de couleur jaune avec une CI_{50} de 12 $\mu\text{g/mL}$, présentant une activité supérieure à celle de l'agent antioxydant synthétique, le butylhydroxytoluène (BHT) (25 $\mu\text{g/mL}$) (**Jabri-Karoui et al., 2012**).

Boukhriss et al. (2010) ont prouvé que les huiles essentielles du tronc et des feuilles du thuya présentent des activités importantes par comparaison à celle de l'antioxydant BHT. L'huile des rameaux reste la moins active. Les pourcentages d'inhibition sont pour les trois huiles essentielles respectivement de 95,8% ; 89,3% ; 84,6% et 50,3% pour le BHT.

Selon **Djouahri (2013)** les deux fractions, volatile et extrait présentent une activité antioxydante intéressante. Chez *T. articulata*, les flavonoïdes sont les agents antioxydants de premier ordre comme en témoigne la corrélation ($R^2 = 0.97$) entre ces deux paramètres (**Rachad et al., 2013**)

Les résultats de **Zerouki et al. (2007)** montrent un fort pouvoir réducteur de l'extrait méthanolique comparé à un antioxydant de synthèse BHT. L'extrait méthanolique obtenu par soxhlet montre un fort potentiel antioxydant avec IC_{50} ($28.55 \pm 0.83 \text{ mg/ml}$), supérieur à celui des α -tocophérol ($33.49 \pm 1.94 \text{ mg/ml}$) et acide ascorbique ($31.48 \pm 1.37 \text{ mg/ml}$) (**Djouahri et Boudarene, 2012**).

Plusieurs auteurs ont rapporté qu'il existe une relation étroite entre les composés phénoliques et les activités antioxydantes (**Wang et al., 1998 ; Ruberto et Baratta, 2000 ; Albayrak, 2010 ; Ozkan et al., 2010**).

Bendiabdellah et al., (2012) ont montré que les plus faibles activités radicalaires (60.26 et 53.12%) sont obtenues par les huiles essentielles des racines et de la partie aérienne de *Daucus*

crinitus à une concentration de 24 et 36 mg/ml respectivement, tandis que les plus fortes activités (69.82 et 62.89%) sont obtenues par l'extrait méthanolique à une concentration de 0.1 et 0.7 mg/ml respectivement. D'autre part les extraits aqueux des racines et de la partie aérienne présentent une activité radicalaire moyenne (77.51 et 80.56%) à une concentration de 1.4 mg/ml).

D'après **Keddar (2014)**, l'extrait méthanolique de la partie aérienne et des racines présente l'activité anti-radicalaire la plus élevée, avec des IC50 de 0.068 et 0.492 respectivement, suivi par l'extrait aqueux (IC50 : 0.644 pour la partie aérienne et 0.710 pour les racines) et en dernier l'huile essentielle (19.71 et 34.02 respectivement pour les racines et la partie aérienne).

Les antioxydants sont largement utilisés comme additifs alimentaires pour fournir une protection contre la dégradation par oxydation des aliments. En outre, de nombreux composants antioxydants synthétiques ont des effets toxiques et/ou mutagènes. D'autre part, la décomposition des aliments par détérioration due aux moisissures entraîne une perte économique considérable et constitue un risque pour la santé des consommateurs en raison du potentiel des champignons pour la production de mycotoxines. L'utilisation aveugle des antifongiques de synthèse a conduit à l'apparition de souches résistantes, ce qui a nécessité l'utilisation de concentrations plus élevées, avec l'augmentation consécutive de résidus toxiques dans les produits alimentaires.

Conclusion:

Après avoir testé les huiles essentielles les extraits et les hydrolats des plantes que nous avons étudié à savoir: *Thymus capitatus*, *Tetraclinis articulata* et *Daucus crinitus* qui sont disponible dans notre région tout le long de l'année. Nous avons remarqué que ces produits sont efficaces vis à vis la mouche méditerranéenne des fruits *Ceratitis capitata* et la microflore qui l'accompagne que ce soit avant ou poste récolte, donc nous nous permettons de préconiser l'utilisation des extraits brutes et la phase huileuse ainsi que la phase aqueuse comme alternatives naturelles aux produits phytosanitaires.

Les majeurs problèmes de l'entreposage frigorifique des agrumes sont la détérioration à cause des moisissures, et les fruits passent par plusieurs étapes avant d'être commercialiser par des tries et des lavages, donc nous proposons que cette dernière ce ferait avec des hydrolats de plantes qui fournissent aux fruits une protection contre les champignons.

nos produits peuvent être utilisés dans le domaine d'agroalimentaire comme conservateurs d'origine botanique puisque les résultats montrent un grand pouvoir antioxydant.

Conclusion

CONCLUSION GENERALE

Dans la région méditerranéenne, *Ceratitis capitata* ou la cératite qui est appelée aussi la mouche méditerranéenne des fruits est le ravageur le plus redoutable, en raison des conditions qui lui sont favorables dans une grande partie de cette aire dont le climat et la diversité des cultures. Sa grande polyphagie et sa plasticité écologique lui permettent également d'y exprimer au mieux son potentiel biotique, d'exploiter d'une manière optimale son milieu en développant plusieurs générations par an et en s'attaquant à un grand nombre d'espèces fruitières dont la production s'étale sur toute l'année.

Notre étude est essentiellement basée sur les variations des principaux facteurs liés à l'infestation des oranges *Citrus sinensis* de la variété sanguine par *Ceratitis capitata* dans la région d'El Fhoul (Tlemcen). En effet, l'étude des infestations en fonction des trous de ponte (piques) et des fruits chutés a montré un impact significatif des facteurs « date d'observation », « orientation » et « arbre échantillonné » sur les attaques de ce phytophage.

Les taux d'infestation varient significativement d'une orientation à une autre. Une infestation plus importante est notée vers les orientations sud et ouest de l'arbre.

En ce qui concerne les variations temporelles, les taux d'infestation fluctuent de façon significative. Nous remarquons une augmentation des attaques durant les premières dates d'observation suivie d'une diminution progressive jusqu'à la fin des prélèvements.

En parallèle, l'effet nuisible des moisissures commence à se faire sentir dès l'arrêt des attaques de la mouche, à cause des trous de ponte qui favorisent leur installation et des conditions favorables à leur développement, aussi bien climatiques que physiques ; donc 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 pu identifier onze genres de moisissures : *Aspergillus niger*, *Aspergillus fumigatus*; *Aspergillus oryzae* ; *Aspergillus flavus*; *Alternaria sp*; *Fusarium solani*; *Trichoderma sp* ; *Penicillium sp1*; *Penicillium sp2* ; *Cladosporium sp* et *Rhizopus Sp*. Nous constatons une dominance du genre *Aspergillus* avec un pourcentage de 5.04% sur les fruits sains et 26.95% sur les fruits infectés, suivi par le genre *Penicillium* avec un pourcentage de 7.1% sur les oranges saines et 21.42% sur les oranges infectées. *Cladosporium sp*. est aussi présent avec un pourcentage de 17.95%. Les autres genres de champignons provoquent des pourritures mais avec de faibles pourcentages.

CONCLUSION GENERALE

La flore bactérienne présente dans nos prélèvements est très diversifiée, nous avons isolé dix-sept aspects différents mais nous n'avons pu identifier que les cinq genres suivants : *Pantoea sp.*; *Xanthomonas sp.*; *Bacillus sp.*; *Pseudomonas sp.*; *burkholderia sp.*; et *Rhodotorula sp.* Pour lesquels nous remarquons la dominance des bactéries Gram positif surtout du genre *Bacillus* avec un pourcentage de 28.98% pour les fruits sains et 23.52% pour les fruits attaqués par la cératite, nous signalons la présence des bactéries Gram négatif avec de faibles pourcentages.

La lutte contre ces nuisibles est rendue difficile du fait de la présence de plusieurs espèces hôtes avec des périodes de maturation variables et échelonnées dans le temps. Le recours à des traitements utilisant des produits nocifs à la faune utile est de nature à engendrer le déclenchement d'opérations de lutte contre d'autres ravageurs d'importance secondaire. L'augmentation de la fréquence des interventions et les concentrations croissantes des matières actives ne favorisent pas la protection de l'environnement et nuisent à la santé humaine.

Pour cela, la recherche de traitements naturels et des solutions alternatives en utilisant des produits d'origine biologique pour lutter contre les ravageurs et les microorganismes nuisibles est devenue indispensable.

L'Algérie de par son climat méditerranéen et la nature de ses sols, possède une flore particulièrement riche en plantes aromatiques et médicinales, c'est pourquoi nous nous sommes intéressés à étudier certaines plantes, poussant dans la région de Tlemcen. Cette partie du travail a pour objet l'extraction, l'analyse chimique et l'activité biologique des huiles essentielles, des hydrolats et des extraits de solvants (Hexane, Chloroforme, Ethanol, Ether de pétrole et Eau).

Les plantes utilisées dans cette étude ont des rendements en huiles essentielles très différents, nous remarquons une grande différence pour *Thymus capitatus* où le séchage de la matière a une influence directe sur le rendement puisque 500g de thym frais donne 1.15g d'huile essentielle alors que la même masse donne 16g d'huile essentielle lorsqu'elle est séchée. L'analyse de cette dernière montre la dominance des composés oxygénés (87,1%) avec une quantité élevée de composants aromatiques terpéniques (82,6%). Toutefois, les monoterpènes hydrocarbonés sont apparus aussi en proportion appréciable (10.7 %). En effet, les principaux constituants de l'huile essentielle sont le carvacrol (69,6%), le p-cymène (12,4%), suivis par le γ -terpinène (4,3%), le myrcène (2,1%), α -terpinène (1,7%), le linalol (1,7%) et le terpinène-4-ol (1,1%).

La composition chimique de l'extrait de l'hydrolat est dominée par le carvacrol (95,1%) et de très faible quantité de monoterpènes.

CONCLUSION GENERALE

Les parties concernées par l'extraction de *Tetraclinis articulata* sont les feuilles, les tiges et les cônes fructifères qui ont donné un rendement en fraction volatile de 0.23. Un total de 54 éléments représentant 95,9% de l'huile totale de *T. articulata* sont identifiés. Les huiles essentielles sont fortement dominées par les monoterpènes hydrocarbonés (63,8%), suivis par les sesquiterpènes oxygénés (14,7%) et les sesquiterpènes hydrocarbonés (10,5%). Toutefois, les monoterpènes oxygénés sont apparus en faible proportion (6,4%).

Daucus crinitus a donné un rendement de 0.45 pour la partie aérienne et 0.37 pour la partie souterraine. Les principaux composants de son huile essentielle sont les phénylpropanoïdes, principalement l'isobutyrateisochavicol (44,9%); les autres composants majeurs identifiés sont: isochavicol 2 méthylbutyrate (9,7%), pentadécane (5,1%) et undécane (4,1%).

Afin de trouver de nouveaux produits bioactifs naturels, les activités antimicrobiennes des composants des huiles essentielles et des extraits ont été étudiées. Les effets inhibiteurs de l'huile essentielle et de l'extrait d'hydrolat de *Thymus capitatus* sont évalués sur sept champignons pathogènes des agrumes: *A. Niger*, *A. Oryzae*, *P. italicum* et *F. solani*, *Alternaria sp.*, *Cladosporium sp.*, et *Aspergillus flavus*. Les résultats obtenus pour l'activité antifongique de l'huile essentielle et de l'extrait d'hydrolat par la technique de croissance radiale indiquent que l'inhibition de la croissance du mycélium de chaque espèce est fortement influencée par les concentrations très faibles des deux extraits. Tous les extraits de cette plante ont montré une activité importante contre les moisissures testées ainsi que les bactéries isolées et identifiées.

Nos résultats montrent que l'huile essentielle de *T. articulata* est efficace contre le développement des sept moisissures *Penicilium sp.*, *A. niger*, *Alternaria sp.*, *Cladosporium sp.*, *Fusarium sp.*, *A.oryzae*, *A. flavus* avec le pourcentage de réduction du mycélium de 62.22%, 55.55%, 68.75%, 75.71%, 67.77%, 76% et 55.55% respectivement. Les extraits de *Tetraclinis articulata* ont montré une action importante vis-à-vis les champignons phytopathogènes de *Citrus sinensis*. Notamment *Cladosporium sp.* qui est totalement inhibé par une concentration de 1 mg/ml de l'extrait de chloroforme alors que *A. niger* montre une résistance avec un pourcentage d'inhibition de 2.43%.

Les huiles essentielles des différentes parties de *Daucus crinitus* exercent une activité antifongique significative, pour seulement 1µl/ml d'essence de la partie aérienne *Cladosporium sp* est inhibé avec un pourcentage supérieur à 71%.

Avec le même pourcentage d'inhibition *A. oryzae* montre une sensibilité avec une concentration un peu plus élevée de 3.5µl/ml.

CONCLUSION GENERALE

Les extraits de *D. crinitus* ont inhibé les moisissures par excellence, sauf pour *A. oryzae* qui a été très sensible par rapport à l'extrait de chloroforme de la partie aérienne, alors que l'extrait aqueux n'a aucune activité vis-à-vis cette moisissure.

Des activités antibactériennes significatives vis-à-vis de la presque totalité des germes étudiés suivants : *Pantoea sp.*, *Xanthomonas sp.*, *Pseudomonas sp.*, *Borkholdrea sp.*, et *Bacillus sp.* sont mis en évidence pour les huiles essentielles et les extraits des trois plantes étudiées : *Thymus capitatus*, *Tetraclinis articulata* et *Daucus crinitus*.

Selon les résultats de l'activité in vivo, l'hydrolat a montré une forte activité antifongique. Même à la fin du 15ème jour, il existe une différence significative pour les diamètres des lésions chez les oranges traitées par rapport au témoin. De faibles concentrations de l'hydrolat sont nécessaires pour la protection des oranges infectées par les champignons.

Les résultats de l'activité antioxydante des différentes fractions de la matière végétale permettent de suggérer l'utilisation des huiles essentielles dans différents domaines : agroalimentaire, cosmétique et pharmaco-médical pour remplacer les antioxydants synthétiques. D'autres études doivent être conduites pour évaluer in vivo l'innocuité et l'efficacité de ces essences.

Les résultats de nos travaux nous encouragent à poursuivre nos recherches sur les pathogènes de l'oranger dans notre région, d'autant plus que c'est le premier travail du genre à tester les phases aqueuses ou hydrolats dans la lutte contre les moisissures qui attaquent *Citrus sinensis*.

Références
Bibliographiques

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- **Achhal A., Barrero M., Ech-Chamikh S., (1985),** *Productivité du thuya (Tetraclinis articulata (Vahl) Masters) dans le bassin versant du N'fis dans Ecologia Mediterraea*, Tome XI, Fascicule 2/3.
- **Adebayo T.A. et Gbolade A.A.,(1994).** Protection of stored cowpea from *Callosobruchus maculatus* using plant product. *Insect. Sci. Applic(ed)*; 15 (2); pp: 185-189.
- **Ahmed I.A., Ahmed, A.K. et Robinson, R.K. (1997).** Susceptibility of date fruits (*Phoenix dactylifera*) to Aflatoxine production. *Journal. Sci. Food. Agric. n° 74*, pp 64-68.
- **Akintobi AO, Okonko IO, Agunbiade SO, Akano OR, Onianwa O.,(2011)** Isolation And Identification Of Fungi Associated With The Spoilage Of Some Selected Fruits In Ibadan, South Western Nigeria. *Academia Arena*,;3(11):1-10] (ISSN 1553-992X).
- **Albayrak S., Aksoy A., Sagdic O., And Hamzaoglu E., (2010),** Compositions, antioxidant and antimicrobial activities of *Helichrysum* (Asteraceae) species collected from Turkey, *Food Chem.*, **119**, 114 – 122.
- **Amarti F., Satrani B., Aafi A., Ghanmi M., Farah A., Aberchane M., El Ajjouri M., El Antry S., Chaouch A., 2008.** Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oils of Moroccan *Thymus capitatus* and *Thymus bleicherianus*. *Phytothérapie* 6, 342-347.
- **Anderson, B. M., and D. W. L. Ma. (2009).** Are all n-3 polyunsaturated fatty acids created equal? *Lipids. In Health and Disease* 8:8–33.
- **Anonyme (2000).** Alteration des agrumes. En ligne <http://www.univ-brest.fr / esmisab /sites sc /Myco alteration –fruits – légumes/ ALTAGR.H.T.M>.
- **Anonyme 2008.** Catalogue Huiles & Sens Aromathérapie 17-18 pp.204p.
- **Anonyme. (1998).** Les agrumes. Bureau des Ressources Génétiques, plate-forme espèces tropicales et méditerranéennes
- **Anonyme. (2001).** Citrinae classification. EGID-Citrus Network. Janvier 2001. 39p.
- **Aubert B.,Vullin G. ;(1997)** Les Pépinières et plantation d'agrumes. Centre international de coopération international en recherche agronomique pour le développement.158p.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- **Aviana A., Edadi R., Tahmasebi G., 2002.** Laboratory evaluation of some plants essentielles of control *Varroa destructor* experimental and applied. *Acarology*, 27, pp: 319-327.
- **Avis, T. J. (2007).** Antifungal compounds that target fungal membrane: Application in plant disease control. *Can. J. Plant Pathol.* 29:323–329.
- **Bagard S. 2008,** Physique-Chimie 1e S: Tout-en-un, Ed. Bréal, , pp. 128
- **Balachowsky A.S. ; Mesnil L., (1935):** Les insectes nuisibles aux plantes cultivées. Ed. Busson, tome 1, Paris, pp : 242 – 253.
- **Baldi I.; Mohammed-Brahim B.; Brochard P.; Dartigues J. F.; Salamon R. (1998).** Effets retardés des pesticides sur la santé : état des connaissances épidémiologiques *Revue d'épidémiologie et de santé publique* ISSN 0398-7620 vol. 46, n°2, pp. 134-142
- **Barkley, N.A., Roose, M.L., Krueger, R.R., & Federici, C.T. (2006).** Assessing genetic diversity and population structure in a citrus germplasm collection utilizing simple sequence repeat markers (SSRs). *Theor. Appl. Genet.*,
- **Barnett H.L.; B.B. Hunter (1972).** Illustrated genera of imperfect fungi. Burgess Publishing company. Minnesota (USA): 3ème édition.
- **Barrero A.F., Quilez del Moral J.F., Lucas R., Paya M., Akssira M., Akaad S. et Mellouki F., (2003).** Diterpenoides from *Tetraclinis articulata* that inhibit various human leucocyte functions. *J.Nat.Prod.*, 66:844-850
- **Bartosz G., (2003).** Generation of reactive oxygen species in biological systems. *Comments on*
- **Baser K.H.C., Kirimer N., Tumen G. & Duman H., (1998).** Composition of the essential oils of *Thymus canaoviridis* Jalas. *J. Essent. Oil Res.*, **10**, 199-200.
- **Baser K.H.C., Ozek T. & Tumen G., (1992).** Essential oils of *Thymus cariensis* and *Thymus haussknechtii*, two endemic species in Turkey. *J. Essent. Oil Res.*, **4**, 659- 661.
- **Belkhadar J., Claisse R., Fleurentin J. et Yaunos C., (1991),** *Repertory of standard herbal drugs in the Moroccan pharmacopoeia*, *Journal of Ethnopharmacology.* **35**, 123-143.
- **Bellakhadar J., (1997),** *La pharmacopée marocaine traditionnelle.* Impressions DUMAS, Saint-Etienne.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- **Benazzeddine S. (2010).** Activité insecticide de cinq huiles essentielles vis-à-vis de *Sitophilus oryzae* (Coleoptera ; Curculionidae) et *Tribolium confusum* (Coleoptera; Tenebrionidae) Ingénieur d'état en sciences agronomiques .
- **Benelli G., Flamini G., Canale A., Luigi Cioni P., Cont B.:(2012).** Toxicity of some essential oil formulations against the Mediterranean fruit fly *Ceratitis capitata* (Wiedemann) (Diptera Tephritidae).
- **Bendiabdellah .A, Dib M.A., Meliani N., Djabou N., Allali H. , Tabti B.:(2012).** Preliminary phytochemical screening and antioxidant activities of solvent extracts from *Daucus crinitus*.
- **Ben Jemia M., Chaabane S., Senatore F., Bruno M., Kchouk M.E.:(2013).** Studies on the antioxidant activity of the essential oil and extract of Tunisian *Tetraclinis articulata* (Vahl) Mast. (Cupressaceae). Nat. Prod. Res. 27, 1419-1430.
- **Benhassena A.:(2009).** Induction de la réaction de défense chez les plantes pour lutter contre les maladies Ing. Institut national agronomique de Tunisie.
- **Benjilali B., Hammouni M. & Richard H., (1987)b.** Chemical polymorphism of Moroccan thyme essential oils: compounds characterization. *Sci. Aliments*, **7**, 77-91.
- **Benjilali B., Hammouni M., M'Hamedi A. & Richard H., (1987)a.** Essential oil composition of different Moroccan thyme varieties: principal component analysis. *Sci. Aliments*, **7**, 275-299.
- **Benzie I. F., Strain J.(1996).** The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of antioxidant power: The FRAP assay. *Analytical Biochemistry*, **239**, 70-76.
- **Berghe, V. A. et Viletinck, A. J. (1991).** Screening Methods for antibacterial and antiviral agents from higher plants. *Method for Plant Biochemistry* **6**: 47-68.
- **Bestaoui K. (2001)** Contribution à une étude syntaxonomique et écologique des matorrals de la région de Tlemcen. The. Mag. Univ. Tlemcen. 174p.
- **Bezzi M.(1928)** Diptera Brachycera and Athericera of the Fiji Island, based on material in the british Museum (Natural History). Brit. Mus. Oxford Univ. Press, London ,220p
- **Biche m., (2012).** Les Principaux Insectes Ravageurs des Agrumes en Algérie et leurs Ennemis Naturels.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- **Blois M.S. (1958).** Antioxidant determinations by the use of stable free radical. *Nature*, 181,
- **Bodenheimer F.S., (1951):** Citrus entomology. Ed. Dio. Junk. Denhang. 663p.
- **Boisson C. ; Renard J.L., (1987).** Les maladies cryptogamiques des plantes maraichères en cote d'Ivoire. *Horticole*, 398 : 36-40.
- **boland G.J., He J., et Zhout (2009).** Concurrent selection for microbial suppression of *Fusarium graminearum*, *Fusarium head blight* and deoxynivalenol in wheat. *Journal of applied microbiology*, 2009, vol. 106, n° 6, p.1805-1817.
- **Boller, E.F., (1985).** *Rhagoletis cerasi* and *Ceratitis capitata*. *Handbook of Insect Rearing* 2,135-144.
- **Botineau M. 2010,** Botanique systematique et applliquée des plantes à fleurs, Tec & Doc, paris 1335 pp.
- **Bouchet P.; Guignards J.L.; pouchus Y.F.; Villards J.(2005).**Les champignons: mycologie fondamentale et appliquée 110p.
- **Bouchikhi-Tani Z., Khelil M. A.et Bendahou M..(2013).** Activité biologique des huiles essentielles extraites de trois plantes aromatiques sur la mite *Tineola bisselliella* (lepidoptera, tineidae) *Bulletin de la Société Zoologique de France* 138 (1-4).
- **Bouddine L., Louaste B., Achahbar S., Chai N., Chamri F., Remmal A.;2012.**Comparative study of the antifungal activity of some essential oils and their major phenolic components against *Aspergillusniger* using three different methods. *Afr J Biotechnol*, 11, 14083-14087.
- **Boudy P.(1952).** *Guide forestier en Afrique du Nord*, La maison rustiqu Éd., Paris, 273.
- **Boudy, P. (1950).** Économie forestière Nord africaine: II, Fasc1: monographie des essences.
- **Boulon J.-P., (2010).** Qu'est-ce que ? *Pseudomonas chlororaphis* souche MA342 bio-fongicide en traitement de semences de blé, triticales et seigle. *Phytoma Défense Végétaux*, 632, 10-12.
- **Bounatirou S., Smiti S., Miguel M.G., Faleiro L., Rejeb M.N., Neffati M., (2007):** Chemical composition, antioxidant and antibacterial activities of the essential oils isolated from Tunisian *Thymus capitatus* Hoff. et Link. *Food Chem.* 105, 146-155.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- **Bourkhiss B., Ouhssine M., Hnach M., Bourkhiss M., Satrani B. Et Farah A, (2007).** Composition chimique et bioactivité de l'huile essentielle des rameaux de *Tetraclinis articulata*, Bull. Soc. Pharm. Bordeaux, **146**, 75 – 84.
- **Bourkhiss M., Hnach M., Bourkhiss B., Ouhssine M. Et Chaouch A. (2007),** Composition chimique et propriétés antimicrobiennes de l'huile essentielle extraite des feuilles de *Tetraclinis articulata* (Vahl) du Maroc, *Afrique Science* **3**, 232 – 242.
- **Bourkhiss M., Hnach M., Lakhlifi T., Bourkhiss B., Ouhssine M. Et Satrani B., (2010),** Production et caractérisation de l'huile essentielle de la sciure de bois de *Tetraclinis articulata* (Vahl) Masters, Bul. Soc. Roy. des Sciences de Liège, **79**, 2010, 4 – 11.
- **Bourkhiss M., Hnach M., Paolini J., Costa J., Farah A. , Satrani B.(2010).** Propriétés antioxydantes et anti-Inflammatoires des huiles essentielles des différentes parties de *Tetraclinis Articulata* (Vahl) Masters du Maroc.
- **Brands S. J., 1989-(2005).** Systema naturae 2000, Amesterdam, The Netherlands.
- **Brand-Williams W., Cuvelier M.E., Berset C.,(1995).** Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensmittel–Wissenschauf und Technologie*, **28**, 25-30
- **Brunings AM, Gabriel DW.,(2003).** *Xanthomonas citri*: breaking de surface. *Molecular Plant Pathology.*;4:141-157.
- **Bssaibis F., Gmira N. et Meziane M., (2009).** Activité antibactérienne de *Dittrichia viscoa* (L.) W.Greuter. *Rev. Microbiol. Ind. San et Environn*, **3**(1), 44-45.
- **Buhagiar J.A., Podesta M.T., Wilson, A.P., Micallef M.J., And Ali S. (1999).** The induction of apoptosis in human melanoma, breast and ovarian cancer cell lines using an essential oil extract from the conifer *Tetraclinis articulate*, *Anticancer Res.*, **19**, 5435 – 5443.
- **Buyckx E.J., (1994):** Bioclimatic effects on the distribution of the Mediterranean fruit fly (Diptera: Tephritidae) in the Maghreb. *Fruit flies and the Sterile Insect Technique*, Calkins, Klassen and Liedo Ed., CRC Press, Inc.
- **Caccioni D.R.L. & Guizardi M., (1994).** Inhibition of germination of fruit and postharvest pathogenic fungi by essential oil components. *J. Essent. Oil Res.*, **6**, 173-p.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- **Caldwell b., Brown Rosen E., Sideman E., Shilton A., Smart C.,(2005)** Resource Guide for organiq insect and disease management .octobre 2005.
- **Camagref, (2011).** Pesticides, agriculture et environnement *Matière à débattre et décider*, ISSN 2115-1229 Editions Quae, 2011, 134p.
- **Carey J.R., (1984):** Host specify demographic studies of the Mediterranean fruit fly *Ceratitis capitata* Wied. Ecol. Entomol. Vol 9. pp: 161-270.
- **Caron J. ;(2002)** Le pouvoir antagoniste de *Trichoderma* Conférence présentée lors des journées horticoles régionales à St-Rémi le 5 décembre 2002.
- **Cayol J.P. Causse R. (1993)** .Mediterranean fruit fly *Ceratitis capitata* back in Southern france. Journal of Applied Entomology, 116 : pp 94-100.
- **Chew YL, Goh JK, Lim YY.,(2009).** Assessment of in vitro antioxidant capacity and polyphenolic composition of selected medicinalherbs from Leguminosae family in Peninsular Malaysia. *FoodChem.*;**116**(1):13–8.
- **Chikhouné A., Hazzit M., Kerbouche L., Baaliouamer A., Aissat K., (2013):** *Tetraclinis articulata* (Vahl) Masters essential oils: chemical composition and biological Activities. J. Essent. Oil Res. <http://dx.doi.org/10.1080/10412905.2013.77462>.
- **Christenson L.D. ; Foote R.D., (1960):** Biologie des mouches a fruits. Rev. Ann. Entomol, pp : 171- 491.
- **Christien V., Navarro L. Bové J.M. (2002).** IVIA,Moncada, Valencia, Espagne.INRA et université Victor Segalen Bordeaux 2,BP.81,33883 Villenave d’Ornon, France.
- **Cimanga K. et al., (2002).** Correlation between chemical composition and antibacterial activity of essential oils of some aromatic medicinal plants growing in the Democratic Republic of Congo. *J. Ethnopharmacology*, **79**, 213-220.
- **Cole G. ; Kendrick B.(1981).**Biology of conidial fungi. Volume I, Acadimic press, london,pp.487,660.
- **Cosentino & Palmas F., (1999).** In vitro antimicrobial activity and chemical composition of Sardinian *Thymus* essential oils. *Letters in Applied Microbiology*, 29, pp: 130-135.
- **Courboulex, Lorrain(1998)** Les agrumes,Ed.Rustica,collection découvrir et réussir,
- **Cowan M.M., (1999).** Plant products as antimicrobial agents. *Clin. Microbiol. Rev.*, **12**, 564-582.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- **CUQ J.L., (2007).** Microbiologie alimentaire maladie microbienne liée à la consommation des aliments. Sciences et Technologies des Industries Alimentaires 3p.
- **Daget Ph., (1980)** Un élément actuel de la caractérisation du monde méditerranéen, le climat. colloque de la fondation L. Emberger sur la mise en place. Evolution et la caractérisation de la flore et de la végétation du Circum. Montpellier, 9-10/04. (1980) 101-120pp.
- **Dagnélie P., (1970).**Théorie et méthode statistiques. Vol.2.Les presses agronomiques de gembloux, A.S.B.L. *Daucus crinitus* Desf., from Algeria.
- **Davidson P.M., (1997):** Chemical preservatives and natural antimicrobial compounds. In: Doyle, M.P., Beuchat, L.R., Montville, T.J. (ed.), Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers, 520-556. American Society for Microbiology, Washington DC.
- **Deba, F., Xuan, T.D., Yasuda, M., Tawata, S., (2008):** Chemical composition and antioxidant, antibacterial and antifungal activities of the essential oils from *Bidens pilosa* Linn. Var. Radiata. Food Control 19, 346-352.
- **De Billerbeck V.G.(2007).** Huiles essentielles et bacteries resistantes aux ATB. Phytotherapie 5 :249-25.
- **De Gaulejac Saint-Cricq, Provost N., Vivas N.,(1999).** Comparative study of polyphenol scavenging activities assessed by different methods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* , 47, 425-431.
- **Debouzie D., Denis B., Rospard J.P., (1987).** Sampling and spatial distribution.C.R, Acad. agric.Fr., pp73-82.
- **De Caterina, R. (2011).** n-3 Fatty acids in cardiovascular disease. *N. Engl. J. Med.*364:2439–2450.
- **Deguine J.P., Ferron P., Russel D., (2008).** Protection des cultures. De l'agrochimie à l'agroécologie. Editions Quae.
- **Delassus M., Bricchet J., Balachowsky A. et Lepigne A., (1931):** Les ennemis des cultures fruitieres en Algerie et les moyens pratiques de les combattre. Ed. Recher. Agro. Algerie. pp : 53 – 62.
- **Delrio G., (1985):** Tephritid pests in citriculture. CEC/Proc. Experts meting. Acireal;
- **De-Rocca-Sierra, & Ollitrault, P. (1992).** Les ressources génétiques chez les agrumes. Le courrier de l'environnement de l'INRA, 3.DIMARTINO. pp: 135-149.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- **Djouahri A., (2013).** Étude phytochimique du *Tetraclinis* algérien et valorisation des activités biologiques des extraits. Thèse doctorat 615.19, 186 p.
- **Dragland S., Senoo H., Wake K., Blomhoff R., (2003).** Several culinary and medicinal herbs are important sources of dietary antioxidants. *The journal of nutrition*, 133, pp: 1286-1289.
- **Drochey E. ;Vieu M. (1957)** (biology of *Candida* infection.I.) laboratory diagnosis ; study of 342 strains of *Candida* isolated from pathological specimens).*Sem Hop* ;33(13/2) 793p.
- **Duraffourd C., D’Hervicourt L. et Lapraz J. C.,(1990).** Cahiers de phytothérapie clinique. Examen de laboratoire galénique, Eléments Thérapeutiques Synergiques. 2èmeEdition, Masson (Paris) 87 p.
- **Duyck P.F.et Quilici S.(2002).** Survival and development of different life stages of three *Ceratitis* spp. (Diptera: Tephritidae) reared at five constant temperatures.
- **Dyck V.A., Hendrichs J. and Robinson A.S., (2005).** Sterilizing insects with ionizing radiation. *Stérile Insect Technique, principales and practice in Area-wide integrated pest*
- **Elaini R., (2003):** Contribution au développement des techniques de lutte contre la mouche méditerranéenne des fruits *Ceratitis capitata* Wiedemann (Diptera, Tephritidae) en verger d'agrumes et en post-recolte. These. Ing. en Agronomie, I.A.V. HASSAN II. pp : 4 - 17.

- **El Ouali Lalami A., El-Akhal F., Ouedrhiri W., Ouazzani Chahdi F., Guemmouh R., Greche H.,(2013).** Composition chimique et activité antibactérienne des huiles essentielles de deux plantes aromatiques du centre nord marocain : *Thymus vulagris* et *Thymus satureioidis*.
- **El-Shaik (1986)** cité in **Mastouri A. (1997).** Comportement d'un stock de dattes variété « *Deglet-Nour* » traité par thermisation et au DF en atmosphères modifiées et au froid. Thèse d'ing. Univ. de Mostaganem, 55 p.
- **EPPO/CABI,(1997).** Protocole de diagnostic pour les organismes réglementés. Organisation Européenne et Méditerranéenne de la protection des plantes. Bulletin 33,271-280pp.
- **European Pharmacopoeia, (2004):** 5th Ed., Council of Europe, 217-218.Strasbourg Cedex, France.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- **Fabri RL., Nogueira MS., Braga FG.,Coimbra ES.,(2009).** Mitracarpus frigidus aerial parts exhibited potent antimicrobial, antileishmanial, and antioxydant effects, *Bioresour Technol.*, 100 :428-433.
- **Fellah H., (1996).** Contribution à l'étude de la bioécologie de la mouche méditerranéenne des fruits ceratitis capitata Weidemann (Diptera :Tephritidae) sur fruits d'été. Mémoire de fin du cycle de spécialisation de L'INAT.
- **Feron M., (1962) :** L'instinct de reproduction chez la mouche méditerranéenne des fruits *Ceratitidis capitata* Wied. Comportement sexuel, comportement de ponte. Rev.
- **Field, S.A., Kaspi, R., Yuval, B., (2002).** Why do calling medflies (Diptera :Tephritidae) cluster Assessing the empirical evidence for models of medfly lek evolution. Florida Entomologist 85,63-72
- **Filippi J.B., (2003) :** Une architecture logicielle pour la multi-modelisation.
- **Fralish J.S.,(2002).**Taxonomy and ecology of Woody Plants in North AmericaForests:(Excluding Mexico and Subtropical Florida). John Wiley & Sons, ed., New York fruits *Ceratitidis capitata* Wied. Comportement sexuel, comportement de ponte. Rev.
- **Gaouar N ; Debouzie D., (1991).** Olive fruit fly,*Dacus oleae*Gmel.(Dipt.Tephritidae) damage in Tlemcen region,Algeria.J.Appl.Ent.,112,288-297.
- **Gaouar N. (1996).** Rapport de la biologie des populations de la mouche d'olive *Bactrocera oleae* (Gml) à l'optimisation de son contrôle dans la région de Tlemcen. These.Doc.Etat, inst.Boil ., Univ. Tlemcen.119p.
- **Gaouar N. Debouzie, D. (1995).** Within tree vertical pattern in *Bactrocera Oleae* (Gmel.) (Diptera : Tephritidae) infestation and optimisation of insecticide application.J.Appl .Ent.,pp 119,262-289.
- **Gilani AH, Shaheen E, Saeed SA, Bibi S, Irfanullah SM, Faizi S. (2000).** Hypotensive action of coumarin glycosides from *Daucus carota*. Phytomedicine 7,423–426.
- **Guillen M.D. & Manzanos M.J., (1998).** Study of composition of different parts of a Spanish *Thymus vulgaris* L. *Plant Food Chem.*, **3**, 373-383.H. Serge & N. Dominique (Eds.), (pp. 13-36): CIRAD.
- **Gumus T., Demirci A.S., Sagdic O., Arici M., (2010).** Inhibition of heat resistant molds: *Aspergillus fumigatus* and *Paecilomyces variotii* by some plant essential oils. Food Sci. Biotechnol. 19, 1241-1244.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- **Haddad A., Lachenal D., Marechal A., Kaid-Harche M. et Janin G., (2006),** Caractéristiques papetières de la pâte de bois de thuya de Berberie (Algérie) (*Tetraclinis articulata* Vahl) obtenue par un procédé soude-anthraquinone, *For. Sci.*, **63**, 493 – 498.
- **Hassani F.,(2003).** Etude comparative de l'infestation de trois variétés d'agrumes par la mouche méditerranéenne *Ceratitis capitata* (wied) (Diptera: Tephritidae) dans la région de Tlemcen. these magister 67/02.
- **Hoquelliet A. ;Toorawa P. ;Bove J.M. ; Garnier M.,(1999).** Detection and identification of the tow Candidatus liberobacter sp. Associated with citrus huanglongbing by PCR amplification of ribosomal protein genes of the beta operon. *Molec. Cellular Probes*, **13**, 373-379.
- **Hua Li, Xiaoyu Wang, Peihong Li, Yong Li, Hua Wang.(2008).** Comparative Study of Antioxidant Activity of Grape (*Vitis vinifera*) Seed Powder Assessed by Different Methods. *Journal of Food and Drug Analysis* **2008**, *16* (6), 67-73.
- **Huang D., Ou B., Prior R. L. (2005).** The chemistry behind antioxidant capacity assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **53**, 1841-1856.
- **Isabelle Savini, (2014).**« AGRICULTURE - Agriculture biologique », *Encyclopædia Universalis* [en ligne], consulté le 11 septembre 2014. URL <http://www.universalis.fr/encyclopedie/agriculture-agriculture-biologique/>
- **Jabri-Karoui I, Bettaieb I, Msaada K, Hammami M, Marzouk B.,(2012).** Research on the phenolic compounds and antioxidant activities of Tunisian *Thymus capitatus*. *J Funct Food.*;**4**(3):661–9.
- **Karousou R., Koureas D.N., Kokkini S., (2005).** Essential oil composition is related to the natural habitats: *Coridothymus capitatus* and *Satureja thymbra* in NATURA 2000 sites of Crete. *Phytochem.* **66**, 2668-2673.
- **Keddar M.,(2014)** .Compositions chimiques, activités antibactériennes, antioxydantes des huiles essentielles de quelques *Daucus*. **37 ;45pp.**
- **Kerboua M. (2010).** L'agrumiculture en Algérie. In: D'Onghia A.M.(ed.), Djelouah K. (ed.), Roistacher C.N. (ed.). Proceedings of the Mediterranean research network on certification of citrus (MNCC): 1998-2001. Bari : CIHEAM, 2002 . p. 21 -26 (Options Méditerranéennes : Série B. Etudes et Recherches; n .43).
- **Kerboua M.(2010)** Agrumiculture en Algérie Institut Technique de l'arboriculture fruitière et de la vigne(ITAF) Tessala El Merdja.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- **Kiendrebeogo M., Ouedraogo A.P. et Nacoulma O.G., (2006).** Activités insecticides de *Striga hermonthica* (Del.) (Scrophulariaceae) sur *Callosobruchus maculatus* (Fab.)(Coleoptera: Bruchidae). *Biotechnol. Agron. Soc. Environ*; 10 (1); pp: 17–23.
- **Khimoud D.,Louni A.;(2008)** Estimation de l'infestation des différentes variétés d'agrumes par *Ceratitis capitata* Wied.,1824 (Diptera ; Trypetidae) en fonction de l'exposition dans différents vergers de la région de Tizi-Ouzou.Thè.Ing.Univ. Tizi-Ouzou.4p.
- **Koçlu T. (2010)** la lutte régionale contre les mouches des fruits en Afrique subsaharienne p.3
- **Kruma Z, Andjelkovic M, Verhe R, Kreicbergs V, Karklina D, VenskutonisPR., (2008).** Phenolic compounds in basil, oregano and thyme. *Proceedings of the 3rd Baltic Conference on Food Science and Technology. FOODBALT-2008.*; Jelgava, Latvia. Latvia University of Agriculture, Faculty of Food Technology: p. 99–103.
- **Kumarasamy Y, Nahar L, Byres M, Delazar A, Sarker S D. (2005).** The assessment of biological activities associated with the major constituents of the methanol extract of 'wild carrot' (*Daucus carota*L.) seeds. *Journal of Herbal Pharmacotherapy* 5, 61–72.
- **Lamarck M.et Poiret JLM.** Encyclopédie méthodique botanique, Tome II *Agasse*,Parie,1811.
- **Lamy M. (1997)** Les insectes et les hommes. Ed. Albin Michel, Paris, 96p.
- **Lanfranchi D.A., Laouer H., El Kolli M., Prado S., Maulaybailly C., Baldovini N., (2010).** Bioactive phenylpropanoids from *Daucus crinitus* Desf. from Algeria. *J. Agric. Food Chem.* 58, 2174- 2179.
- **Larpent J.P.,(1990)** . Moisissures Utiles et Nuisibles Importance Industrielle. 2^{eme} édition Masson Paris.512pp.
- **Le Floch E., (1983).** Contribution à une étude ethnobotanique de la flore tunisienne. Editions Ministère de l'enseignement supérieur et de la recherche scientifique.
- **Lebdi Grissa K.,(2010)** Etude de base sur les cultures d'agrumes et de tomates en tunisie.Regional Integrated Pest Management Programme in the Near East GTFS /REM /070 /ITA.
- **Lepoivre p. ;(2003)** Phytopathologie : Base moléculaires et biologiques des pathosystemes et fondements des strategies de lutte. Ed De Boeck Supérieur.311-312pp.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- **Liquido N.J., Cunningham R.T., (1990).** Host plants of the mediterranean fruit fly on the Island of Hawaii (1949-1985 survey). *J. Econ. Entomol.* 83: 1863-1878.
- **López S.B., López M.L., Aragón L.M., Tereschuk M.L., Slanis A.C., Feresin G.E., Zygadlo J., Tapia J.A.(2011).** Composition and Anti-insect Activity of Essential Oils from *Tagetes* L. Species (Asteraceae, Helenieae) on *Ceratitis capitata* Wiedemann and *Triatoma infestans* Klug
- **Loussert R.,(1989)** Les agrumes, techniques agricole méditerranéennes Volume I Technique et Documentation Edt. Scient 113p.
- **Loussert R.,(1989)** Les agrumes, techniques agricole méditerranéennes Volume I Technique et Documentation Edt. Scient 113p.
- **Loziene K., Vauciunine J. & Venskutonis P., (1998).** Chemical composition of the essential oil of creeping thyme (*Thymus serpyllum* L.) growing wild in Lithuania. *Planta Medica*, **64**, 772-773.
- **Luro, F., Rist, D., & Ollitrault, P., (2001).** Evaluation of genetic relationships in citrus
- **Maddison P.A., Bartlett B.Y., (1989).** A contribution towards the zoogeograph of management. pp: 250...253, 431.
- **Manner H.I., R.S.,Easton Smith V. Elevitch C.R., (2005).** Citrus species (Citrus), ver.1. in: C.R Elevitch (Ed). Species Profiles for Pacific Island Agroforestry. Permanent Agriculture Resources (PAR), Holualoa, Hawaii, 31p.
- **Manzanero Majil, V. ,(2004).** Citrus Tristeza virus (CTV): its development in Belize. *caraphin New*, no.24,June 2004,1-4.
- **Marc Fr., Davin A., Deglene-Benbrahim L., Ferrand C. et all., (2004).** Methodes d'évaluation du potentiel antioxydant dans les aliments. *Erudit, M/S : médecine sciences*, 20(4), 458-463.
- **Matallah S., (1970).** Contribution à la valorisation de la datte algérienne. Thèse Ing. I.N.A. eL-Harrach, 78 p.
- **Mavrikakis, P.G., Economopoulos, A.P., Carey, J.R., (2000).** Continuous winter reproduction and growth of the Mediterranean fruit fly (Diptera Tephritidae) in Heraklion, Crete, southern Greece. *Environmental Entomology* 29,1180-1187.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- **Mhiri W., (2003).** Maladies cryptogamiques des graminées à gaeon et biologie des *Fusarium* spp et *Rhizoctonia* spp. Mémoire de diplôme d'études approfondies en protection des plantes et environnement de l'Ecole Supérieure d'horticulture et d'Elevage Chott Mariem, Sousse, tunisie : 107p.
- **Miceli A., Negro C., Tomma si L., (2006).** Essential oil variability in *Thymbra capitata* (L.) Cav. growing wild in Southern Apulia (Italy). *Biochem. Syst. Ecol.* 34, 528-535.
- **Molyneux P., (2004).** The use of stable free radical diphenylpicrilhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakarinn J. Sci. Technol.*, 26 (2), 211-219.
- **Molyneux, P., (2004).** The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakarinn J. Sci. Technol.*, 26(2) : 211-219.
- **Moreau C., (1974).** Moisissures toxiques dans l'alimentation. 2^{ème} ed. 471p., Masson et Cie, paris. N°26, pp: 291-298.
- **Muller-Riebau F., BERGER B., YEGEN O., (1995).** Chemical composition and fungitoxic properties to phytopathogenic fungi of essential oils of selected aromatic plants growing wild in Turkey. *J Agric Food Chem*, 43, 2262-2266.
- **Nanjo F, Goto K, Seto R, Suzuki M, Sakai M, Hara Y., (1996).** Scavenging effects of tea catechins and their derivatives on 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical. *Free Radic Biol Md.*, 21(6), 895- 902
- **Nicolle C., (2004).** Lyophilized carrot ingestion lowers lipemia and beneficially affects cholesterol metabolism in cholesterol-fed C57BL/6J mice. *European Journal of Nutrition* 43, 237–245
- **Nychas, G.J.E., (1995):** Natural antimicrobials from plants. In: Gould, G.W, New methods of food preservation, 58-89. Glasgow, Blackie Academic and Professional, London.
- **Nunez B.L., (1987):** La mosca del mediterreo. CA: Informa (Enera. Febrero-maio), pp: 9 – 17.
- **Ollitrault, P., & Luro, F., (1997).** L'amélioration des plantes tropicales. In A. Charrier, J. Michel,

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- **Olsen M., Matheron M., Meclure M et Xiong Z., (2000).**Diseases of citrus in Arizona, cooperative extension. College of agriculture and Life Sciences. The university of Arizona 13p
- **OMM : l'Organisation Météorologique Mondiale.**
- **Ozkan, G., Sagdic O., Gokturk S., Unal O., And Albayrak S., (2010),** Study on Chemical composition and biological activities of essential oil and extract from *Salvia pisidic*. LWT, Food Sci. Technol., **43**, 186 – 190.
- **Pabitra Kalita; Bora, L. C.; Bhagabati, K. N.(1997).** Phylloplane microflora of citrus and their role in management of citrus canker. Journal Indian Phytopathology 1996 Vol. 49 No. 3 pp. 234-237 ISSN 0367-973X Record Number 19971001583.
- **Papachristos D.P., Kimbaris A.C., Papadopoulos N.T. et Polissiou M.G. (2009),** Toxicity of citrus essential oils against *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae) larvae. Annals of Applied Biology, 155: 381–389. doi: 10.1111/j.1744-7348.2009.00350.x
- **Papageorgio V., (1980).** GLC-MS computer analysis of the essential oil of *Thymus capitatus*. *Planta Medica Suppl.*, 29-33.
- **Papaj D.R & Messing R.H. ,(1996)** .Functional shifts in the use of parasitized hosts by a tephritid fly : the role of host quality. Behavioural Ecology, 7 : 235-242.
- **Passino G.S., Bazzoni E., Moretti M.D.L., Prota R., (1999).** Effects of essential oil formulations on *Ceratitis capitata* Wied. (Dipt., Tephritidae) adult flies. Journal of Applied Entomology-Zeitschrift Fur Angewandte Entomologie 123, 145-149.
- **Paster N. et al., (1990).** Inhibitory effect of oregano and thyme essential oils on molds and foodborne bacteria. *Lett. Appl. Microbiol.*, **11**, 33-37. Pathol veget. Entomol. Agri. Fr. 41, pp : 1 – 129.
- **Péguy,C.P.,(1970)** Précis de climatologie.Ed.Masson et Cie,France: 468p.
- **Pellecuer J., Jacob M., Simeon de Buechberg M. & Allegrini J., (1980).** Therapeutic value of the cultivated mountain savory (*Satureia Montana* L.). *Acta Hortic.*, **96**, 35-39.
- **Pérez-García A., Romero D. & de Vicente A., (2011).** Plant protection and growth stimulation by microorganisms: biotechnological applications of *Bacilli* in agriculture. *Curr. Opin. Biotechnol.*, **22**(2), 187-193.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- **Ponce A. G., Fritz R., del Valle C., et Roura S. I., (2003).** Antibacterial activity of essential oils on the native microflora of organic Swiss chard. *Society of Food Science and Technology (Elsevier)*, 36, 679-684.
- **Praloran, (1971).** Les agrumes, techniques agricoles et productions tropicales. Ed. Maisonneuve et Larox, Paris, T. XXI et XXII, 665p.
- **Quezel P., Et Santa S., (1963).** Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales, Tome II, *Ed. CNRS*, Paris.
- **Quilici S., (2003).** Ravageurs des agrumes de la méditerranée CIRAD-FLHOR, Pole de protection des plantes (3p), 7 chemin de l'IRAT, 97410, Saint-Pierre, La Réunion, France
- **Quilici S. et al., (2002).** Ravageurs des agrumes de la méditerranée CIRAD-FLHOR, Pole de protection des plantes (3p), 7 chemin de l'IRAT, 97410, Saint-Pierre, La Réunion, France
- **Rachad W., Benamar H., Bennaceur M., Marouf A., (2013).** Évaluation du potentiel antioxydant de plantes médicinales et analyse phytochimique. *Seminaire International Protection et Preservation des Ecosystemes Sahariens ECOSYS09 Ouargla* .
- **Re R., Pellegrini N., Proteggente A., Pannala A., Yang M., et Rice- Evans C.,(1999).** Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*, 26, 1231-1237.
- **Ricardo da Silva J.M., Darmon N., Fernandez Y., Mitjavila S.,(1991).** Oxygen free radical scavenger capacity in aqueous models of different procyanidins from grape seeds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 39, 549-1552.
- **Rice-Evans C.A., Miller N.J., Bolwell P.G., Bramley P.M., Pridham J.B., (1995).** The relative antioxidant activities of plant-derived polyphenolic flavonoids. *Free Radical Research*, 22, 375-383.
- **Ronald F.L. ; Jayma L., (1992):** Mediterranean Fruit Fly, *Ceratitis capitata* (Wiedemann). Department of Entomology. Honolulu, Hawaii. 5p.
- **Ruberto G. et Baratta M.T., (2000),** Antioxidant activity of selected essential oil components in two lipid model systems, *Food Chem.*, 69, 167 – 174.
- **Ruberto G., Biondi D., Ciana P., And Geraci T., (1993).** Antimicrobial activity and chemical composition of essential oils from Sicilian aromatic plants. *Flavour and Fragrance J.*, 8, pp: 331-337.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- **Ruberto G., Biondi D., Piatelli M., (2000).** The essential oil of Sicilian *Thymus capitatus* (L.) Hoffmanns. et Link. *J. Essent Oil Res.* 4, 417- 418.
- **Sáenz Laín C. ,(1981).** Research on *Daucus* L. (Umbelliferae), *Anales Jard. Bot. Madrid*, **37**, 494.
- **Saez F., (1998).** Variability in essential oils from populations of *Thymus hyemalis* Lange in southeastern Spain. *J. Herbs Spices Med. Plants*, **5**, 65-76.
- **Salah N., Miller N.J., Paganga G., Tijburg L., Bolwell, G.P., Rice-Evans C.A.,(1995).** Polyphenolic flavanols as scavengers of aqueous phase radicals and as chain-breaking antioxidants. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 339-346.
- **Sanna G.P., Bazzord E., Moretti M.D.L et Prota R., (1999).** Effects of essential oil formulations on *Ceratitis capitata* Wied adult flies. *JAE(ed)*; n°: 123; pp: 145-149.
- **Sanchez-Moreno C., Larrauri J.A., et Saura-calixto F.,(1998).** A procedure to measure the antiradical efficiency of polyphenols. *Journal Science Technology International*. 8, 121-137.
- **Sanchez-Moreno C., Larrauri Jose A ., Saura-Calixto F.,(1998).** A Procedure to Measure the Antiradical Efficiency of Polyphenols. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 76(2), 270-276.
- **Sanchez-Moreno C.,(2002).** Review: methods used to evaluate the free radical scavenging activity in foods and biological systems. *Food Science and Technology International*, 8 (3), 121-137.
- **Scherer R., Godoy HT.,(2009).** Antioxydant activity index (AAI) by the 2,2 diphenyl-1-picrylhydrazyl method. *Food Chem.*,112 : 654-658.
- **Scora, R. W., (1988).** Biochemistry, taxonomy and evolution of modern cultivated citrus. Paper presented at the VIth International Citrus Congress.
- **Segretain-E G., Drouhet E. et Maria F., (1979)** Diagnostic de laboratoire en mycologie médicale, Edition Maloine,3ème edition.
- **Selka O., (2007).** Etude des infestations des fruits de *Citrus sinensis* var. *Sanguinelli* par *Ceratitidis Capitata* et par la microflore pathogène dans la plaine d'Hennaya. Thèse de Magistère Université Abou Bekr Belkaid. Tlemcen.
- **Sharma Om P., Bhat T.K., (2009),** DPPH antioxidant assay revisited. *Food chemistry*, 113 (4),

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- **Simone V. E.,(1999).** La culture fruitière sous les tropiques. ISBN 9072746-41-4NUGI 835.
- **Siskos E.P.,Konstatopoulou M.A., Mazomenos B.E.;(2009).** Insecticidal activity of Citrus aurantium peel extract against *Bactrocera oleae* and *Ceratitis capitata* adults (Diptera: Tephritidae).
- **Somou E. ,(1987).** Arbres, arbustes et arbrisseaux en Algérie. INRA. Ed. OPU, pp.67-68.
- **Spiegel-Roy, P., Goldschmidt, E. E. (Eds.), (1996).** Biology of citrus.
- **Stone B.C. (1985).** Rutaceae. In : M.D. Dassanyake and F.R. Fosberg (eds.). A. Revised Handbook of the Flora of ceylon, Volume V. Smithsonian Institution and the National Science Fondation, Washingto,, D.C.
- **Swarup S., Feyter, R., Brlansky, R.H. Gabriel, D.W., (1991).** A pathogenicity locus from *xanthomonas citri* enables strains from several pathovars of *X. campestris* to elicit cankerlike lesion on citrus. *Phytopathology*, 81 : pp802-809.
- **Swingle W.T.,(1948).** Citrus industry. Chap.IV (The botany of citrus and its wild relatives of the orange subfamily). Univ. California. Press, Berkeley and Los Angeles.
- **Swingle,W. T., & Reece, P. C., (1967).** The botany of citrus and its wild relatives . In W. Reuther, L. D. Batchelor & H. J. Webber (Eds.). *The Citrus Industry* (Vol. 1, pp.130-190): University of California Berkeley.
- **Tabart J., Kevers C., Pincemail J., Defraigne J., et Dommes J.,(2009).** Comparative antioxidant capacities of phenolic compounds measured by various tests. *Food Chemistry* , 113, 1226-1233. *Toxicology*, 9, 5-21.
- **Tawaha K.A., Hudaib M.M., (2012).** Chemical composition of the essential oil from flowers, flower buds and leaves of *Thymus capitatus* Hoffmanns. & Link from Jordan. *J. Essent Oil Bear Pl.* 15, 988-996.
- **Thomas M.C., Happner J.B., Woodruff R.E., Weems H.V., Steck G.J. & Fasulo T.R.,(2001).** Mediterranean fruit fly, *Ceratitis capitata* (Wiedemann) (Insecta :Diptera : Tephritiae). Florida Department of agriculture and Consumer Services, Division of Plant Industry ; and T.R. Fasulo, Entomology and Nematology Department, university of Florida, Gainesville, FL.
- **Toumi B.F., Benyahia M., Hamel L., Mohamedi H., Boudaghen L., (2011).** Étude comparative de la composition chimique des huiles essentielles de *Tetraclinis articulata* (Vahl) Masters originaire d'Algérie. *Acta Bot Gallica* 158, 93-100.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- **Tucher DPH., Wheaton T.A ; Muraro R.P., (1994).** Citrus Tree Pruning Principales and practices. Fact Sheet HS-144. Horticultural Sciences Department, Florida Cooperative extension Service, Institute of Food and Agricultural Sciences, University of Florida, Gainesville.
- **Tumen G., Baser K.H.C., Demirci B. & Ermin N., (1998).** The essential oils of *Satureja coerulea* Janka and *Thymus aznavourii* Velen. *Flavour Fragrance J.*, **13**(1), 65-67.
- **Vernière C., Navaro L. Bové JM., (2003).** Statut actuel des pathogènes des agrumes dans le Bassin méditerranéen. CIRAD-FLHOR, TA 50/PS4, 34398 Montpellier cedex 5, France. A volume 12: August 2005- January 2006.
- **Vila R. et al., (1995).** Composition and study of the variability of the essential oil of *Thymus funkii* Cosson. *Flavour Fragrance J.*, **10**, 379-383.
- **Villeneuve C., Poivron, (2007):** Piéger les pyrales à la ferme, Ministère de l'Agriculture, des Pêcheries et de l'Alimentation du Québec (MAPAQ). CSA de Saint Rémi, 2007, page 4.
- **Walter A. Sam C., (2002).** Fruits of Oceania. (Trans., P.Ferrari from fruits d'Océanie.) ACIAR Monograph 85. Australian Centre for international Agricultural research, Canberra, Australia.
- **Wang, M., Li J., Rangarajan M., Shao Y., La Voie E.J., Huang T.C., et Ho C.T., (1998),** Antioxidative phenolic compounds from sage (*Salvia officinalis*), *J. Agric. Food Chem.*, **46**, 4869 – 4873.
- **Weems H., (1981):** Mediterranean fruit *Ceratitis capitata* Wied. (Diptera: Trypetidae). *Pep. agric. Cumer, Dir. Plant. Industry. Entomol. Circ. Florida* (230) ,12p
- **Welington L. A., Walter M. Jr., Carlos I Aguilar-Vildoso, Paulo A.V. B., Halha O Saridakis, João Lúcio Azevedo, (2001).** Variability and interactions between endophytic bacteria and fungi isolated from leaf tissues of citrus rootstocks
- **White I.M. ; Elson-Haris M.M., (1992):** Fruit Flies of Economic Significance: their identification and bionomics. C.A.B. ACIAR. pp : 12-601.
- **Whiteside, JO (1975),** 'Biological characteristics of *Elsinoe fawcettii* pertaining to the epidemiology of sour orange scab', *Phytopathology* 65: 1170-1177

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- **Williamson J.G. ; L.K. Jackson., (1994)** (revised). Citrus Propagation. Fact Sheet HS-86. horticultural Sciences Department, Florida Cooperative Extension Service, Institute of Food and Agricultural Sciences, University of Florida.
- **Wilson K.,(1994)**. Evolution of clutch size in insects. II. A test of static optimality models using the beetle *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera : Bruchidae). *Journal of Evolutionary Biology*, 7: (Coleoptera : Bruchidae). *Journal of Evolutionary Biology*, 7 : 365-386.
- **Yilmaz, Y., Toledo, R.T, (2004)**. Major flavonoids in grape seeds: antioxidant capacity of catechin, epicatechin and gallic acid. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 52, 255-260.
- **Yi-Zhong Cai, Mei Sun, Jie Xing, Qiong Luo, Harold Corke, (2006)**. Structure-radical scavenging activity relationships of phenolic compounds from traditional Chinese medicinal plants. *Life Sciences*, 78(25), 2872-2888.
- **Zambonelli A, d'Aulerio AZ, Bianchi A, Albasini A. (1996)**. Effects of Essential Oils on Phytopathogenic Fungi In Vitro*. *J Phytopatol.*;144(9-10):491–4.
- **Zerouki N., Marouf A., Derdour A. (2007)**. Activité antioxydante de l'extrait méthanolique du *Tetraclinis articulata* (Vahl) Master. *PhytoChem & BioSub Journal* Vol. 1 N° 1, 2007.
- **Ziyyat A., Legssyer A., Mekhfi H., Dassouli A., Serhrouchni M., and Benjelloun W. (1997)**, *Phytotherapy of hypertension and diabetes in oriental Morocco*, *J. Ethnopharmacol.*, 58, 45-54.
- **Zucoloto F. S., (1993)**: Acceptability of different Brazilian fruits to *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae) and fly performance on each species. *Brazilian J. M Biol. Res.*

Annexes

¹Laboratoire d'Ecologie et Gestion des Ecosystèmes Naturels, Faculté des Sciences de la nature et de la vie,
et des sciences de la terre et l'univers

²Laboratoire des Substances Naturelles et Bioactives (LASNABIO) Département de Chimie,
Faculté des Sciences, Université de Tlemcen, Algérie

³Université de Corse, UMR CNRS 6134, Laboratoire Chimie des Produits Naturels, Campus Grimaldi, Corte, France

Control of fungal pathogens of *Citrus sinensis* L. by essential oil and hydrosol of *Thymus capitatus* L.

Leila Tabti¹, Mohammed El Amine Dib^{2*}, Nassim Djabou², Nassira Gaouar Benyelles¹,
Julien Paolini³, Jean Costa³, Alain Muselli³

(Received September 11, 2014)

Summary

Essential oil, hydrosol extract and hydrosol of *Thymus capitatus* L. from Algeria were tested for antifungal activity against four phytopathogenic fungi (*Aspergillus niger*, *Aspergillus oryza*, *Penicillium italicum* and *Fusarium solani*) causing the deterioration of *Citrus sinensis* fruits. Essential oil and hydrosol extract showed strong *in vitro* antifungal activity based on the inhibition zone and minimal inhibitory concentration values against the pathogens. *Citrus sinensis* fruits infected by *Penicillium italicum* were treated *in vivo* with essential oil, hydrosol extract and hydrosol. 0.2 µg/mL of *Thymus* hydrosol was needed for the absence of orange infection and causing 100 % mycelial growth inhibition. This activity can be correlated with chemical composition of extracts which are rich in carvacrol (more than 69 %). Therefore, the preventive and curative effects of *T. capitatus* essential oil and hydrosol could be exploited as an ideal alternative to synthetic fungicides for using in the treatment of many fungal phytopathogens causing severe destruction to oranges.

Introduction

Citrus is an important crop with world production estimated at 115 million tons per year. During 2010-2011, 571 thousand tons were produced in Algeria which is the 19th produced in the world and the 3rd in the Arab Maghreb Union (LAGHA-BENAMROUCHE and MADANI, 2013). *Citrus* are among the most popular fruits grown in Algeria. Furthermore, *Citrus* production represents an important agricultural and economic activity in the country. Oranges and mandarins are traditionally produced for local consumption and also for export. *Citrus* is an important crop with world production estimated at 115 million tons per year. During 2010/2011, 571 thousand tons were produced in Algeria which is the 19th producers in the world and the 3rd in the Arab Maghreb Union (FAO, 2012) (LAGHA-BENAMROUCHE and MADANI, 2013). Oranges, lemons, grapefruits and mandarins represent approximately 98 % of industrial cultures. Oranges are most pertinent with about 82 % of total (LAGHA-BENAMROUCHE and MADANI, 2013).

Fungal growth on fresh fruits and vegetables is responsible for food spoilage and numerous plant diseases, which lead to significant economic losses. *Penicillium* and *Aspergillus* were responsible for spoilage of many foods and causes decay on stored fruits damaged by insects, animals, early splits, and mechanical harvesting (TU et al., 2013; ROJAS et al., 2005). The industries of food products nowadays are using synthetic chemical preservatives to prevent the growth of pathogens, but these chemicals convert certain ingested materials into toxins and carcinogens (FARAG et al., 1989). Alternative control methods are needed because of negative public perceptions about the use of pesticides, development of resistance to fungicides, and high

cost for development of new chemicals preservatives (STOJKOVIĆ et al., 2011). Thus, there has been a growing interest on the research of the possible use of plant secondary metabolites for pest and disease control in agriculture (GIKH et al., 2002). The plants have long been recognized to provide a potential source of different class of chemical compounds, known as phytochemicals, such as terpenoids, alkaloids, phenolics, glucosides, etc., which are effective products against pathogenic microorganisms (FENG and ZHENG, 2007). Essential oils are of growing interest both in the industry and scientific research because of their antibacterial and antifungal properties which make them useful as natural additives in foods (PATTNAIK et al., 1997). Such antimicrobial activity is due to the presence of bioactive substances such as monoterpenes, sesquiterpenes and related alcohols, other hydrocarbons and phenols (GRIFFIN et al., 1999; KALEMBA and KUNICKA, 2003).

Thyme (*Thymus*) is a genus containing about 350 species of aromatic perennial herbs and sub-shrubs to 40 cm tall, belong to the family *Lamiaceae*. This family is distributed throughout the arid, temperate and cold regions including Europe, North Africa and Asia. It is in leaf all year, flowering from July to September (GRUENWALD et al., 2004). Several studies have assessed the ability of the *Thymus* essential oils and their constituents as fumigants and repellents against a number of insect pests (CLEMENTE et al., 2003; LEE et al., 2001; HORI, 2003, SALAMA et al., 2012). Effective antifungal activity of *T. propolis* from regions of Algeria was explained by their high content in thymol (49.3 %) and carvacrol (57.7 %) (MELLIU et al., 2007). Molluscicidal activity of *T. capitatus* essential oils rich with carvacrol (32.98 %) and thymol (32.82 %) on adult and eggs of *Biomphalaria alexandrina* as well as on different stages of *Culex pipiens* was evaluated for their effectiveness on vector control (SALAMA et al., 2012). ASKARNE et al. (2012) showed that aqueous extract of *Thymus leptobotrys* completely inhibited mycelial growth of *Penicillium italicum*, a phytopathogenic fungi of *Citrus*. On the other hand, there is no report on the hydrosol composition from this species. Also, the antifungal activity of this hydrosol was reported for the first time against the development of fungi of *Citrus sinensis* fruit. Therefore, the present study was made (i) to examine the *in vitro* antifungal activity of the essential oil and hydrosol extract obtained from *T. capitatus* against four phytopathogenic fungi (*Aspergillus niger*, *Aspergillus oryza*, *Penicillium italicum* and *Fusarium solani*) and (ii) to test *in vivo* the essential oil, hydrosol extract and hydrosol against *Penicillium italicum* responsible of rotting the oranges.

Materials and methods

Plant material

The aerial parts of *T. capitatus* were collected from Beni Snous forests near Tlemcen, Algeria in May 2011. Voucher specimens were deposited in the herbarium of the Tlemcen University Botanical Laboratory (Voucher number: UTL 05.11).

* Corresponding author

Essential oil, hydrosol and hydrosol extract

Essential oil of fresh aerial parts (600 g) was isolated by hydrodistillation (HD) in a Clevenger type apparatus for 5 h, giving clear yellow oil. The yield of the oils was 0.52 %. The obtained essential oil was stored at +4 °C until further tests. The first liter of hydrodistillate is recovered in order to obtain *T. capitatus* hydrosol. Hydrosol was submitted to Liquid Liquid Extraction (LLE). Half a liter of hydrosol was extracted three times with 200 mL of diethyl ether at room temperature. The organic layer dried over Na₂SO₄ and evaporated, so giving an oil yellowish, called hydrosol extract, with yield of 0.0016 %. (w/w). The 500 mL of hydrosol remaining were used to study the *in vivo* activity.

Gas chromatography

Analyses were carried out using a Perkin Elmer Clarus 600 GC apparatus equipped with a dual flame ionization detection system and 2 fused-silica capillary columns (60 m x 0.22 mm I.D., film thickness 0.25 µm), Rtx-1 (polydimethylsiloxane) and Rtx-Wax (polyethylene glycol). 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. Injector and detector temperatures were maintained at 280 °C. Essential oil and hydrosol extract were injected in the split mode (1/50), using helium as the carrier gas (1 mL/min); the injection volume was 0.2 µL. Retention indices (RI) of the compounds were determined from Perkin-Elmer software.

Gas chromatography-mass spectrometry

Essential oil and hydrosol extract were analyzed with a Perkin-Elmer TurboMass quadrupole analyzer, coupled to a Perkin-Elmer Autosystem XL, equipped with 2 fused-silica capillary columns and operated with the same GC conditions described above, except for a split of 1/80. Electronic Impact (EI) mass spectra were acquired under the following conditions: Ion source temperature 150 °C, energy ionization 70 eV, mass range 35-350 Da (scan time: 1 s).

Component identification and quantification

Identification of the components of the essential oil obtained by hydrodistillation (HD) and the hydrosol extract obtained by LLE was based (i) on the comparison of their GC retention indices (RI) on non-polar 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 (JENNINGS and SHIBAMOTO, 1980; KÖNIG et al., 2001; NATIONAL INSTITUTE OF STANDARDS AND TECHNOLOGY, 2008) and (ii) on computer matching with commercial mass spectral libraries (MC LAFFERTY and STAUFFER, 1994; MC LAFFERTY and STAUFFER, 1988; NATIONAL INSTITUTE OF STANDARDS AND TECHNOLOGY, 1999) and comparison of spectra with those of in-house laboratory library. The quantification of essential oil components was carried out using peak normalization including response factors (RFs) with internal standard. The normalized % abundances were calculated, using the methodology reported by (BICCHI et al., 2008) in order to perform the statistical analysis of the oil. Tridecane was introduced in all sample oils at same concentration (0.7 g/100 g) as internal standard.

Pathogenic fungi

Four fungal isolates causing *Citrus* rot. *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryza*, *Penicillium italicum* and *Fusarium solani* were isolated directly from rotten *C. sinensis* fruits harvested from orchards of the El-Fhoul cooperative in Tlemcen (Algeria). All isolated fungal species were transferred to sterilized three replicates 9 cm Petri dishes

containing fresh Potato Dextrose agar medium (PDA) in the presence of a quantity of lactic acid (20 %) to stop the growth of bacteria. The plates were incubated at 25 ± 2 °C for 8 days and darkness. The developing fungal colonies were purified and identified up to the species level by microscopic examination through the help of the following references (BARNETT and HUNTER, 2006).

In vitro antifungal assay

The antifungal activity of *T. capitatus* essential oil and hydrosol extract was tested using radial growth technique (BAJPAI et al., 2007). Appropriate volumes of the stock solutions of the natural mixtures (essential oil and hydrosol extract) in dimethyl sulfoxide (DMSO) to 10 %, were added to PDA medium immediately before it was poured into the Petri dishes (9.0 cm diameter) at 40-45 °C to obtain a series of concentrations (0.01 to 0.5 µg/mL). Each concentration was tested in triplicate. Parallel controls were maintained with DMSO mixed with PDA. The discs of mycelial felt (0.5 cm diameter) of the plant pathogenic fungi, taken from 7-day-old cultures on PDA plates, were transferred aseptically to the centre of petri's dishes were incubated. Amphotericin B (5.0 to 126 µg/ml) was used as a positive control for antifungal activity. The treatments were incubated at 27 °C in the dark. Colony growth diameter was measured after the fungal growth in the control treatments had completely covered the Petri dishes. Percentage of mycelial growth inhibition was calculated from the formula (PANDEY et al., 1982):

$$(I\%) = [(DC-DT)/DC] \times 100 \text{ (PANDEY et al., 1982);}$$

where DC and DT are average diameters of fungal colony of control and treatment, respectively. The measurements were used to determine the minimum inhibitory concentration (MIC) (The minimum concentration causing 100 % mycelial growth inhibition). The fungistatic-fungicidal nature of essential oil and hydrosol extract was tested by observing resumption of growth of the inhibited mycelial disc following its transfer to non-treated PDA. In order to determine fungistatic or fungicidal activity of volatile vapours of essential oils on mycelial growth, plates were further incubated at 26 °C for 7 days. Fungi resuming mycelial growth were considered to be fungistatic.

In vivo antifungal assay

For the *in vivo* antifungal assay, we used method described and developed previously by DIKBAS et al. (2008). The selected orange fruits for the experiments were washed in water, dipped in ethanol (70 %) for 2 min, rinsed twice with double distilled sterile water (10 min each) and air-dried. Surface-sterilized oranges were wounded with a flamesterilized nail to a uniform depth of 3 mm. The fungal inoculums containing 10⁶ spores/mL was prepared by scraping spore material from the surfaces of the colonies with a wet cotton swab and resuspending the material in distilled water containing 0.5 % Tween 80.

For testing antifungal *in vivo* activity against *P. italicum*, the essential oil and hydrosol extract, were separately mixed vigorously with distilled water to obtain two concentrations 0.1 and 0.2 µg/mL, respectively. However, the hydrosol was applied directly with the concentration of 20 µg/mL. The essential oil, hydrosol extract and hydrosol of *T. capitatus* and fungal inoculum were sprayed separately on wounded orange fruits. The antifungal activity was tested on healthy fresh oranges. These experiments were arranged as three different applications. Fruits inoculated with only pathogen were used as positive control for each experiment. Non-inoculated fruits with pathogen were used as negative control. The fruits were sealed in polyethylene-lined plastic boxes to retain 70 % humidity and incubated at 25 °C storage condition. The diameters of decay on fruits were measured at 3, 6, 9, 12 and 15th days after inoculation.

Tab. 1: Chemical compositions of *T. capitatus* essential oil (EO) and hydrosol extract (HY).

No. ^a	Components	RI _a ^b	RI _a ^c	RI _p ^d	EO	HY	Identification ^e
1	α -Thujene	932	924	1028	0.2	-	RI, MS
2	α -Pinene	936	931	1028	0.9	-	RI, MS
3	Camphene	950	945	1071	0.2	-	RI, MS
4	Oct-1-en-3-ol	962	962	1441	0.5	0.2	RI, MS
5	β -Pinene	978	972	1113	0.1	-	RI, MS
6	Myrcene	987	982	1160	2.1	-	RI, MS
7	3-Octanol	981	982	1366	tr	0.1	RI, MS
8	α -Phellandrene	1002	999	1161	0.2	-	RI, MS
9	3-Carene	1005	1006	1149	0.1	-	RI, MS
10	α -Terpinene	1008	1011	1270	1.7	-	RI, MS
11	<i>p</i> -Cymene	1015	1015	1270	12.4	-	RI, MS
12	(<i>Z</i>)- β -Ocimene	1029	1022	1234	0.6	-	RI, MS
13	γ -Terpinene	1051	1050	1245	4.3	-	RI, MS
14	(<i>E</i>)-Sabinene hydrate	1051	1054	1445	0.1	0.6	RI, MS
15	Terpinolene	1082	1079	1281	0.2	-	RI, MS
16	Linalool	1083	1085	1538	1.7	0.5	RI, MS
17	Phenylacetaldehyde	1112	1108	1591	-	0.1	RI, MS
18	Camphor	1123	1124	1506	0.1	-	RI, MS
19	Isoborneol	1143	1144	1670	-	0.5	RI, MS
20	Borneol	1148	1150	1688	0.3	-	RI, MS
21	Terpinen-4-ol	1164	1162	1591	1.1	-	RI, MS
22	α -Terpineol	1176	1176	1690	0.1	0.2	RI, MS
23	<i>trans</i> -dihydro Carvone	1180	1182	1607	tr	-	RI, MS
24	<i>trans</i> -Myrtanol	1241	1242	1859	tr	-	RI, MS
25	Thymol	1266	1263	2181	0,6	0.1	RI, MS
26	Carvacrol	1278	1286	2193	69.6	95.1	RI, MS
27	Eugenol	1330	1329	2164	0.1	0.2	RI, MS
28	<i>cis</i> -Carvyl acetate	1343	1345	1858	0.1	0.2	RI, MS
29	(<i>E</i>)- β -Caryophyllene	1421	1416	1591	1.6	-	RI, MS
30	(<i>E</i>)- α -Bergamotene	1434	1435	1573	tr	-	RI, MS
31	α -Humulene	1455	1448	1668	0.1	-	RI, MS
32	γ -Humulene	1483	1480	1702	tr	-	RI, MS
33	β -Bisabolene	1503	1499	1721	0.1	-	RI, MS
34	δ -Cadinene	1520	1511	1760	tr	-	RI, MS
35	(<i>E</i>)- α -Bisabolene	1530	1531	1755	0.1	-	RI, MS
36	Spathulenol	1572	1560	2120	-	0,1	RI, MS
37	Caryophyllene oxide	1578	1567	1969	0.1	1.1	RI, MS
38	Humulene epoxide II	1602	1599	2044	-	0.1	RI, MS
	Total identification %				99.2	99.1	
	% Hydrocarbon compounds				12.6	-	
	% Monoterpene hydrocarbons				10.7	-	
	% Sesquiterpene hydrocarbons				1.9	-	
	% Oxygenated compounds				86.7	99.1	
	% Oxygenated monoterpenes				3.5	2.2	
	% Oxygenated sesquiterpenes				0.1	1.3	
	% Non terpenic oxygenated compounds				0.5	0.4	
	% Aromatic terpenes				82.6	95.2	

a Order of elution is given on apolar column (Rtx-1), b Retention indices on the apolar Rtx-1 column (RI_a), c Retention indices on the polar Rtx-Wax column (RI_p), d Retention indices on the polar Rtx-Wax column (RI_p), e RI: Retention Indices; Normalized % abundances; MS: Mass Spectrometry in Electronic Impact (EI) mode; EO: essential oil from aerial parts obtained by HD; HY: Extract of hydrosol from aerial parts obtained by LLE.

All treatments consisted of three replicates, and experiments were repeated three times and determined the averages of the repeated experimental results.

Taste panel

Sensory evaluation of oranges treated with hydrosol was assessed by a group of 20 untrained panellists. Panellists were selected among students and staff of the laboratory of chemistry (LASNABIO). Orange samples were soaked into the hydrosol during 24 h, before the oranges were given to panellists to eat. The panellists were asked to evaluate flavor and odor of the orange samples on a scale from 5 to 1, where 1 = extremely dislike, 2 = dislike, 3 = neither like nor dislike, 4 = like; 5 = extremely like, according to a previous reports (STOJKOVIĆ et al., 2011). A general taste score was calculated as the average of all grades. Sensory evaluation was accomplished at 1st, 2nd and 3rd day. Results were expressed as average grades given by 20 panellists.

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 $P \leq 0.05$. Analysis of each test was performed in triplicate.

Results

Chemical analyses

A total of 32 components accounting to 99.2 % of the essential oil (EO) composition of *T. capitatus* were identified by comparison of their EI-mass spectra and their retention indices (RI) with those of our own authentic compound library (Tab. 1). The essential oil was highly dominated by oxygenated compounds (20 components: 74.4 %) with high amount of aromatic terpenic components (82.6 %). However, hydrocarbons appeared also in appreciable proportion (19 components: 25.0 %) with monoterpene hydrocarbons are well represented (23.1 %). Indeed, the main constituents of essential oil were carvacrol (69.6 %), p-cymene (12.4 %) followed by γ -terpinene (4.3 %), myrcene (2.1 %), α -terpinene (1.7 %), linalool (1.7 %) and terpinen-4-ol (1.1 %). Conversely, the analysis of hydrosol extract (HY) obtained by LLE showed only 14 oxygenated compounds (7 monoterpenes, 3 sesquiterpenes, 3 non-terpenic components and 1 phenylpropanoid), no hydrocarbons were reported.

In vitro antifungal activity of *T. capitatus* extracts against the development of fungi of *C. sinensis*

The results obtained in assays of antifungal activity of *T. capitatus* essential oil and hydrosol extract by radial growth technique are reported in Tab. 2. However, data analysis showed that the antifungal

activity of the essential oil and hydrosol extract concentration against the four fungi tested exhibited a significant difference ($P < 0.05$). The results indicate that the inhibition of the mycelial growth of each strain was significantly influenced by the extract concentrations. Essential oil and hydrosol extract inhibited completely all strains. The potent activity was observed against *P. italicum* with the EC_{50} of 0.022 $\mu\text{g}/\text{mL}$ followed by *A. niger*, *F. solani* and *A. oryzae* with the EC_{50} of 0.121, 0.132 and 0.143 $\mu\text{g}/\text{mL}$, respectively. The minimum concentration causing 100 % mycelial growth inhibition against *P. italicum*, *A. oryzae* and *F. solani* phytopathogens were very effective at 0.1, 0.2 and 0.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$, respectively. However, the minimum concentration causing 100% mycelial growth inhibition for *A. niger* strain was 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$. The essential oil and hydrosol extract tested showed strong activity in comparison to the commercial drug Amphotericin B. The most sensitive species were *P. italicum*, *F. solani* and *A. oryzae* with MIC of 0.1, 0.2 and 0.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$, respectively. *A. niger* (MIC of 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) was the most resistant species to the essential oil and hydrosol extract tested. While, MIC of Amphotericin B ranged to 46.2 to 126 $\mu\text{g}/\text{mL}$ for fungal species isolated. Moreover, it is important to know the fungitoxic nature of the essential oils and hydrosol extract. Indeed, the transfer of a mycelial disk of the plate containing a PDA medium and samples on fresh PDA (without oil and hydrosol) showed that no growth had developed after an incubation period of 7 days, suggesting a fungicidal effect of essential oils and hydrosol extract on *F. solani*, *A. oryzae*, *A. niger* at 0.2, 0.2 and 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$, respectively. On the other hand, essential oils and hydrosol extract was fungistatic on *P. italicum* (Tab. 2).

In vivo orange assay

The results of *in vivo P. italicum* Citrus rot treatment with essential oil, hydrosol extract and hydrosol are presented in Tab. 3. According to the increase of concentration, a decrease of disease incidence was recorded. According to the results of lesion diameters on the fruits, both concentrations (0.1 and 0.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$) of the essential oil and hydrosol extract showed strong antifungal activity even at the end of 15th day, there was no significant difference in lesion diameters among those treatments in comparison to the negative control. The concentration of 0.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of essential oil and hydrosol extract were needed for the absence of orange infection and low disease incidence. More, the hydrosol showed a complete absence of orange infection and no disease incidence with a concentration of 0.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$. The result obtained from the hydrosol was showed on Fig. 1.

Taste panel

Tab. 4 shows the acceptability scores of orange samples. Results showed that there were no significant differences in the sensory properties between samples treated with hydrosol, essential oil and control (without hydrosol), since the sensory properties of oranges treated with hydrosol (0.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$) and essential oil (0.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$)

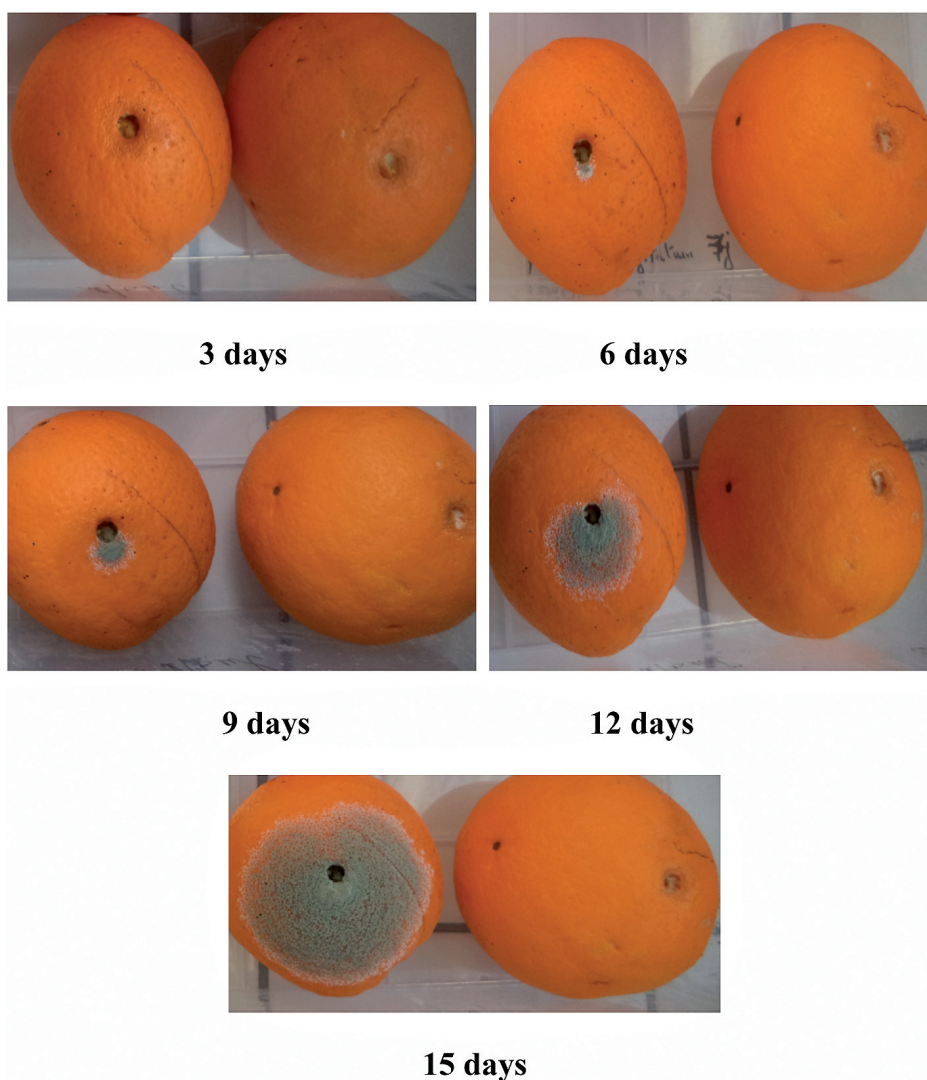
Tab. 2: Antifungal activity of essential oil (EO) and hydrosol extract (HY) of *T. capitatus* against *A. niger*, *A. oryzae*, *P. italicum* and *F. solani*.

Extracts ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	<i>A. niger</i>		<i>A. oryzae</i>		<i>F. solani</i>		<i>P. italicum</i>	
	MIC ^a	EC_{50} ^b	MIC ^a	EC_{50} ^b	MIC ^a	EC_{50} ^b	MIC ^a	EC_{50} ^b
EO	0.5 \pm 0.06 ^d	0.121 \pm 0.80	0.2 \pm 0.01 ^d	0.143 \pm 0.80	0.2 \pm 0.01 ^d	0.132 \pm 0.22	0.1 \pm 0.01 ^e	0.022 \pm 0.06
HY	0.5 \pm 0.01 ^d	0.121 \pm 0.81	0.2 \pm 0.01 ^d	0.143 \pm 0.56	0.2 \pm 0.01 ^d	0.132 \pm 0.32	0.1 \pm 0.01 ^e	0.022 \pm 0.06
Am B ^c	46.2 \pm 1.81	15.62 \pm 1.06	46.2 \pm 1.39	15.62 \pm 1.50	126 \pm 3.56	62.50 \pm 1.79	61.2 \pm 2.01	31.25 \pm 1.11

^a minimum concentration causing 100 % mycelial growth inhibition; ^b minimum concentration causing 50 % mycelial growth inhibition; ^c Am B : Amphotericin B ($\mu\text{g}/\text{mL}$) was used as reference Antibiotic; ^d fungicidal effect; ^e fungicistatic effect; The results are expressed as mean \pm standard deviation.

Tab. 3: Means of decay diameters (mm) measured after 3, 6, 9, 12 and 15 days on orange fruits treated with 0.1 or 0.2 µg/mL of essential oil, hydrosol extract and hydrosol from *T. capitatus*.

Treatments	Means ± SD of decay diameters (mm)				
	3 days	6 days	9 days	12 days	15 days
Controls negative	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
Controls Positive	1.1 ± 0.2	2.8 ± 0.3	5.7 ± 0.5	8.1 ± 0.8	13.2 ± 0.2
Essential oil					
0.1 µg/mL	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.5 ± 0.01	1.5 ± 0.2	2.5 ± 0.5
0.2 µg/mL	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.5 ± 0.01	1.0 ± 0.2
Hydrosol extract					
0.1 µg/mL	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.5 ± 0.06	1.5 ± 0.2
0.2 µg/mL	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.5 ± 0.02
Hydrosol					
0.2 µg/mL	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0

**Fig 1:** Decayed orange (left), inoculated with only pathogen *P. italicum* (positive control), and not decayed orange (right) onto which hydrosol (0.2 µg/mL) was applied 30 min before pathogen inoculation, kept at 25 °C for the period stated below the respective picture.

Tab. 4: Effect of essential oil (EO) and hydrosol (HY) on acceptability sensory scores of orange stored at 25 °C.

Treatment		Days of Storage		
		1	2	3
Acceptability ^a	HY	4.5	4.6	4.2
	EO	3.9	4.0	3.8

The results are expressed as the average of all grades. ^a 1 = extremely dislike, 2 = dislike, 3 = neither like nor dislike, 4 = like; 5 = extremely like.

were deemed acceptable by the panelists at the supplementation levels. More work on the acceptability of both extracts as oranges preservative will be necessary.

Discussion

In the present investigation, a total of 14 and 38 compounds comprising 99.1 and 99.2 % of the hydrosol extract and essential oil were identified from *T. capitatus* respectively, carvacrol being the major component, comprising 95.1 and 69.6 % of the hydrosol and essential oil, respectively. This study agrees with the findings of RUBERTO et al. (1992), AMARTI et al. (2008) and TAWAHA et al. (2012), who reported carvacrol to be the major component of *T. capitatus* essential oil.

In the present investigation, the reduction of the mycelial growth of colonies in presence of essential oil and hydrosol extract of *T. capitatus* showed that it effectively controlled all strains. This efficiency can be explained by the presence of active molecules that inhibited the growth of the phytopathogenic fungi. The antifungal properties of *T. capitatus* essential oil and hydrosol extract are probably associated with the high amount of phenolic terpenes, especially the main component carvacrol. Indeed, carvacrol is used as a disinfectant, fungicide, and fragrance ingredient in cosmetic formulations. In addition, DAFERERA et al. (2000) reported that the fungitoxic activity of essential oils may have been due to formation of hydrogen bonds between the hydroxyl group of oil phenolics and active sites of target enzymes.

Although the extracts or essential oils of *T. capitatus* have been screened for their antifungal activity under *in vitro* conditions (MELLIU et al., 2007; DIKBAS et al., 2008; NYCHAS, 1996), there are no reports on the control of *P. italicum* under *in vivo* conditions by using the essential oil and hydrosol of *T. capitatus*. The essential oil and hydrosol of *T. capitatus* from Algeria was characterized by high content of carvacrol (69.6 % and 95.1 %, respectively). Little literature exists on the effect of carvacrol on these food pathogenic fungi (MORCIA et al., 2012), although carvacrol was effective on inhibiting spore germination of *Botrytis cinerea* when applied to the potato dextrose agar (MARTINEZ-ROMERO et al., 2007). In addition, MARKOVIC et al. (2011) demonstrated that carvacrol has a remarkably antifungal potential against *Aspergillus* spp. and *Penicillium* spp. In a study conducted by MULLER-RIEBAU et al. (1995), carvacrol showed a remarkable antifungal activity by inhibition of the mycelial growth of *Fusarium* spp. BOUDDINE et al. (2012) revealed that *Aspergillus niger* growth was completely inhibited by carvacrol at concentrations of 0.025 %. Furthermore, this study confirmed the antifungal activity of this component against mycelial growth of *P. italicum* *in vitro* and *in vivo* assays. The World Health Organization (WHO) has stated that carvacrol residues in food are without danger to the consumer as long as they do not exceed 50 mg kg⁻¹ (WHO, 2012). It is thus clear that treatment by hydrosol is an easy to prepare and the cost price of extraction is not expensive. However, the benefits of hydrosol (non-toxic at low doses, biodegradable, and no risk for resistance development) and disadvantages of chemical fungicides on health and on

the environment make hydrolate of *T. capitatus* more interesting for citrus postharvest treatment.

Conclusion

In conclusion, 38 compounds of *T. capitatus* essential oil and hydrosol extract were identified. This oil was characterized by high content of carvacrol. Furthermore, this study confirmed the antifungal activity of the essential oil and hydrolate against mycelial growth and spore production of *A. niger*, *A. oryzae*, *F. solani* and *P. italicum* from *in vitro* assay. *In vivo* inhibitory properties of hydrosol on disease incidence of *P. italicum*-causal agent of *penicillium* rot on oranges were recorded. Therefore, the preventive and curative effects of *T. capitatus* hydrolate could be exploited as an ideal alternative to synthetic fungicides for using in the treatment of many fungal phytopathogens causing severe destruction to oranges.

Acknowledgements

The authors are indebted to the Ministère des Affaires Etrangères et Européennes through the research program France-Algérie “Partenariat Hubert Curien Tassili”.

References

- AMARTI, F., SATRANI, B., AAFI, A., GHANMI, M., FARAH, A., ABERCHANE, M., EL AJJOURI, M., EL ANTRY, S., CHAOUCH, A., 2008: Composition chimique et activité antimicrobienne des huiles essentielles de *Thymus capitatus* et de *Thymus bleicherianus* du Maroc. *Phytotherapie* 6, 342-347.
- ASKARNE, L., TALIBI, I., BOUBAKER, H., BOUDYACH, E.H., MSANDA, F., SAADI, B., SERGHINI, M.A., AIT BEN AOUMAR, A., 2012: *In vitro* and *in vivo* antifungal activity of several Moroccan plants against *Penicillium italicum*, the causal agent of citrus blue mold. *Crop Prot.* 40, 53-58.
- BAJPAI, V.K., RAHMAN, A., KANG, S.C., 2007: Chemical composition and antifungal properties of the essential oil and crude extracts of *Metasequoia glyptostroboides* Miki ex Hu, Ind. *Crop Prod.* 26, 28-35.
- BARNETT, H.L., HUNTER, B.B., 2006: Illustrated genera of imperfect fungi. 4th Ed., The American Phytopathological Society, St. Paul Minnesota.
- BICCHI, C., LIBERTO, E., MATTEODO, M., SGORBINI, B., MONDELLO, L., ZELLNER, B.A., COSTA, R., RUBIOLLO, P., 2008: Quantitative analysis of essential oils: a complex task. *Flav. Fragr. J.* 23, 382-391.
- BOUDDINE, L., LOUASTE, B., ACHAHBAR, S., CHAI, N., CHAMRI, F., REMMAL, A., 2012: Comparative study of the antifungal activity of some essential oils and their major phenolic components against *Aspergillus niger* using three different methods. *Afr. J. Biotechnol.* 11, 14083-14087.
- CLEMENTE, S., MAREGGIANI, G., BROUSSALIS, A., MARTINO, V., FERRARO, G., 2003: Insecticidal effects of Lamiaceae species against stored products insects. *Bol. San. Veg. Plagas.* 29, 1-8.
- DAFERERA, D.J., ZIOGAS, B.N., POLISSIOU, M.G., 2000: GC-MS analysis of essential oils from some Greek aromatic plants and their fungitoxicity on *Penicillium digitatum*. *J. Agric. Food Chem.* 48, 2576-2581.
- DIKBAS, N., RECEP KOTAN, F., DADASOGLU, F.S., 2008: Control of *Aspergillus flavus* with essential oil and methanol extract of *Satureja hortensis*. *Int. J. Food Microbiol.* 124, 179-182.
- FARAG, R.S., DAW, Z.Y., HEWEDI, F.M., EL-BAROTY, G.S.A., 1989: Antimicrobial activity of some Egyptian spice essential oils. *J. Food. Protect.* 52, 665-667.
- FENG, W., ZHENG, X., 2007: Essential oils to control *Alternaria alternata* *in vitro* and *in vivo*. *Food Control* 18, 1126-1130.
- GIKH, M., ABDEL RASSOUL, M.A., ABDELGALEIL, S.A.M., 2012: Comparative antifungal activities and biochemical effects of monoterpenes on plant pathogenic fungi. *Pestic. Biochem. Phys.* 103, 56-61.
- GRIFFIN, S.G., WYLLIE, S.G., MARKHAM, J.L., LEACH, D.N., 1999: The role of structure and molecular properties of terpenoids in determining their

- antimicrobial activity. *Flav. Fragr. J.* 14, 322-332.
- GRUENWALD, J., BRENDLER, T., JAENICKE, C., 2004: PDR for Herbal Medicines. 3th Ed. Montvale (NJ), Thompson, PDR, 815-816.
- HORI, M., 2003: Repellency of essential oils against the cigarette beetle, *Lasioderma serricorne* (Fabricius) (Coleoptera: Anobiidae). *Appl. Entomol. Zool.* 38, 467-473.
- JENNINGS, W., SHIBAMOTO, T., 1980: Qualitative analysis of flavour and fragrance volatiles by glass-capillary gas chromatography. In: Jovanovich, H.B. (ed.), Academic Press, New-York.
- KALEMBA, D., KUNICKA, A., 2003: Antibacterial and antifungal properties of essential oils. *Curr. Med. Chem.* 10, 813-829.
- KÖNIG, W.A., HOCHMUTH, D.H., JOULAIN, D., 2001: Terpenoids and related constituents of essential oils. Library of Mass Finder 2.1. Institute of Organic Chemistry, Hamburg, Germany.
- LAGHA-BENAMROUCHE, S., MADANI, K., 2013: Phenolic contents and antioxidant activity of orange varieties (*Citrus sinensis* L. and *Citrus aurantium* L.) cultivated in Algeria: Peels and leaves. *Ind. Crop. Prod.* 50, 723-730.
- LEE, B.H., CHOI, W.S., LEE, S.E., PARK, B.S., 2001: Fumigant toxicity of essential oils and their constituent compounds towards the rice weevil, *Sitophilus oryzae* (L.). *Crop Prot.* 20, 317-320.
- MARKOVIC, T., CHATZOPOULOU, P., ŠIILJEGOVIC, J., NIKOLI, N., GLAMOČLIJA, J., ČIRIC, A., SOKOVIĆ, M., 2011: Chemical analysis and antimicrobial activities of the essential oils of *Satureja thymbra* L. and *Thymbra spicata* L. and their main components. *Arch. Biol. Sci.* 63, 457-464.
- MARTINEZ-ROMERO, D., GUILLEN, F., VALVERDE, J.M., BAILEN, G., ZAPATA, P.J., SERRANO, M., VALERO, D., 2007: Influence of carvacrol on survival of *Botrytis cinerea* inoculated in table grapes. *Int. J. Food Microbiol.* 115, 144-148.
- MC LAFFERTY, F.W., STAUFFER, D.B., 1994: Wiley Registry of Mass Spectral Data, 6th Ed., Mass Spectrometry Library Search System Bench-Top/PBM version 3.10d. Palisade, Newfield.
- MC LAFFERTY, F.W., STAUFFER, D.B., 1988: The Wiley/NBS Registry of Mass Spectral Data, 4th Ed., Wiley-Interscience, New York.
- MELLIU, E., STRATIS, E., CHINOU, I., 2007: Volatile constituents of propolis from various regions of Greece – Antimicrobial activity. *Food Chem.* 103, 375-380.
- MORCIA, C., MALANATI, M., TERZI, V., 2012: *In vitro* activity of terpinen-4-ol, eugenol, carvone, 1,8-cineole (eucalyptol) and thymol against mycotoxigenic plant pathogens. *Food Addit. Contam.* 29, 415-422.
- MULLER-RIEBAU, F., BERGER, B., YEGEN, O., 1995: Chemical composition and fungitoxic properties to phytopathogenic fungi of essential oils of selected aromatic plants growing wild in Turkey. *J. Agric. Food Chem.* 43, 2262-2266.
- NATIONAL INSTITUTE OF STANDARDS AND TECHNOLOGY, 2008: Spectral Database for Organic Compounds, NIST WebBook: <http://webbook.nist.gov/chemistry>.
- NATIONAL INSTITUTE OF STANDARDS AND TECHNOLOGY, 1999: PC version 1.7 of the NIST/EPA/NIH Mass Spectral Library Norwalk. Perkin-Elmer Corp., CT, USA.
- NYCHAS, G.J.E., 1996: Natural antimicrobial from plants. In: Gould, G.W. (ed.), New methods of food preservation, 235-258. CRC Press, London.
- PANDEY, D.K., TRIPATHI, N.N., TRIPATHI, R.D., 1982: Fungitoxic and phytotoxic properties of essential oil of *Hyptis suaveolens*. *Z. Pfl. Krankh. Pfl. Schutz* 89, 344-349.
- PATNAIK, S., SUBRAMANYAM, V.R., BAPAJI, M., DIXIT, S.N.Z., 1997: Antibacterial and antifungal activity of aromatic constituents of essential oils. *Microbios.* 89, 39-46.
- ROJAS, T.R., SAMPAYO, C.A.F., VÁZQUEZ, B.I., FRANCO, C.M., CEPADA, A., 2005: Study of interferences by several metabolites from *Aspergillus* spp. in the detection of aflatoxigenic strains in media added with cyclodextrin. *Food Control* 16, 445-450.
- RUBERTO, G., BIONDI, D., PIATTELLI, M., 1992: The essential oil of Sicilian *Thymus capitatus* (L.) Hoffmanns, et Link. *J. Essent. Oil Res.* 4(4), 417-418.
- SALAMA, M.M., TAHER, E.E., EL BAHY, M.M., 2012: Molluscicidal and mosquitocidal activities of the essential oils of *Thymus capitatus* L. and *Marrubium vulgare* L. *Am. J. Drug Discov. Dev.* 2(4), 204-211.
- STOJKOVIĆ, D., SOKOVIĆ, M., GLAMOČLIJA, J., DŽAMIĆ, A., ČIRIĆ, A., RISTIĆ, M., GRUBIŠIĆ, D., 2011: Chemical composition and antimicrobial activity of *Vitex agnus-castus* L. fruits and leaves essential oils. *Food Chem.* 128, 1017-1022.
- TAWAHA, K.A., HUDAIB, M.M., 2012: Chemical composition of the essential oil from flowers, flower buds and leaves of *Thymus capitatus* Hoffmanns. & Link from Jordan. *J. Essent. Oil Bear Pl.* 15(6), 988-996.
- TU, Q., CHENA, J., GUOC, J., 2013: Screening and identification of antagonistic bacteria with potential for biological control of *Penicillium italicum* of citrus fruits. *Sci. Hortic.* 150, 125-129.
- WHO, 2012: <http://apps.who.int/medicinedocs/en/d/Js2200e/28.html> (accessed April).

Address of the corresponding author:
E-mail: a_dibdz@yahoo.fr

Antioxidant and Antifungal Activity of Extracts of the Aerial Parts of *Thymus capitatus* (L.) Hoffmanns Against Four Phytopathogenic Fungi of *Citrus sinensis*

Leila Tabti¹; Mohammed ElAmine Dib^{2,*}; Nassira Gaouar¹; Bouayad Samira¹; Boufeldja Tabti²

¹Laboratory of Ecology and Natural Ecosystems Management, Faculty of Natural Sciences and the Life and Earth Sciences and the Universe, University of Tlemcen, Tlemcen, Algeria

²Laboratory of Natural and Bioactive Substances, Faculty of Science, Department of Chemistry, University of Tlemcen, Tlemcen, Algeria

*Corresponding author: Mohammed ElAmine Dib, Laboratory of Natural and Bioactive Substances (LASNABIO) Department of Chemistry, Faculty of Science, University of Tlemcen, Tlemcen, Algeria. Tel: +213-43286530, E-mail: a_dibdz@yahoo.fr

Received: August 1, 2013; Revised: November 8, 2013; Accepted: November 26, 2013

Background: Many medicinal plants from the Lamiaceae family can be easily found in Algeria. These plants have been used as traditional medicines by local ethnic groups. *Thymus capitatus* is known in Algeria as "Zaatar" and has been commonly used as a spice, and reported to have many biological effects.

Objectives: This paper focused on the assessment of the antioxidant potential and antifungal activity of essential oil and solvent extracts of *T. capitatus* against the growth of certain fungi.

Materials and Methods: Essential oil, ethanol and hexane extracts of *T. capitatus* were tested for their antioxidant and antifungal activities. The 2, 2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) assay was used to determine the free radical quenching capacity. Antifungal activity was assessed using the radial growth technique.

Results: DPPH free radical scavenging effect of the extracts was compared with standard antioxidant ascorbic acid and showed significant results. The ethanol extract showed high activity at the concentration of 80 g/mL, but less than the standard ascorbic acid. The essential oil was effective against all the fungi used in the experiment. The highest inhibitory effect on the growth of *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae*, *Penicillium digitatum*, and *Fusarium solani* was exhibited by the essential oil at concentrations between 0.1 and 0.5 µg/mL.

Conclusions: These findings demonstrated that ethanol extract obtained from *T. capitatus* is a potential source of natural antioxidant, while the essential oil extract can be exploited as an ideal alternative to synthetic fungicides for use in the treatment of many fungal phytopathogens.

Keywords: Antioxidants; *Citrus sinensis*; 2, 2-diphenyl-1-picrylhydrazyl; Lamiaceae

1. Background

Recently, the use of spices and herbs as antioxidants and antimicrobial agents in foods is becoming increasingly important. The growth of fungi on fresh fruits and vegetables is responsible for food spoilage and numerous plant diseases, which lead to significant economic losses. *Aspergillus*, *Fusarium* and *Penicillium* are responsible for spoilage of many foods and cause decay of stored fruits damaged by insects, animals, early splits, and mechanical harvesting (1, 2). Apart from causing diseases in plants, many species of *Aspergillus*, *Penicillium* and *Alternaria* can also synthesize mycotoxins. These compounds are hazardous to animal and human health as they can be lethal, carcinogenic, mutagenic, teratogenic, immunosuppressant, or may mimic estrogens (3). On the other hand, antioxidants have been widely used as food addi-

tives to provide protection against oxidative degradation of foods (4, 5). The request for reduced use of synthetic antioxidants such as butylated hydroxyl toluene (BHT) and butylated hydroxyl anisole (BHA) in the food industry has triggered the need to develop alternative active compounds, which are harmless to the consumers and to the environment (6, 7). Additionally, in the food industry, the biological properties of plant extracts have been investigated for the possible use of essential oils and/or solvent extracts of plants for the control of pathogenic microorganisms. Consequently, reports on antioxidant and antifungal properties of local plants are of great interest. Thyme belongs to the Apiaceae family, and in Algeria this herb is used as a food additive and has been reported to possess various medicinal properties (8), and has proved

Implication for health policy makers/practice/research/medical education:

The essential oil from *T. capitatus* can be exploited as an ideal alternative to synthetic fungicides for use in the treatment of fungal phytopathogens. On the other hand, the ethanol extract from *T. capitatus* was found to be an effective antioxidant by *in vitro* assays.

Copyright © 2014, School of Pharmacy, Ahvaz Jundishapur University of Medical Sciences; Published by DOCS. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

to be toxic to insects (9). The essential oils from *Thymus* species are rich sources of phenolic monoterpenes such as thymol and carvacrol (10-12). Several studies have been published on the biological properties of *Thymus capitatus* (L.) Hoffmanns and Link, such as its antibacterial (13-15), antifungal (16), antioxidant (17-21) and antiviral activities (22).

2. Objectives

The main aim of this work was to evaluate, for the first time, the antifungal properties of essential oil and solvent extracts of *T. capitatus* against the phytopathogens that cause severe diseases in Citrus, such as *A. niger*, *A. oryzae*, *P. digitatum*, and *F. solani*. Secondly, we evaluated the antioxidant activity of these extracts by the free radical 2, 2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) method.

3. Materials and Methods

3.1. Plant Material

The aerial parts of *T. capitatus* were collected from Beni Snous forests near Tlemcen, Algeria during May 2011. Voucher specimens were deposited in the herbarium of the Tlemcen University Botanical Laboratory (Voucher number: UTL 05.11). The *C. sinensis* fruits were harvested from orchards of the El-Fhoul cooperative in Tlemcen (Algeria). The identification of the species was confirmed by Professor Noury Benabadji, and the specimens were deposited in the herbarium of the Faculty of Sciences of Tlemcen (Algeria).

3.2. Preparation of the Extracts

The oil was isolated by hydrodistillation (550-600 g of plant per sample) for 6 hours using a Clevenger-type apparatus according to the European Pharmacopoeia (23). The air-dried plant (50 g) was extracted three times (3 × 20 mL) with organic solvents (hexane and ethanol 98%) using a Soxhlet apparatus. The ethanol (98%) and hexane extracts were filtered and concentrated under vacuum. The organic solvent extracts were dried over anhydrous sodium sulfate, and then stored in sealed glass vials at 4-5 °C prior to the analysis. Each extraction was performed in triplicate.

3.3. Pathogenic Fungi

Four fungal isolates causing Citrus rot, *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae*, *Penicillium digitatum* and *Fusarium solani* were isolated directly from rotten *C. sinensis* fruits. All isolated fungal species were transferred to sterilized triplicate 9 cm Petri dishes containing fresh 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 bac-

teria. The plates were incubated at 25 ± 2 °C for 8 days, in darkness. The developing fungal colonies were purified and identified up to the species level by microscopic examination through the help of published materials (24).

3.4. In Vitro Antifungal Assay

The antifungal activity of essential oil and extracts was tested using the radial growth technique (25, 26). Appropriate volumes of the essential oil and extracts were added to the PDA medium immediately before it was poured into the Petri dishes (9.0 cm diameter) (at 40-45 °C) to obtain a series of concentrations (0,01 to 5500 µg/mL). Each concentration was tested in triplicate. The discs of mycelial felt (0.5 cm diameter) of the plant pathogenic fungi, taken from 8-day-old cultures on PDA plates, were transferred aseptically to the center of Petri dishes. Amphotericin B was used as a reference fungicide. The treatments were incubated at 27 °C in the dark. Colony growth diameter was measured after the fungal growth in the control treatments had completely covered the Petri dishes. Percentage of mycelial growth inhibition (I%) was calculated using the following formula (27):

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

Where DC and DT are average diameters of fungal colony from control and treatment samples, respectively. The measurements were used to determine the minimum inhibitory concentration (MIC); lowest concentration of the essential oil and extracts that would inhibit the visible growth of a microorganism after overnight incubation. The fungistatic-fungicidal nature of essential oil and extracts was tested by observing revival of growth of the inhibited mycelial disc following its transfer to non-treated PDA. A fungicidal effect was when there was no growth, whereas a fungistatic effect was when temporary inhibition of microbial growth occurred.

3.5. Free radical Scavenging Effectiveness

The free radical-scavenging activities of essential oil and solvent extracts were measured using DPPH as described by Hatano et al. (1988) (28). Various concentrations (50, 100, 150, and 200 µg/mL) of the oil, (50-200 µg/mL) hexane and (20-80 µg/mL) ethanol extracts were added to 4 mL of a DPPH radical solution in ethanol (the final concentration of DPPH was 0.05 mM). The mixture was strongly shaken and left to stand at room temperature for 30 minutes in the dark. The absorbance was measured at 517 nm against a blank. Inhibition percentage (I%) of the free radical, DPPH was calculated according to the following formula:

$$I\% = 100 \times (A \text{ control} - A \text{ sample}) / A \text{ control}$$

Where A control is the absorbance of the control reaction, and A sample is the absorbance of the test compound. The sample concentration providing 50% inhibition (IC₅₀) was calculated from the graph of inhibition

percentage against sample concentration. Tests were performed in triplicates. Ascorbic acid was used as a positive control.

4. Results

4.1. Antioxidant Properties of Extracts

On one hand, the yields resultants of obtained solvent extraction, by Soxhlet apparatus were 1.6 and 0.27% for ethanol and hexane extract, respectively. On the other hand, the yield of *T. capitatus* essential oil obtained by hydrodistillation was 0.52% (w/w). The DPPH radical scavenging assay was used to compare the powerful antioxidant activity of extracts of *T. capitatus* with ascorbic acid as the standard. A freshly prepared DPPH solution displays a deep purple color ($\lambda_{\text{max}} = 517 \text{ nm}$) which gradually vanishes in the presence of a good hydrogen donor, i.e., a potent antioxidant. Table 1 demonstrates DPPH scavenging activity, expressed as percentage, caused by different concentrations of essential oil and solvent extracts from *T. capitatus*.

Table 1. DPPH Radical-scavenging of the Extracts From *T. capitatus* at Different Concentrations^a

Extracts and Concentrations, $\mu\text{g/mL}$	Scavenging Effect on DPPH, %	DPPH IC_{50} , $\mu\text{g/mL}$
EO		102 \pm 1.01
50	39 \pm 1	
100	48 \pm 3.1	
150	63 \pm 2.5	
200	78 \pm 4.1	
Ethanol		31 \pm 0.92
20	43 \pm 3.1	
40	56 \pm 2.8	
60	68 \pm 4.5	
80	88 \pm 3.0	
Hexane		99 \pm 1.06
80	41 \pm 3.2	
100	55 \pm 1	
150	63 \pm 2.6	
200	82 \pm 5.1	
Ascorbic acid		0.95 \pm 0.12
0.4	28 \pm 0.7	
0.5	38 \pm 0.6	
1	59 \pm 1.1	
2	86 \pm 2.6	

^a Value is expressed as Mean \pm SD, (n = 3)

Comparison of the DPPH scavenging activity of investigated essential oil and solvent extracts with those expressed by ascorbic acid showed that all of the examined

extracts had noticeable antioxidant effects. The weakest radical scavenging activity (82 and 78%) was exhibited by the hexane extract and essential oil at a concentration of 200 $\mu\text{g/mL}$, whereas the strongest activity (88%) was exhibited by the ethanol extract at a concentration of 80 $\mu\text{g/mL}$. As shown in Table 1, the antioxidant activity of extracts and essential oil also increased with an increase in their concentrations. At higher concentrations, the antioxidant activity of extracts was closer to the scavenging effect of ascorbic acid. For instance, at 2.0 $\mu\text{g/mL}$, the scavenging activity of ascorbic acid was around 86%, and an 80 $\mu\text{g/mL}$ ethanol extract solution had a scavenging activity of 88%. The same value was obtained for the hexane extract and essential oil at a concentration of 200 $\mu\text{g/mL}$. Therefore, DPPH scavenging activity is usually presented by the IC_{50} value. Concentrations of the antioxidants providing 50% inhibition of DPPH in the test solution (IC_{50}) were calculated and presented in Table 1. The ethanol extract of *T. capitatus* had the highest radical scavenging activity with the lowest IC_{50} value of (31 $\mu\text{g/mL}$). This was higher than the hexane extract with an IC_{50} value of 99 $\mu\text{g/mL}$, and essential oil with an IC_{50} value of 102 $\mu\text{g/mL}$.

4.2. Antifungal Activity of *T. capitatus* Extracts

The inhibitory effects of the three extracts were evaluated against four pathogenic fungi: *A. niger*, *A. oryzae*, *P. digitatum* and *F. solani*. The results obtained from assays of antifungal activity at different concentrations of *T. capitatus* extracts by the radial growth technique are reported in Table 2. The results indicate that the inhibition of the mycelial growth of each strain was significantly influenced by the extracts concentration. This study revealed the significant antifungal activity of *T. capitatus* extracts. Essential oil had the highest observed antifungal activity against all fungi. Essential oil completely inhibited all strains. The highest observed activity was against *A. niger* with the minimum concentration causing 100% mycelial growth inhibition value of 0.1 $\mu\text{g/mL}$. The second highest activity was observed against *A. oryzae* and *F. solani* with the minimum concentration causing 100% mycelial growth inhibition being 0.2 $\mu\text{g/mL}$. However, the minimum concentration causing 100% mycelial growth inhibition for *P. digitatum* strain was 0.5 $\mu\text{g/mL}$. Moreover, the oil was fungicidal for the 3 pathogens *A. niger*, *A. oryzae* and *F. solani*, and fungistatic for *P. digitatum*. However, hexane and ethanol extracts had the lowest activity, with the minimum concentration causing 100% mycelial growth inhibition value being greater than 1200 $\mu\text{g/mL}$.

5. Discussion

Antioxidants have been widely used as food additives to provide protection against oxidative degradation of food. Furthermore, many synthetic antioxidant components have toxic and/or mutagenic effects. On the other hand, food decay by spoilage fungi causes considerable

Table 2. Antifungal Activity of *T. capitatus* Extracts Against *A. niger*, *A. oryzae*, *P. digitatum* and *F. solani*^a

Extracts	<i>A. niger</i>			<i>A. oryzae</i>			<i>P. digitatum</i>			<i>F. solani</i>		
	95% Confidence Limits		100% Inhibition, $\mu\text{g/mL}^d$	95% Confidence Limits		100% Inhibition, $\mu\text{g/mL}^d$	95% Confidence Limits		100% Inhibition, $\mu\text{g/mL}^d$	95% Confidence Limits		100% Inhibition, $\mu\text{g/mL}^d$
	Lower ^b	Upper ^c		Lower ^b	Upper ^c		Lower ^b	Upper ^c		Lower ^b	Upper ^c	
EO	0.01	1.0	0.1 \pm 0.01 ^{e, f}	0.01	1.0	0.2 \pm 0.01 ^{e, f}	0.05	1.0	0.5 \pm 0.06 ^{e, f}	0.02	1.0	0.2 \pm 0.01 ^{e, f}
Hexane	500	2500	1250 \pm 12.8 ^{e, f}	500	2500	1250 \pm 26.1 ^{e, f}	500	2500	1250 \pm 16.1 ^{e, f}	500	2500	1250 \pm 13.1 ^{e, f}
Ethanol	500	> 5500	> 5500	500	> 5500	> 5500	500	> 5500	> 5500	500	> 5500	> 5500
Am B	100	250	156 \pm 2.9 ^f	100	250	156 \pm 7.6 ^f	500	800	612 \pm 6.1 ^f	100	250	156 \pm 0.45 ^{e, f}

^a Am B, amphotericin B; EO, essential oil.

^d The minimum concentration causing 100% mycelial growth inhibition

^b The lowest concentration that would inhibit the visible growth of a microorganism.

^c The greatest concentration causing 100% mycelial growth inhibition.

^e Fungicidal effect.

^f Values expressed are Mean \pm SD of three parallel measurements (n = 3).

^g Fungistatic effect.

economic loss, and constitutes a health risk for consumers due to the potential of fungi to produce mycotoxins. The indiscriminate use of synthetic antifungals has led to the development of resistant strains, which has necessitated the utilization of higher concentrations, with the consequent increase of toxic residues in food products. Plants produce diverse arrays of phytochemicals, which are useful for the development of new drugs. These phytochemicals are mostly secondary metabolites constantly synthesized by the plant for defensive purposes (29). In this study, we evaluated the antioxidant activity of different solvent extracts of the *T. capitatus* by the free radical 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) method. The results demonstrated that the ethanol extract compared to essential oil and hexane extract from *T. capitatus* was more active in scavenging stable free radical DPPH system with IC₅₀ of 31 \pm 0.92 $\mu\text{g/mL}$, comparable with ascorbic acid, a synthetic antioxidant agent (0.95 \pm 0.12 $\mu\text{g/mL}$). This antiradical activity could be due to the phenolic compounds. In fact, it has been found that antioxidant molecules such as polyphenols, flavonoids, and tannins reduce and discolor DPPH due to their hydrogen donating ability (30). Similar results were found in the literature, which demonstrated that methanolic extracts of *T. capitatus* flowers are able to reduce DPPH to the yellow-colored diphenylpicrylhydrazine with an IC₅₀ of 12 $\mu\text{g/mL}$, exhibiting higher activity than the synthetic antioxidant agent BHT (25 $\mu\text{g/mL}$) (31). Moreover, *T. capitatus* expressed different DPPH assay values (DPPH-TEAC = 30.4 mg Trolox/g DW) (32). Furthermore, *T. capitatus* essential oil showed pronounced antifungal activity against all fungi, the minimum concentration causing 100% mycelial growth inhibition values ranged between 0.1 and 0.5 $\mu\text{g/mL}$ stronger to the reference fungicide, amphotericin B. The antimicrobial activity of *T. capitatus* essential oil might be related to its phenolic terpenes, especially the major components carvacrol and thymol (33, 34). Previous work focusing on the antimicrobial activities of different *Thymus* essential oils have tried to correlate these activities to one or many major components. In fact, antifungal activities of some *Thymus* oils were previously explained by the high phenol (thymol and carvacrol) content. It has been shown that the strong antifungal activity of *T. vulgaris* essential oil is due to its high amount of thymol (25.57%) (35). Effective antifungal activity of a *T. pallezens* from certain regions in Algeria was also explained by their high content of thymol (49.3%) and carvacrol (57.7%), respectively (36). However, the carvacrol and thymol, which are the main components of the essential oils of *Thymus*, showed strong larvicidal efficiency (37, 38). This paper is part of an overall study aimed to determine the antifungal and antioxidant activities of natural floral resources of Algeria, to find new bioactive natural products. The essential oil possesses potent antifungal activities against *A. niger*, *A.*

oryzae, *P. digitatum* and *F. solani*. Therefore, the essential oil can be exploited as an ideal alternative to synthetic fungicides for using in the treatment of many fungal phytopathogens of *C. sinensis*. However, the influence of essential oil or bioactive compounds on flavor and aroma of Citrus was not investigated and further work should be conducted to examine the efficiency of volatile components in real applications such as fumigant (essential oil). Secondly, the ethanol extract of *T. capitatus* was found to be an affective antioxidant by *in vitro* assays. On the basis of these results, the thyme essential oil would thus be recommended as a plant based ideal preservative for enhancement of shelf life of stored food commodities. The findings of the present study may draw the attention of food industries to conduct further experiments regarding large scale exploitation of thyme oil as preservative of food commodities.

Acknowledgements

The authors are thankful to Professor Noury Benadji of the Botanical Laboratory, Biology Department, AbouBekr Belkaid University for the identification of the vegetable matter.

Authors' Contribution:

All authors contributed equally.

Financial Disclosure:

The authors declare that there are no conflicts of interest.

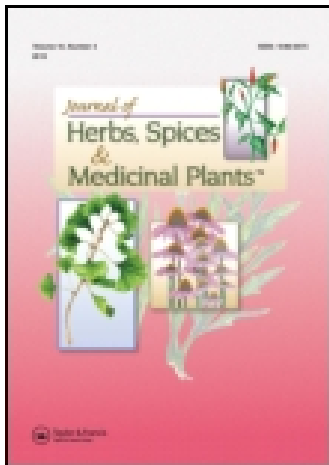
Funding/Support:

There is no financial support.

References

- Rojas TR, Sampayo CAF, Vázquez BI, Franco CM, Cepeda A. Study of interferences by several metabolites from *Aspergillus* spp. in the detection of aflatoxigenic strains in media added with cyclodextrin. *Food Control*. 2005;**16**(5):445-50.
- Agrios G. *Plant pathology*. 4th ed. San Diego: Academic Press; 1997.
- da Cruz Cabral L, Fernandez Pinto V, Patriarca A. Application of plant derived compounds to control fungal spoilage and mycotoxin production in foods. *Int J Food Microbiol*. 2013;**166**(1):1-14.
- Dorman HJ, Bachmayer O, Kosar M, Hiltunen R. Antioxidant properties of aqueous extracts from selected lamiaceae species grown in Turkey. *J Agric Food Chem*. 2004;**52**(4):762-70.
- Hsieh PC, Mau JL, Huang SH. Antimicrobial effect of various combinations of plant extracts. *Food Microbiol*. 2001;**18**(1):35-43.
- Shi J, Gong J, Liu J, Wu X, Zhang Y. Antioxidant capacity of extract from edible flowers of *Prunus mume* in China and its active components. *LWT-Food Sci Tech*. 2009;**42**(2):477-82.
- Reische D, Lillard D, Eintenmiller R. Antioxidants in food lipids. In: Ahoh C, Min D editors. *Chemistry, Nutrition and Biotechnology*. New York: Marcel Dekker; 1998. p. 423-48.
- Quezel P, Santa S, Schotter O. *Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales*. Paris. 1962.
- Sukumar K, Perich MJ, Boobar LR. Botanical derivatives in mosquito control: a review. *J Am Mosq Control Assoc*. 1991;**7**(2):210-37.
- Karousou R, Koureas DN, Kokkini S. Essential oil composition is related to the natural habitats: *Coridothymus capitatus* and *Satureja thymbra* in NATURA 2000 sites of Crete. *Phytochemistry*. 2005;**66**(22):2668-73.
- Miceli A, Negro C, Tommasi L. Essential oil variability in *Thymbra capitata* (L.) Cav. growing wild in Southern Apulia (Italy). *Biochem Syst Ecol*. 2006;**34**(6):528-35.
- El Mokhtar El Ouariachi JP, Bouyanzer A, Tomi P, Hammouti B, Salghi R, Majidi L, et al. Chemical composition and antioxidant activity of essential oils and solvent extracts of *Thymus capitatus* (L.) Hoffmanns and link from Morocco. *J Med Plant Res*. 2011;**24**:5773-8.
- Amouri MN, Akrouf A, Hajer El Jani S. Screening of Antiradical and Antibacterial Activities of Essential Oils of *Artemisia campestris* L., *Artemisia herba alba* Asso, & *Thymus capitatus* Hoff. Et Link. Growing Wild in the Southern of Tunisia. *Rec Res Sci Tech*. 2009;**2**(1):29-39.
- Cosentino S, Tuberoso CI, Pisano B, Satta M, Mascia V, Arzedi E, et al. In-vitro antimicrobial activity and chemical composition of Sardinian *Thymus* essential oils. *Lett Appl Microbiol*. 1999;**29**(2):130-5.
- Usai M, Foddai M, Sechi B, Juliano C, Marchetti M. Comparison of antibacterial activity of natural and hydroformylated essential oil of *Thymus capitatus* growing wild in north Sardinia with commercial *Thymus* essential oils. *Nat Prod Commun*. 2010;**5**(12):1985-9.
- Goren AC, Bilsel G, Bilsel M, Demir H, Kocabas EE. Analysis of essential oil of *Coridothymus capitatus* (L.) and its antibacterial and antifungal activity. *Z Naturforsch C*. 2003;**58**(9-10):687-90.
- Biondi D, Cianci P, Geraci C, Ruberto G, Piattelli M. Antimicrobial activity and chemical composition of essential oils from Sicilian aromatic plants. *Flavour Fragr J*. 1993;**8**(6):331-7.
- Bounatirou S, Smiti S, Miguel MG, Faleiro L, Rejeb MN, Neffati M, et al. Thermal stability of the essential oils isolated from Tunisian *Thymus capitatus* Hoff. et Link.: Effect on the chemical composition and the antioxidant and antibacterial activities. *Acta alimentaria*. 2010;**39**(3):299-307.
- Diri M, Özler MA, Kivrak I, Harmandar M, Duru ME. The Chemical Composition of Essential Oil and Antioxidant Activity of Various Extracts of *Coridothymus capitatus* (L.) Reichb. *Acta Hort*. 2009;**826**:357-62.
- Mkaddem MG, Romdhane M, Ibrahim H, Ennajar M, Lebrihi A, Mathieu F, et al. Essential oil of *Thymus capitatus* Hoff. et Link. from Matmata, Tunisia: gas chromatography-mass spectrometry analysis and antimicrobial and antioxidant activities. *J Med Food*. 2010;**13**(6):1500-4.
- Dorman HJ, Deans SG. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. *J Appl Microbiol*. 2000;**88**(2):308-16.
- Salah-Fatnassi KBH, Slim-Bannour A, Harzallah-Skhiri F, Mahjoub MA, Mighri Z, Chaumont JP, et al. In vitro antiviral and antioxidant activities of Tunisian *Thymus capitatus* (L.) Hoffmanns. & Link essential oils. *Acta Bot Gallica*. 2010;**157**(3):433-44.
- European Pharmacopoeia: Supplement*. Council of Europe; 1998.
- Barnett H, Hunter B. *Illustrated genera of imperfect fungi*. Minnesota: APS Press; 2006.
- Zambonelli A, d'Aulerio AZ, Bianchi A, Albasini A. Effects of Essential Oils on Phytopathogenic Fungi In Vitro. *J Phytopatol*. 1996;**144**(9-10):491-4.
- Bajpai VK, Rahman A, Kang SC. Chemical composition and anti-fungal properties of the essential oil and crude extracts of *Metasequoia glyptostroboides* Miki ex Hu. *Ind Crop Prod*. 2007;**26**(1):28-35.
- Pandey DK, Tripathi NN, Tripathi RD, Dixit SN. Fungitoxic and phytotoxic properties of the essential oil of *Hyptis suaveolens*. *J Plant Dis Plant Prot*. 1982;**89**:344-9.
- Hatano T, Kagawa H, Yasuhara T, Okuda T. Two new flavonoids and other constituents in licorice root: their relative astringency and radical scavenging effects. *Chem Pharm Bull (Tokyo)*. 1988;**36**(6):2090-7.
- Chew YL, Goh JK, Lim YY. Assessment of in vitro antioxidant ca-

- capacity and polyphenolic composition of selected medicinal herbs from Leguminosae family in Peninsular Malaysia. *Food Chem.* 2009;**116**(1):13-8.
30. Kruma Z, Andjelkovic M, Verhe R, Kreicbergs V, Karklina D, Venskutonis PR, et al., editors. Phenolic compounds in basil, oregano and thyme. *Proceedings of the 3rd Baltic Conference on Food Science and Technology. FOODBALT-2008.* 2008; Jelgava, Latvia. Latvia University of Agriculture, Faculty of Food Technology: p. 99-103.
31. Jabri-Karoui I, Bettaieb I, Msaada K, Hammami M, Marzouk B. Research on the phenolic compounds and antioxidant activities of Tunisian *Thymus capitatus*. *J Funct Food.* 2012;**4**(3):661-9.
32. Al-Mustafa AH, Al-Thunibat OY. Antioxidant activity of some Jordanian medicinal plants used traditionally for treatment of diabetes. *Pak J Biol Sci.* 2008;**11**(3):351-8.
33. Park BS, Choi WS, Kim JH, Kim KH, Lee SE. Monoterpenes from thyme (*Thymus vulgaris*) as potential mosquito repellents. *J Am Mosq Control Assoc.* 2005;**21**(1):80-3.
34. Pavela R, Vrchotova N, Triska J. Mosquitocidal activities of thyme oils (*Thymus vulgaris* L.) against *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae). *Parasitol Res.* 2009;**105**(5):1365-70.
35. Giordani R, Hadeif Y, Kaloustian J. Compositions and antifungal activities of essential oils of some Algerian aromatic plants. *Fito-terapia.* 2008;**79**(3):199-203.
36. Hazzit M, Baaliouamer A, Faleiro ML, Miguel MG. Composition of the essential oils of *Thymus* and *Origanum* species from Algeria and their antioxidant and antimicrobial activities. *J Agric Food Chem.* 2006;**54**(17):6314-21.
37. Hasan MDK, Kabir AKL, Mistry S. Chemical and Biological Investigation of Leaves of *Polygonum plebeju*. *S J Pharm Sci.* 2009;**2**:66-71.
38. Choi WS, Park BS, Ku SK, Lee SE. Repellent activities of essential oils and monoterpenes against *Culex pipiens pallens*. *J Am Mosq Control Assoc.* 2002;**18**(4):348-51.



Journal of Herbs, Spices & Medicinal Plants

Publication details, including instructions for authors and subscription information:

<http://www.tandfonline.com/loi/whsm20>

Fatty-Acid Composition and Antifungal Activity of Extracts of *Thymus capitatus*

Leila Tabti^a, Mohammed El Amine Dib^b, Nassira Gaouar Benyelles^a,
Nassim Djabou^b, Samira Bouayad Alam^a, Julien Paolini^c, Jean Costa^c
& Alain Muselli^c

^a Laboratoire d'Ecologie et Gestion des Ecosystèmes Naturels, Faculté des Sciences de la nature et de la vie, et des sciences de la terre et l'univers, Université de Tlemcen, Algérie

^b Département de Chimie, Laboratoire des Substances Naturelles et Bioactives (LASNABIO), Faculté des Sciences, Université de Tlemcen, Algérie

^c Université de Corse, UMR CNRS 6134, Laboratoire Chimie des Produits Naturels, Campus Grimaldi, Corte, France

Published online: 20 Aug 2014.

To cite this article: Leila Tabti, Mohammed El Amine Dib, Nassira Gaouar Benyelles, Nassim Djabou, Samira Bouayad Alam, Julien Paolini, Jean Costa & Alain Muselli (2015) Fatty-Acid Composition and Antifungal Activity of Extracts of *Thymus capitatus*, Journal of Herbs, Spices & Medicinal Plants, 21:2, 203-210, DOI: [10.1080/10496475.2014.941084](https://doi.org/10.1080/10496475.2014.941084)

To link to this article: <http://dx.doi.org/10.1080/10496475.2014.941084>

PLEASE SCROLL DOWN FOR ARTICLE

Taylor & Francis makes every effort to ensure the accuracy of all the information (the "Content") contained in the publications on our platform. However, Taylor & Francis, our agents, and our licensors make no representations or warranties whatsoever as to the accuracy, completeness, or suitability for any purpose of the Content. Any opinions and views expressed in this publication are the opinions and views of the authors, and are not the views of or endorsed by Taylor & Francis. The accuracy of the Content should not be relied upon and should be independently verified with primary sources of information. Taylor and Francis shall not be liable for any losses, actions, claims, proceedings, demands, costs, expenses, damages, and other liabilities whatsoever or howsoever caused arising directly or indirectly in connection with, in relation to or arising out of the use of the Content.

This article may be used for research, teaching, and private study purposes. Any substantial or systematic reproduction, redistribution, reselling, loan, sub-licensing, systematic supply, or distribution in any form to anyone is expressly forbidden. Terms & Conditions of access and use can be found at <http://www.tandfonline.com/page/terms-and-conditions>

Fatty-Acid Composition and Antifungal Activity of Extracts of *Thymus capitatus*

LEILA TABTI,¹ MOHAMMED EL AMINE DIB,² NASSIRA GAOUAR BENYELLES,¹ NASSIM DJABOU,² SAMIRA BOUAYAD ALAM,¹ JULIEN PAOLINI,³ JEAN COSTA,³ and ALAIN MUSELLI³

¹Laboratoire d'Ecologie et Gestion des Ecosystèmes Naturels, Faculté des Sciences de la nature et de la vie, et des sciences de la terre et l'univers, Université de Tlemcen, Algérie

²Département de Chimie, Laboratoire des Substances Naturelles et Bioactives (LASNABIO), Faculté des Sciences, Université de Tlemcen, Algérie

³Université de Corse, UMR CNRS 6134, Laboratoire Chimie des Produits Naturels, Campus Grimaldi, Corte, France

The aerial parts of Thymus capitatus were examined for fungicidal activities and analyzed for their fatty acids concentrations, using trans-esterification and gas chromatography mass spectroscopy analysis. Fifteen fatty acids were identified, accounting for 95.0 % of the lipid content. Two major fatty acids, α -linolenic (29.6 %) and linoleic (15.1 %), were found in abundance in the hexane extract. The effect of fatty acids and hexane extract on the growth of the plant pathogenic fungi isolated by citrus fruits—Aspergillus niger, Aspergillus oryza, Penicillium digitatum, and Fusarium solani—fungi were examined by in vitro studies. The fatty acids and hexane extract inhibited the mycelial growth of all strains tested.

KEYWORDS *fatty-acids, fungicidal activity, phytopathogens, Thymus capitatus*

INTRODUCTION

Aspergillus, *Fusarium*, and *Penicillium* species are responsible for food spoilage and decay of stored fruits damaged by insects, animals, early

Received January 6, 2014.

Address correspondence to Mohammed El Amine Dib, Département de Chimie, Laboratoire des Substances Naturelles et Bioactives (LASNABIO), Faculté des Sciences, Université de Tlemcen, BP 119, 13000, Tlemcen, Algérie. E-mail: a_dibdz@yahoo.fr

splits, and mechanical harvesting (26,28); they also synthesize hazardous mycotoxins that can be lethal, carcinogenic, mutagenic, teratogenic, or immunosuppressant or/and may mimic estrogens (15). *Thymus Capitatus* is used both for food and medicinal purposes throughout Algeria. It is a commonly used spice locally known as “zaâtar.” Previous studies have shown that *Thymus sp.* have strong antifungal, antibacterial, antioxidant, and insecticidal activities (9,10,20,27).

Environmental quality and pesticide resistance have dictated the need for alternative pest management techniques in field crops (25). Studies have demonstrated the antibacterial and antifungal activity of lauric acid, (5,6); linoleic acid against *Bacillus cereus* and *Staphylococcus aureus* (17,24); and linoleic acid and oleic acid against fourth instar *Aedes aegyptii larvae* (12,14). This study evaluated the antifungal properties of the fatty acids and hexane extract against phytopathogens that cause citrus rot including *Aspergillus niger*, *A. oryza*, *Penicillium digitatum*, and *Fusarium solani*.

MATERIAL AND METHODS

Plant Material

The aerial parts of *T. capitatus* were collected from Beni Snous forests near Tlemcen, Algeria in May 2011. The plant material was botanically identified by the Laboratory of Ecology and Ecosystem Management of University of Tlemcen, Algeria.

Preparation of the Extract

Boiling water extracts (100 mL) of plant samples (50 g) obtained under reflux conditions were extracted by liquid-liquid extraction with organic solvent (Hexane), three times (3×20 mL), filtered, concentrated under vacuum to obtain an extract in yields of 0.57 % (w/w), dried over anhydrous sodium sulfate, and then stored in sealed glass vials at 4° to 5°C prior to analysis.

Phytochemical Prospecting of the Plant Extracts

A small portion of the dry hexane extract was used for the phytochemical screening for the presence of flavonoids, alkaloids, coumarins, polyterpenoids, and steroids (13,16).

Extraction of Fatty Acids

Aerial parts of *T. capitatus* (100 g) were shaken in petroleum ether for 8 h and concentrated under reduced pressure to give 1.62 g (1.62 % w/w) of the

oil sample. Complete removal of solvents from the oil sample was achieved by passing a stream of nitrogen through it, and thereafter the oil was stored below 4°C before derivatization of its fatty acids. One gram of petroleum ether extract was saponified with 50 mL of methanolic potassium hydroxide solution (2 mol.L⁻¹) for 1 h under reflux. The soapy aqueous solution obtained previously was acidified (HCl 1N) until precipitation of fatty acids (pH 5–6). The free fatty acids were extracted with ether (3 × 50 mL) and dried on MgSO₄ and then weighed. Fatty acids were transformed into their methyl ester derivatives by the addition of a methanolic solution of BF₃ 10% (19). Then the fatty acids were extracted three times with 50 mL of hexane at room temperature. The organic layer was evaporated and dried on Na₂SO₄ and yielded 57% w/w of diethyl ether extract.

Gas Chromatography Analysis

Gas chromatography (GC) analyses were carried out using a Perkin-Elmer (Waltham, MA, USA) Autosystem XL GC apparatus equipped with a dual flame ionization detection system and a fused-silica capillary column (60 m × 0.22 mm I.D., film thickness 0.25 μm), Rtx-1 (polydimethylsiloxane). The oven temperature was programmed from 60°C to 230°C at 2°C.min⁻¹ and then held isothermally at 230°C for 35 min. Injector and detector temperatures were maintained at 280°C. Samples were injected in the split mode (1/50) using helium as the carrier gas (1 mL.min⁻¹); the injection volume was 0.2 μL. Retention indices of the compounds were determined using Perkin-Elmer software, and the relative concentrations were calculated based on GC peak areas without using correction factors.

Gas Chromatography Mass Spectrometry Analysis

Samples were analyzed with a Perkin-Elmer Turbo mass detector (quadrupole), coupled to a Perkin-Elmer Autosystem XL, equipped with fused-silica capillary columns Rtx-1 and Rtx-Wax (ion source temperature 150°C; energy ionization 70 eV). EI mass spectra were acquired over the mass range 35–350 Da (scan time: 1s). All GC conditions were as above with split 1/80.

Component Identification

The method used for identification of individual components was based on a comparison of calculated retention indices on an apolar column with those of either authentic compounds or literature data (21,22) and comparison of MS with those of authentic compounds.

Pathogenic Fungi

Four fungal isolates causing citrus rot—*A. niger*, *A. oryza*, *P. digitatum*, and *F. solani*—were isolated directly from rooted *Citrus sinensis* fruits from orchards of the El-Fhoul cooperative in Tlemcen (Algeria) and transferred to three sterilized replicates of 9-cm Petri dishes containing fresh potato dextrose agar medium (PDA: potato, 200; dextrose, 20 g; and agar, 15 gL⁻¹ in distilled water at 25°C) in the presence of lactic acid (25%) to stop the growth of bacteria. The plates were incubated at 25° ± 2°C for 8 d in darkness. The developing fungal colonies were purified and identified up to the species level by microscopic examination (4).

In vitro Antifungal Assay

The antifungal activity of fatty acids was tested using radial growth technique (3). Appropriate volumes of the fatty acids were added to PDA medium immediately before it was poured into the Petri dishes (9.0-cm diameter) at 40° to 45°C to obtain a series of concentrations (0.01–1.0 µg.mL⁻¹). Each concentration was tested in triplicate. The discs of mycelial felt (0.5-cm diameter) of the plant pathogenic fungi, taken from 8-day-old cultures on PDA plates, were transferred aseptically to the center of Petri dishes. Amphotericin B was used as reference fungicide. The treatments were incubated at 27°C in the dark. Colony growth diameter was measured after the fungal growth in the control treatments had completely covered the Petri dishes. Percentage of mycelial growth inhibition (I%) was calculated as:

$$(I\%) = [(DC-DT)/DC] \times 100 \quad (23);$$

where DC and DT are average diameters of fungal colony of control and treatment, respectively. The measurements were used to determine the minimum inhibitory concentration (MIC—the lowest concentration of fatty acids that will inhibit the visible growth of a microorganism after overnight incubation). The fungistatic-fungicidal nature of fatty acids was tested by observing the revival of growth of the inhibited mycelial disc following its transfer to non-treated PDA. A fungicidal effect was where there was no growth, and a fungistatic effect was where temporary inhibition of microbial growth occurred. Data were analyzed by one-way analysis of variance and the means compared by Dunnett's test ($p < 0.05$).

RESULTS

Phytochemical Screening

The hexane extracts tested positive for flavonoids, polyterpenoids, and steroids and negative for coumarins and alkaloids.

Fatty Acids Profile

The gas chromatography mass spectroscopy analysis of the lipid extracts had 15 fatty acids, accounting for 95.0% of the total acid fraction (Table 1). The extract was characterized by high content of α -linolenic (29.6%), palmitic (16.6%), linoleic (15.1%), and behenic acid (9.6%). Other compounds found included 1,2-benzendicarboxylic (3.9%), stearic (3.8%), arachidic (3.5%), and oleic acids (2.2%).

Antifungal Activity of Extracts

The data indicated antifungal activity on the mycelial growth of all strains tested (Table 2). The percentage inhibition increased with increasing quantity of fatty acids and hexane extract, suggesting a dose-dependent response (see Table 2). The fatty acids exhibited more pronounced activity for *F. solani*, *A. oryzae*, and *P. digitatum*, where the percentages of inhibition increased to 53.26, 63.96, and 73.13, respectively, at 0.1 mg.mL⁻¹, reaching a maximum of 100% at 0.5 mg.mL⁻¹. Thus these strains were the most sensitive to the fatty

TABLE 1 Fatty Acids Present in the Hexane Extracts of Aerial Parts of *Thymus capitatus*

N ^a	Acid components	IRIa ^b	RIa ^c	RIp ^d	Aerial parts ^e	Identification
1	Myristic (Tetradecanoic)	1707	1708	2000	0.5	RI, MS, Ref.
2	Pentadecanoic	1810	1808	2126	0.2	RI, MS, Ref.
3	Palmitic (Hexadecanoic)	1907	1910	2208	16.6	RI, MS, Ref.
4	Margaric (Heptadecanoic)	2011	2009	2309	0.2	RI, MS, Ref.
5	Linoleic ((Z,Z)-9,12-octadecadienoic)	2073	2073	2481	15.1	RI, MS, Ref.
6	α -Linolenic ((Z,Z,Z)-9,12,15-octadecatrienoic)	2078	2078	2549	29.6	RI, MS, Ref.
7	Oleic ((Z)-9-Octadecenoic)	2081	2081	2433	2.2	RI, MS, Ref.
8	(Z)-6-Octadecenoic	2104	2087	2437	0.9	RI, MS, Ref.
9	Stearic (Octadecanoic)	2113	2111	2414	3.8	RI, MS, Ref.
10	Nonadecanoic	2210	2210	2517	0.2	RI, MS, Ref.
11	Arachidic (Eicosanoic)	2311	2310	2622	3.5	RI, MS, Ref.
12	Heneicosanoic	2410	2411	2724	0.8	RI, MS, Ref.
13	1,2-Benzendicarboxylic	2500	2505	2884	3.9	RI, MS, Ref.
14	Behenic (Docosanoic)	2512	2513	2829	16.7	RI, MS, Ref.
15	Tricosanoic	2611	2613	2929	0.8	RI, MS, Ref.
Total identified					95.0	
Saturated fatty acids					43.3	
Unsaturated fatty acids					47.8	
Other					3.9	

RI, retention indices; MS, mass spectrometry in EI mode; Ref, compounds identified from literature data (16,17). ^aOrder of elution is given on apolar column (Rtx-1). ^bRetention indices of literature of corresponding esters on the apolar column (IRIa). ^cRetention indices of corresponding esters on the apolar Rtx-1 column (RIa). ^dRetention indices of corresponding esters on the polar Rtx-1 column (RIp). ^eRelative percentages (%) on apolar column (Rtx-1).

TABLE 2 Effects of Fatty Acids and Hexane Extract of *Thymus capitatus* on Mycelial Growth of Pathogenic Fungi from Citrus Rot

Extract Concentration (mg.mL ⁻¹)	Mycelial growth (%)			
	<i>Aspergillus niger</i>	<i>Aspergillus oryza</i>	<i>Penicillium digitatum</i>	<i>Fusarium solani</i>
Fatty acids				
0.1	15.23 ± 0.15	63.96 ± 0.36	73.13 ± 0.25	53.26 ± 0.12
0.5	33.33 ± 0.36	100.00 ± 0.01	100.00 ± 0.01	100.00 ± 0.01
Hexane				
0.1	57.14 ± 0.16	72.10 ± 0.56	70.00 ± 0.16	72.22 ± 0.22
0.5	71.42 ± 0.10	100.00 ± 0.01	90.00 ± 0.66	100.00 ± 0.01
1.2	90.11 ± 0.26	100.00 ± 0.01	100.00 ± 0.01	100.00 ± 0.01

Note: Data are mean ± SD.

acids, indicating that this quantity was the minimal inhibitory quantity (MIQ) of *T. capitatus* against *F. solani*, *A. oryzae*, and *P. digitatum* (see Table 2). *A. niger* showed some resistance to the fatty acids, and its action was moderate for both concentrations tested. Hexane extract of *T. capitatus* also exhibited antifungal activity against *F. solani*, *A. oryzae*, and *P. digitatum* fungus with an MIQ of 1.2 mg.mL⁻¹. On the other hand, the hexane extract had an effect at 1.2 mg.mL⁻¹ of 90.11% for *A. niger*, where the MIC against this fungal strain was >1.2 mg.mL⁻¹.

DISCUSSION

Results of this study showed antifungal activities of *T. capitatus* against the fungi causing citrus rot. Other studies showed that arachidonic acid (20:4), a polyunsaturated fatty acid, may increase antifungal susceptibility of biofilms formed by two closely related *Candida sp.* and could result in the reduction of the dose of the antimycotic agent required to inhibit biofilm formation and that linoleic acid (18:2), a polyunsaturated fatty acid, was antifungal against several plant pathogenic fungi (18). Avis (2) also showed that antifungal compounds targeting fungal membranes were prone to pathogen resistance that would shorten their effective life span, but the synergism of these compounds with antifungal fatty acids could provide prolonged usage (9,11). The results are supported by previous reports of insecticidal activity of linoleic acid and oleic acid against fourth instar *Aedes aegyptii* larvae (24).

Additional health benefits may be achieved from *Thymus capitatus* due to the presence of flavonoids and polyterpenoids, which demonstrated anti-inflammatory, antifungal, and antioxidant properties (3,9,16), and the essential fatty acids linolenic and linoleic acids implicated in human health promotion (1,2,7,8).

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors are grateful to Prof. Noury Benabadji (Botanical Laboratory, Biology Department, Aboubekr Belkaïd University) for the identification of the vegetable matter.

FUNDING

The authors are indebted to the Agence Universitaire de la Francophonie for providing a research grant of Nassim Djabou, and the Ministère des Affaires Étrangères et Européennes throughout the research program “Partenariat Hubert Curien Tassili.”

REFERENCES

1. Anderson, B. M., and D. W. L. Ma. 2009. Are all n-3 polyunsaturated fatty acids created equal? *Lipids. In Health and Disease* 8:8–33.
2. Avis, T. J. 2007. Antifungal compounds that target fungal membrane: Application in plant disease control. *Can. J. Plant Pathol.* 29:323–329.
3. Bajpai, V. K., A. Rahman, and S. C. Kang. 2007. Chemical composition and anti-fungal properties of the essential oil and crude extracts of *Metasequoia glyptostroboides* Miki ex Hu, Ind. *Crops Prod.* 26:28–5.
4. Barnett, H. L., and B. B. Hunter. 1972. Illustrated genera of imperfect fungi. In H. L. Barnett and B. B. Hunter, eds. *Illustrated Genera of Imperfect Fungi*. 4th ed. The American Phytopathological Society Press, St. Paul, MN.
5. Bergsson, G., J. Arnfinnsson, O. Steingrímsson, and H. Thormar. 2001. *In vitro* killing of *Candida albicans* by fatty acids and monoglycerides. *Antimicrob. Agents Chemother.* 45:3209–3212.
6. Dawson, P. L., G. D. Carl, J. C. Acton, and I. Y. Han. 2002. Effect of lauric acid and nicin impregnated soy based films on the growth of *Listeria monocytogenes* on turkey bologna. *Poultry Sci.* 81:721–726.
7. De Caterina, R. 2011. n-3 Fatty acids in cardiovascular disease. *N. Engl. J. Med.* 364:2439–2450.
8. DeLany, J. P., M. M. Windhauser, C. M. Champagne, and G. A. Bray. 2000. Differential oxidation of individual dietary fatty acids in humans. *Am. J. Clin. Nutr.* 72:905–911.
9. Dob, T., D. Dahmane, T. Benabdelkader, and C. Chelghoum. 2006. Studies on the essential oil composition and antimicrobial activity of *Thymus algeriensis* Boiss. et Reut. *Inter. J. Aromather.* 16:95–100.
10. Essawi, T., and M. Srour. 2000. Screening of some Palestinian medicinal plants for antibacterial activity. *J. Ethnopharmacol.* 70:343–349.
11. Gonzalez, C. F., E. M. Provin, L. Zhu, and D. J. Ebbole. 2002. Independent and synergistic activity of synthetic peptides against thiabendazole-resistant *Fusarium sambucinum*. *Phytopathology* 92:917–924.

12. Hamberg, M. 1999. An epoxy alcohol synthase pathway in higher plants: Biosynthesis of antifungal trihydroxy oxylipins in leaves of potato. *Lipids* 34:1131–1142.
13. Harborn, J. B. 1998. *Phytochemical Methods. A Guide to Modern Techniques of Plant Analysis*. Chapman & Hall, London. 302 pp.
14. Kato, T., Y. Yamaguchi, N. Abe, T. Uychara, T. Namai, M. Komada, and Y. Shiobara. 1985. Structures and synthesis of unsaturated trihydroxy C₁₈ fatty acids in rice plant suffering from rice blast disease. *Tetrah Lett.* 26:2357–2360.
15. Klich, M. A., and Pitt, J. I., 2009. Differentiation of *Aspergillus flavus* from *Aspergillus parasiticus* and other closely related species. *Trans Brit Myco Soc. Mycologia*.
16. Kumar, A., R. Ilavarasan, T. Jayachandran, M. Decaraman, P. Aravindhan, N. Padmanabhan, and M. R. V. Krishnan. 2009. Phytochemical investigation on a tropical plant, *Syzygium cumini* from Kattuppalayam, Erode District, Tamil Nadu, South India. *Pak. J. Nutr.* 8(1):83–85.
17. Lee, J. Y., Y. S. Kim, and D. H. Shin. 2002. Antimicrobial synergistic effect of linolenic acid and monoglyceride against *Bacillus cereus* and *Staphylococcus aureus*. *J. Ag. Food Chem.* 50:2193–2199.
18. Liu, S., R. Weibin, L. Jing, X. Hua, W. Jingan, G. Yubao, and W. Jingguo. 2008. Biological control of phytopathogenic fungi by fatty acids. *Mycopathologia* 166:93–102.
19. Metcalfe, L. D., and A. A. Schmitz. 1961. Rapid preparation of fatty acid esters for gas chromatography analysis. *Anal. Chem.* 33:363–364.
20. Miura Nakatani, N. 1989. Antioxidative activity of flavonoids from thyme (*Thymus vulgaris* L). *Agric. Biol. Chem.* 53:3043–3045.
21. National Institute of Standards and Technology. 2008. *NIST Chemistry WebBook, NIST Standard Reference Database*. Author, Gaithersburg, MD.
22. National Institute of Standards and Technology. 1999. *NIST/EPA/NIH Mass Spectra Library*, PC Version 1.7. Perkin-Elmer Corp, Norwalk, CT.
23. Pandey, D. K., N. N. Tripathi, R. D. Tripathi, and S. N. Z. Dixit. 1982. Fungitoxic and phytotoxic properties of essential oil of *Hyptis suaveolens*. *PflKrankh PflSchutz.* 89:344–349.
24. Ramsewak, R. S., M. G. Nair, S. Murugesan, W. J. Mattson, and J. Zasada. 2001. Insecticidal fatty acids and triglycerides from *Dirca palustris*. *J. Ag Food Chem.* 49:5852–5856.
25. Reuveni, R., and M. Reuveni. 1998. Foliar fertilizer therapy—A concept in integrated pest management. *Crop Prot.* 17:111–118.
26. Rojas, T. R., C. A. F. Sampayo, B. I. Vázquez, C. M. Franco, and A. Cepada. 2005. Study of interferences by several metabolites from *Aspergillus* spp. in the detection of aflatoxigenic strains in media added with cyclodextrin. *Food Control* 16:445–450.
27. Sukumar, K., M. J. Perich, and L. R. Boobar. 1991. Botanical derivatives in mosquito control: A review. *J. Am. Mosq. Control Assoc.* 7:210–237.
28. Velmurugan, S., K. Raman, V. Thanga Viji, M. B. S. Donio, J. Adlin Jenifer, M. M. Babu, and T. Citrarasu. 2013. Screening and characterization of antimicrobial secondary metabolites from *Halomonas salifodinae* MPM-TC and its in vivo antiviral influence on Indian white shrimp *Fenneropenaeus indicus* against WSSV challenge. *J. King Saud Univ. Sci.* 25:181–190.

¹Laboratoire d'Ecologie et Gestion des Ecosystèmes Naturels, Faculté des Sciences de la nature et de la vie, et des sciences de la terre et l'univers

²Laboratoire des Substances Naturelles et Bioactives (LASNABIO) Département de Chimie, Faculté des Sciences, Université de Tlemcen, Algérie

³Université de Corse, UMR CNRS 6134, Laboratoire Chimie des Produits Naturels, Campus Grimaldi, Corte, France

Antifungal activity of essential oils of three aromatic plants from western Algeria against five fungal pathogens of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill)

S. Bouayad Alam¹, N. Gaouar Benyelles¹, M. El Amine Dib^{2*}, N. Djabou², L. Tabti¹, J. Paolini³, A. Muselli³, J. Costa³

(Received December 9, 2013)

Summary

The antifungal effect of the essential oils from *Thymus capitatus* L., *Daucus crinitus* Desf. and *Tetraclinis articulate* Vahl., aerial parts was evaluated in vitro against five phytopathogenic fungi of tomato (*Fusarium oxysporum*, *Alternaria solani*, *Aspergillus niger*, *Penicillium sp1* and *Penicillium sp2*). Our results showed that among the three plant species tested, *T. capitatus* oil was the most potent antifungal against the fungi (inhibition of mycelial growth of 100 % at a concentration of 2 µg mL⁻¹). Furthermore, the essential oil of *T. articulata* was also effective against *F. oxysporum*, *A. solani*, *A. niger*, *Penicillium sp1* and *Penicillium sp2* with an inhibition of mycelial growth greater than 57 % at a concentration of 5 µg mL⁻¹. *D. crinitus* essential oil was less effective. *T. capitatus* essential oil was dominated by carvacrol (69.6 %) and p-cymene (12.4 %). The isochavicol isobutyrate (44.9 %) and isochavicol 2-methylbutyrate (9.7 %) were the major compounds in *D. crinitus* essential oil, while the most abundant compounds in *T. articulata* were α-pinene (32.0 %), cedrol (11.0 %) and 3-carene (9.6 %). The plant essential oils were found to be an effective antifungal against mycelial growth and, therefore, can be exploited as an ideal treatment against disease rot of tomato or as a new potential source of natural additives for the food and/or pharmaceutical industries.

Introduction

Tomato (*Lycopersicon esculentum*) is an important commercial crop in the world. Nutritional values of tomato make it a widely accepted vegetable by consumers. Nevertheless, tomato is a very perishable vegetable with a short shelf-life and high susceptibility to fungal disease. Tomatoes are among the most popular fruits grown in Algeria. They are of an excellent quality and are greatly appreciated for their nutritional value. Furthermore, tomato production represents an important agricultural and economic activity in the country. The growing awareness of consumers concerning the relation between food and health is revolutionizing the food industry. Fungal pathogens are mainly responsible for the decay of fruits and vegetables during the postharvest period (PATHAK, 1997). *Aspergillus*, *Fusarium* and *Penicillium* are responsible for spoilage of many foods and causes decay on stored fruits damaged by insects, animals, early splits, and mechanical harvesting. Apart from causing diseases in plants, many species of *Aspergillus*, *Penicillium* and *Alternaria* can also synthesize mycotoxins (AGRIOS, 1997; ROJAS et al., 2005). Considerable interest has developed on the preservation of foods by the use of essential oils to effectively retard growth and mycotoxin production. Essential oils and their main components possess a wide spectrum of biological activity, which may be of great importance in several fields, from food chemistry to pharmacology and pharmaceuticals (CRISTANI, 2007). The main aim of this work was to evaluate the antifungal properties of the essential oils of *T. capitatus*,

D. crinitus and *T. articulata* against phytopathogens that cause severe diseases in tomato, such as *F. oxysporum*, *A. solani*, *A. niger*, *Penicillium sp1* and *Penicillium sp2*.

Materials and methods

Plant materials and essential oils extraction

Aerial parts of *D. crinitus* were collected in Bensekrane forest area (Tlemcen Province) at the flowering stage, in June 2011. The oil yield was 0.37 % (w/w). *T. capitatus* aerial parts were collected from Beni snous in Tlemcen city at the flowering stage, during June 2011 and yielded 0.52 % (w/w). *T. articulata* aerial parts were collected from Oujlida region, Tlemcen Province during June 2011 and yielded 0.31 % (w/w). The plant species were stored at -18 °C after harvest. A portion (550-600 g) of material from each plant species was subjected to a Clevenger-type apparatus according to the European Pharmacopoeia (EUROPEAN PHARMACOPOEIA, 2004). The essential oils were dried over anhydrous sodium sulfate and, after filtration, stored in sterilized amber vials at 4 °C until it was used.

Gas chromatography

Analyses were carried out using a Perkin Elmer Clarus 600 GC apparatus equipped with a dual flame ionization detection system and 2 fused-silica capillary columns (60 m x 0.22 mm I.D., film thickness 0.25 µm), Rtx-1 (polydimethylsiloxane) and Rtx-Wax (polyethylene glycol). 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. Injector and detector temperatures were maintained at 280 °C. Essential oils were injected in the split mode (1/50), using helium as the carrier gas (1 mL/min); the injection volume was 0.2 µL. Retention indices (RI) of the compounds were determined from Perkin-Elmer software.

Gas chromatography-mass spectrometry

Essential oils were analyzed with a Perkin-Elmer TurboMass quadrupole analyzer, coupled to a Perkin-Elmer Autosystem XL, equipped with 2 fused-silica capillary columns and operated with the same GC conditions described above, except for a split of 1/80. Electronic Impact (EI) mass spectra were acquired under the following conditions: Ion source temperature 150 °C, energy ionization 70 eV, mass range 35-350 Da (scan time: 1 s).

Component identification

The identification of the components was based on a comparison: (i) between the calculated retention indices on the polar (RI p) and apolar (RI a) columns with those of pure standard authentic compounds and literature data (JENNINGS and SHIBAMOTO, 1980; KÖNIG et al., 2001; NATIONAL INSTITUTE OF STANDARDS AND TECHNOLOGY,

* Corresponding author

2008); and (ii) of the mass spectra with those of our own library of authentic compounds and with those of a commercial library (MC LAFFERTY and STAUFFER, 1994; MC LAFFERTY and STAUFFER, 1988; NATIONAL INSTITUTE OF STANDARDS AND TECHNOLOGY, 1999).

Component quantification

Quantification of the essential oil components was carried out using the methodology reported by COSTA et al. (2008), and modified as follows. The response factor (RF) of 29 standard compounds grouped into 7 chemical groups (monoterpene hydrocarbons, sesquiterpene hydrocarbons, alcohols, ketones, aldehydes, esters, and others) was measured using GC (ZNINI et al., 2011). RFs and calibration curves were determined by diluting each standard in hexane at 5 concentrations, containing tridecane (final concentration = 0.7 g/100 g) as an internal standard. Analysis of each standard was performed in triplicate. For the quantification of the essential oil components, tridecane (0.2 g/100 g) was added as internal standard to the essential oil. The correction factor (average of the response factors from standards) of each chemical group was calculated and used to determine the essential oil component concentration (g/100 g) according to the chemical group.

Pathogenic fungi

Fusarium oxysporum, *Alternaria solani*, *Aspergillus niger*, *Penicillium sp1* and *Penicillium sp2* were isolated from naturally decayed tomato after storage of several weeks. These isolates were the most aggressive one in our collection and produced the largest lesions on inoculated fruit. A pure culture of these fungus were maintained on potato dextrose agar medium (PDA: potato 200, dextrose 20 g and agar 15 gL⁻¹ in distilled water at 25 °C) in the presence of a quantity of lactic acid (25 %) for stop the growth of bacteria. The plates were incubated at 25 ± 2 °C for 8 days and darkness. The developing fungal colonies were purified and identified up to the species level by microscopic examination through the help of the following references (BARNETT and HUNTER, 2006).

In vitro antifungal assay

The antifungal activity of the three essential oils was tested using radial growth technique (BAJPAI et al., 2007). Appropriate volumes of the stock solutions of the oils in dimethyl sulfoxide (DMSO) were added to PDA medium immediately before it was poured into the Petri dishes (9.0 cm diameter) at 40-45 °C to obtain two concentrations (2.0 and 5.0 µg mL⁻¹). Each concentration was tested in triplicate. Parallel controls were maintained with DMSO mixed with PDA. The discs of mycelial felt (0.5 cm diameter) of the plant pathogenic fungi, taken from 8-day-old cultures on PDA plates, were transferred aseptically to the centre of Petri dishes. Carbendazim was used as reference fungicide. The treatments were incubated at 27 °C in the dark. Colony growth diameter was measured after the fungal growth in the control treatments had completely covered the Petri dishes. Percentage of mycelial growth inhibition was calculated from the

formula: $(I\%) = [(DC-DT)/DC] \times 100$ (PANDEY et al., 1982);

where DC and DT are average diameters of fungal colony of control and treatment, respectively.

Statistical Analysis

The inhibitory effect of essential oils on mycelial growth was expressed as mean ± standard error of mean (S.E.M.) and analyzed for ANOVA and post hoc Dunnet's t-test. The separation of means

was done by using the least significant difference test at $p < 0.05$. Analysis of each test was performed in triplicate.

Results

Essential oils composition

A total of 26 components accounting to 99.5 % of the essential oil composition of *T. capitatus* were identified by comparison of their EI-mass spectra and their retention indices (RI) with those of our own authentic compound library (Tab. 1). The essential oil was highly dominated by oxygenated compounds (87.1%) with high amount of aromatic terpenic components (82.6 %). However, hydrocarbons appeared also in appreciable proportion (12.4%) which monoterpene hydrocarbons are well represented (10.7 %). Indeed, the main constituents of essential oil were carvacrol (69.6 %), p-cymene (12.4 %) followed by γ -terpinene (4.3 %), myrcene (2.1 %), α -terpinene (1.7 %), linalool (1.7 %) and terpinen-4-ol (1.1 %). These results were in accordance with those previously reported in literature (AMARTI et al., 2008; BOUNATIROU et al., 2007; RUBERTO et al., 2000; TAWAHA and HUDAIB, 2012). Other hand, various chemical profiles of essential oils (thymol, cavacrol or thymol/carvacrol as main components) have been reported according to geographical origins of *T. capitatus* (KAROUSO et al., 2005; MICELI et al., 2006). The analysis of the essential oil from the aerial parts of *D. crinitus* harvested in the forest of Bensekrane (Tlemcen) identified 30 components, which accounted for 91.3 % of the total composition. Their retention indices and relative percentages are shown in Tab. 1. The main components of the aerial parts oil were phenylpropanoids isochavicol esters, principally the isochavicol isobutyrate (44.9 %). The other major components identified were: isochavicol 2-methylbutyrate (9.7 %), pentadecane (5.1 %) and undecane (4.1 %) (Tab. 1). This result is in according with literature data (LANFRANCHI et al., 2010).

A total of 54 components accounting for 95.9 % of the total oil of *T. articulata* were identified (Tab. 1). The essential oils was highly dominated by the monoterpene hydrocarbons (63.8 %) followed by oxygenated sesquiterpenes (14.7 %) and sesquiterpene hydrocarbons (10.5 %). However, the oxygenated monoterpenes appeared in small proportion (6.4 %). The most abundant compounds were α -pinene (32.0 %), cedrol (11.0 %), 3-carene (9.6 %), limonene (4.3 %), sabinene (4.3 %) and (E)- β -caryophyllene (4.0 %). BEN JEMIA et al. (2013) have isolated and identified, by GC-MS, 66 constituents, the major constituents of the oil are: bornyl acetate (31.4 %), α -pinene (24.5 %) and camphor (20.3 %). while TOUMI et al. (2011) have identified, by GC/MS, more 45 compounds, with camphor(23.4-31.6 %), bornyl acetate (17.1-25.8 %), borneol (6.6-14.3 %), limonene (3.70-10.1 %) and α -pinene (6.5-11.3 %) were the major components of *T. articulata* essential oil. It was observed that the percentage of α -pinene (19.8-24.9 %) and bornyl acetate (40.2-59.2 %) for the leaves oils from two different sites in Algeria were the major constituents (CHIKHOUNE et al., 2013). In addition, the percentage of cedrol and 3-carene found in our essential oil was higher than cedrol and 3-carene in previous studies. Generally, the quality and quantity of components available in essential oils may be affected by several factors, such as plant genotype, geographical condition, season, and agronomic condition (GUMUS et al., 2010).

Antifungal activity of three essential oils against the development of fungi of tomato

The data presented in Tab. 2 show the antifungal activity of 3 plant species, belonging to 3 botanical families (Lamiaceae, Apiaceae and Cupressaceae), against *F. oxysporum*, *A. solani*, *A. niger*, *Penicillium sp1* and *Penicillium sp2*. The effect of plant essential oils varied according to plant species. Indeed, 2 plant species out of 3 reduced

Tab. 1: Chemical compositions of aerial parts essential oils of *T. capitatus*, *D. crinitus* and *T. articulate*.

No. ^a	Components	RI _a ^b	RI _a ^c	RI _p ^d	<i>T. capitatus</i>	<i>D. crinitus</i>	<i>T. articulate</i>	Identification ^e
	Nonane	906	902	907	-	0.6	-	RI, MS
	α -Thujene	932	924	1028	0.2	-	tr	RI, MS
	α-Pinene	936	931	1028	0.9	0.5	32.0	RI, MS
	α -Fenchene	941	943	1039	-	-	0.6	RI, MS
	Camphene	950	945	1071	0.2	-	0.3	RI, MS
	Oct-1-en-3-ol	962	962	1441	0.5	-	-	RI, MS
	Sabinene	973	967	1122	-	0.6	4.3	RI, MS
	β -Pinene	978	972	1113	0.1	0.1	1.4	RI, MS
	Myrcene	987	982	1160	2.1	0.6	3.3	RI, MS
	α -Phellandrene	1002	999	1161	0.2	-	1.5	RI, MS
	3-Carene	1005	1006	1149	0.1	-	9.6	RI, MS
	α -Terpinene	1008	1011	1270	1.7	-	-	RI, MS
	p-Cymene	1015	1015	1270	12.4	0.2	0.5	RI, MS
	Limonene	1025	1023	1201	-	0.9	4.3	RI, MS
	β -Phellandrene	1023	1023	1209	-	-	1.4	RI, MS
	(E)- β -Ocimene	1041	1037	1247	-	0.6	0.7	RI, MS
	(Z)- β -Ocimene	1029	1022	1234	0.6	-	-	RI, MS
	γ -Terpinene	1051	1050	1245	4.3	1.6	0.7	RI, MS
	(E)-Sabinene hydrate	1051	1054	1445	0.1	-	0.2	RI, MS
	Nonanal	1076	1074	1403	-	0.1	-	RI, MS
	Terpinolene	1082	1079	1281	0.2	0.4	3.2	RI, MS
	(Z)-Sabinene hydrate	1087	1084	1537	-	-	0.8	RI, MS
	Linalool	1083	1085	1538	1.7	0.2	0.2	RI, MS
	Undecane	1100	1098	1101	-	4.1	-	RI, MS
	3-Octyl acetate	1113	1107	1330	-	-	0.2	RI, MS
	Veratol	1112	1113	1713	-	-	0.1	RI, MS
	Camphor	1123	1124	1506	0.1	-	-	RI, MS
	(Z)-Verbenol	1027	1128	1642	-	-	0.3	RI, MS
	Isoborneol	1143	1144	1670	0.5	-	-	RI, MS
	Borneol	1148	1150	1688	0.3	-	-	RI, MS
	Terpinen-4-ol	1164	1162	1591	1.1	0.1	2.0	RI, MS
	α -Terpineol	1176	1176	1690	0.1	-	0.1	RI, MS
	Octyl acetate	1188	1187	1460	-	2.3	-	RI, MS
	Decanal	1188	1187	1483	-	1.4	-	RI, MS
	Linalyl acetate	1239	1239	1552	-	-	0.2	RI, MS
	Decanol	1263	1259	1729	-	0.1	-	RI, MS
	Nonanoic acid	1263	1263	2119	-	0.1	-	RI, MS
	(E)-Anethole	1264	1261	1815	-	-	0.1	RI, MS
	Thymol	1266	1263	2181	0.6	-	-	RI, MS
	Bornyl acetate	1269	1269	1562	-	-	0.7	RI, MS
	Carvacrol	1278	1286	2193	69.6	-	-	RI, MS
	Eugenol	1330	1329	2164	0.1	-	-	RI, MS
	α -Terpinyl acetate	1335	1333	1686	-	-	1.8	RI, MS
	(E)-Myrtanyl acetate	1366	1370	1479	-	-	0.1	RI, MS
	β -Bourbonene	1386	1384	1518	-	-	0.1	RI, MS
	β -Elemene	1389	1386	1584	-	-	0.2	RI, MS
	Dodecanal	1389	1389	1695	-	3.1	-	RI, MS

No. ^a	Components	RI _a ^b	RI _a ^c	RI _p ^d	<i>T. capitatus</i>	<i>D. crinitus</i>	<i>T. articulata</i>	Identification ^e
	β-Funebrene	1419	1411	1591	-	-	1.6	RI, MS
	(E)-β-Caryophyllene	1421	1416	1591	1.6	0.6	4.0	RI, MS
	Thujopsene	1435	1427	1614	-	-	0.2	RI, MS
	α-Humulene	1455	1448	1668	0.1	-	2.5	RI, MS
	α-Acoradiene	1444	1455	1616	-	-	0.1	RI, MS
	β-Acoradiene	1458	1459	1642	-	-	0.1	RI, MS
	Alloaromadendrene	1462	1461	1630	-	-	0.1	RI, MS
	γ-Curcumene	1475	1471	1680	-	-	0.3	RI, MS
	Germacrene D	1479	1474	1700	-	-	1.3	RI, MS
	β-Selinene	1482	1480	1703	-	-	0.1	RI, MS
	γ-Humulene	1483	1480	1702	-	0.7	-	RI, MS
	Pentadecane	1500	1497	1502	-	5.1	-	RI, MS
	δ-Cadinene	1520	1511	1760	-	0.1	0.3	RI, MS
	β-Elemol	1535	1533	2063	-	-	0.4	RI, MS
	Isochavicol isobutyrate	1546	1541	2134	-	44.9	-	RI, MS
	Dodecanoic acid	1554	1560	2474	-	1.1	-	RI, MS, ref
	Caryophyllene oxide	1578	1567	1969	0.1	-	0.4	RI, MS
	Dodecyl acetate	1585	1580	1882	-	2.5	-	RI, MS, ref
	Globulol	1589	1577	2085	-	-	0.9	RI, MS
	Cedrol	1595	1591	2101	-	-	11.0	RI, MS
	Humulene epoxide II	1602	1599	2044	-	-	0.1	RI, MS
	epi-Cedrol	1613	1614	2141	-	-	0.2	RI, MS
	α-Acorenol	1623	1617	2106	-	-	0.3	RI, MS
	γ-Eudesmol	1619	1624	2198	-	-	0.1	RI, MS
	τ-Cadinol	1633	1632	2146	-	-	0.2	RI, MS
	α-Eudesmol	1632	1636	2211	-	-	0.3	RI, MS
	Isochavicol 2-methyl butyrate	1651	1648	2255	-	9.7	-	RI, MS
	Bulnesol	1665	1664	2198	-	-	0.2	RI, MS
	Heptadecane	1700	1703	1699	-	3.4	-	RI, MS
	Tetradecanoic acid	1761	1756	2649	-	3.1	-	RI, MS, ref
	Cedryl acetate	1764	1750	2160	-	-	0.6	RI, MS
	Neophytadiene	1807	1807	1918	-	0.4	-	RI, MS, ref
	Hexadecanoic acid	1951	1949	2916	-	1.1	-	RI, MS
	Manool	2070	2109	2684	-	-	0.3	RI, MS
	(E)-Phytol	2114	2102	2620	-	1.7	-	RI, MS
	Total identification %				99.5	92.0	96.5	
	% Hydrocarbon compounds				12.4	20.5	74.5	
	% Monoterpene hydrocarbons				10.7	5.5	63.8	
	% Sesquiterpene hydrocarbons				1.7	1.4	10.7	
	% Non terpenic hydrocarbon compounds				-	13.2	-	
	% Diterpenes hydrocarbons				-	0.4	-	
	% Oxygenated compounds				87.1	71.5	22.0	
	% Oxygenated monoterpenes				3.8	0.3	6.5	
	% Oxygenated sesquiterpenes				0.1	-	14.7	
	% Non terpenic oxygenated compounds				0.5	14.9	0.2	
	% Aromatic compounds				82.6	-	0.1	
	% Phenylpropanoids				0.1	54.6	-	
	% Oxygenated diterpenes				-	1.7	0.5	

^a Order of elution is given on apolar column (Rtx-1), ^b Retention indices on the apolar Rtx-1 column (RI_a), ^c Retention indices on the polar Rtx-Wax column (RI_p), ^d Retention indices on the polar Rtx-Wax column (RI_p), ^e RI: Retention Indices; MS: Mass Spectrometry in EI mod.

Tab. 2: Percentage of inhibition of mycelial growth at various volumes of essential oils.

Incubation	<i>F. oxysporum</i> 25°C ± 2	<i>A. solani</i> 25°C ± 2	<i>A. niger</i> 25°C ± 2	<i>Penicillium</i> sp1 25°C ± 2	<i>Penicillium</i> sp2 25°C ± 2
Essential oil (2 µg mL ⁻¹)					
<i>T. capitatus</i>	100 ± 0.00	100 ± 0.00	100 ± 0.00	100 ± 0.00	100 ± 0.00
<i>T. articulata</i>	36.11 ± 0.08	35.12 ± 0.01	11.11 ± 0.11	34.56 ± 0.02	45.12 ± 0.06
<i>D. crinitus</i>	-	-	-	-	54.32 ± 0.21
Essential oil (5 µg mL ⁻¹)					
<i>T. articulata</i>	72.22 ± 0.06	70.12 ± 0.20	57.77 ± 0.11	64.44 ± 0.12	84.44 ± 0.08
<i>D. crinitus</i>	-	-	-	5.55 ± 0.21	77.77 ± 0.06

mycelial growth of *F. oxysporum*, *A. solani*, *A. niger*, *Penicillium* sp1 and *Penicillium* sp2 by more than 50 %. Among these plants *T. capitatus*, belonging to the families of Lamiaceae, completely inhibited mycelial growth of tested fungus. *T. capitatus* essential oil produced the greatest reduction in mycelium growth with these fungi at 2 µg mL⁻¹, with percentage reductions of 100 % (Tab. 2). The second most effective essential oil with this five fungi was *T. articulata* essential oil, with percentage of mycelial reduction in *F. oxysporum*, *A. solani*, *A. niger*, *penicillium* sp1 and *penicillium* sp2 of 36.11, 35.12, 11.11, 34.56 and 45.12 %, respectively, at the same concentration (Tab. 2). However, the data indicate that the percentage inhibition of mycelial growth increased with increasing concentration of essential oils for all strains tested, suggesting that the essential oil of *T. articulata* inhibited the growth of all strains in a dose-dependent manner. Essential oil *D. crinitus* cause no percentage of mycelial reduction, except against *penicillium* sp2. This activity was more pronounced, where the percentage of inhibition increased to 54.32 % at 2 µg mL⁻¹, reaching a maximum of 77.77 % at 5 µg mL⁻¹, suggesting that this strain was the most sensitive to the essential oil (Tab. 2).

Discussion

In this study, the antifungal activity of essential oils of three plant species was evaluated against *F. oxysporum*, *A. solani*, *A. niger*, *Penicillium* sp1 and *Penicillium* sp2. The mycelial growth of colonies in the presence of the essential oil of *T. capitatus* and *T. articulata* showed that it effectively controlled all the fungi tested. The mycelial growth of colonies in the presence of the essential oil of *T. capitatus* and *T. articulata* showed that it effectively controlled all the fungi tested. This efficiency can be explained by the presence of active molecules that inhibited the growth of the five phytopathogenic fungi. This activity may be produced by a single major compound or by the synergistic or antagonistic effect of various compounds (DEBA et al., 2008). Several authors have attributed the antifungal capacity of plant essential oils to the presence of components such as phenolic and terpene compounds (BEUCHAT, 1994; DAVIDSON, 1997; NYCHAS, 1995) indicated that mycelial growth inhibition is caused by the monoterpenes present in essential oils. These components would increase the concentration of lipidic peroxides such as hydroxyl, alkoxy and alko peroxyl radicals and so bring about cell death. However, the influence of essential oil or bioactive compounds on flavor and aroma of tomato was not investigated and further work should be conducted to purpose the use efficiency of oil components in real applications such as fumigant. In conclusion, this paper is a part of an overall study that aims to determine the antifungal activities of natural floral resources of Algeria, in order to find new bioactive natural products. The essential oils of these plants

studied, exhibited an interesting antifungal activity against mycelial growth. Further work is necessary to explore the efficacy of these essential oils against disease rot of tomato and to exploit these oils as a new potential source of natural additives for the food and/or pharmaceutical industries.

Acknowledgements

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

References

- AGRIOS, G., 1997: Plant pathology. 4th Ed., Academic Press, San Diego.
- AMARTI, F., SATRANI, B., AAFI, A., GHANMI, M., FARAH, A., ABERCHANE, M., EL AJJOURI, M., EL ANTRY, S., CHAOUCH, A., 2008: Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oils of Moroccan *Thymus capitatus* and *Thymus bleicherianus*. *Phytothérapie* 6, 342-347.
- BAJPAI, V.K., RAHMAN, A., KANG, S.C., 2007: Chemical composition and anti-fungal properties of the essential oil and crude extracts of *Metasequoia glyptostroboides* Miki ex Hu, Ind. Crop. Prod. 26, 28-35.
- BARNETT, H.L., HUNTER, B.B., 2006: Illustrated genera of imperfect fungi. 4th Ed., The American Phytopathological Society, St. Paul Minnesota.
- BEN JEMIA, M., CHAABANE, S., SENATORE, F., BRUNO, M., KCHOUK, M.E., 2013: Studies on the antioxidant activity of the essential oil and extract of Tunisian *Tetraclinis articulata* (Vahl) Mast. (Cupressaceae). *Nat. Prod. Res.* 27, 1419-1430.
- BEUCHAT, L.R., 1994: Antimicrobial properties of spices and their essential oils. In: Natural antimicrobial systems and food preservation. In: Dillon, V.M., Board, R.G. (ed.), CAB International, 167-179. Wallingford, England.
- BOUNATIROU, S., SMITI, S., MIGUEL, M.G., FALEIRO, L., REJEB, M.N., NEFFATI, M., 2007: Chemical composition, antioxidant and antibacterial activities of the essential oils isolated from Tunisian *Thymus capitatus* Hoff. et Link. *Food Chem.* 105, 146-155.
- CHIKHOUNE, A., HAZZIT, M., KERBOUCHE, L., BAALIOUAMER, A., AISSAT, K., 2013: *Tetraclinis articulata* (Vahl) Masters essential oils: chemical composition and biological Activities. *J. Essent. Oil Res.* <http://dx.doi.org/10.1080/10412905.2013.77462>.
- COSTA, R., ZELLNER, B.A., CRUPI, M.L., DE FINA, M.R., VALENTINO, M.R., DUGO, P., DUGO, G., 2008: GC-MS, GC-O, and enantio-GC investigation of the essential oil of *Tarhachanthus camphoratus* L. *Flavour Frag. J.* 23, 40-48.
- CRISTANI, M., D'ARRIGO, M., MANDALARI, G., CASTELLI, F., SARPIETRO, M.G., MICIELI, D., VENUTI, V., BISIGNANO, G., SAIJA, A., TROMBETTA, D., 2007: Interaction of four monoterpenes contained in essential oils

- with model membranes: implications for their antibacterial activity. *J. Agric. Food Chem.* 55, 6300-6308.
- DAVIDSON, P.M., 1997: Chemical preservatives and natural antimicrobial compounds. In: Doyle, M.P., Beuchat, L.R., Montville, T.J. (ed.), *Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers*, 520-556. American Society for Microbiology, Washington DC.
- DEBA, F., XUAN, T.D., YASUDA, M., TAWATA, S., 2008: Chemical composition and antioxidant, antibacterial and antifungal activities of the essential oils from *Bidens pilosa* Linn. Var. *Radiata*. *Food Control* 19, 346-352.
- EUROPEAN PHARMACOPOEIA, 2004: 5th Ed., Council of Europe, 217-218. Strasbourg Cedex, France.
- GUMUS, T., DEMIRCI, A.S., SAGDIC, O., ARICI, M., 2010: Inhibition of heat resistant molds: *Aspergillus fumigatus* and *Paecilomyces variotii* by some plant essential oils. *Food Sci. Biotechnol.* 19, 1241-1244.
- JENNINGS, W., SHIBAMOTO, T., 1980: Qualitative analysis of flavour and fragrance volatiles by glass-capillary gas chromatography. In: Jovanovich, H.B. (ed.), Academic Press, New York.
- KAROUSOU, R., KOUREAS, D.N., KOKKINI, S., 2005: Essential oil composition is related to the natural habitats: *Coridothymus capitatus* and *Satureja thymbra* in NATURA 2000 sites of Crete. *Phytochem.* 66, 2668-2673.
- KÖNIG, W.A., HOCHMUTH, D.H., JOULAIN, D., 2001: Terpenoids and related constituents of essential oils. Library of Mass Finder 2.1. Institute of Organic Chemistry, Hamburg, Germany.
- LANFRANCHI, D.A., LAOUER, H., EL KOLLI, M., PRADO, S., MAULAY-BAILLY, C., BALDOVINI, N., 2010: Bioactive phenylpropanoids from *Daucus crinitus* Desf. from Algeria. *J. Agric. Food Chem.* 58, 2174-2179.
- MC LAFFERTY, F.W., STAUFFER, D.B., 1994: Wiley Registry of Mass Spectral Data. 6th Ed., Mass Spectrometry Library Search System Bench-Top/PBM version 3.10d, Palisade Newfield.
- MC LAFFERTY, F.W., STAUFFER, D.B., 1988: The Wiley/NBS Registry of Mass Spectral Data. 4th Ed., Wiley-Interscience, New York.
- MICELI, A., NEGRO, C., TOMMASI, L., 2006: Essential oil variability in *Thymbra capitata* (L.) Cav. growing wild in Southern Apulia (Italy). *Biochem. Syst. Ecol.* 34, 528-535.
- NATIONAL INSTITUTE OF STANDARDS AND TECHNOLOGY, 2008: Spectral Database for Organic Compounds, NIST WebBook: <http://webbook.nist.gov/chemistry>.
- NATIONAL INSTITUTE OF STANDARDS AND TECHNOLOGY, 1999: PC version 1.7 of the NIST/EPA/NIH Mass Spectral Library Norwalk. Perkin-Elmer Corp, CT, USA.
- NYCHAS, G.J.E., 1995: Natural antimicrobials from plants. In: Gould, G.W., New methods of food preservation, 58-89. Glasgow, Blackie Academic and Professional, London.
- PANDEY, D.K., TRIPATHI, N.N., TRIPATHI, R.D., DIXIT, S.N.Z., 1982: Fungitoxic and phytotoxic properties of essential oil of *Hyptis suaveolens*. *Z. Pfl. Krankh. Pfl. Schutz* 89, 344-349.
- PATHAK, V., 1997: Postharvest fruit pathology-Present status and future possibilities. *Indian Phytopathology* 50, 161-185.
- ROJAS, T.R., SAMPAYO, C.A.F., VÁZQUEZ, B.I., FRANCO, C.M., CEPADA, A., 2005: Study of interferences by several metabolites from *Aspergillus* spp. in the detection of aflatoxigenic strains in media added with cyclodextrin. *Food Control* 16, 445-450.
- RUBERTO, G., BIONDI, D., PIATELLI, M., 2000: The essential oil of Sicilian *Thymus capitatus* (L.) Hoffmanns. et Link. *J. Essent Oil Res.* 4, 417-418.
- TAWAHA, K.A., HUDAIB, M.M., 2012: Chemical composition of the essential oil from flowers, flower buds and leaves of *Thymus capitatus* Hoffmanns. & Link from Jordan. *J. Essent Oil Bear Pl.* 15, 988-996.
- TOUMI, B.F., BENYAHIA, M., HAMEL, L., MOHAMED, H., BOUDAGHEN, L., 2011: Étude comparative de la composition chimique des huiles essentielles de *Tetraclinis articulata* (Vahl) Masters originaire d'Algérie. *Acta Bot Gallica* 158, 93-100.
- ZNINI, M., CRISTOFARI, G., MAJIDI, L., MAZOUZ, H., TOMI, P., PAOLINI, J., COSTA, J., 2011: Antifungal activity of essential oil from *Asteriscus graveolens* against postharvest phytopathogenic fungi in apples. *Nat. Prod. Commun.* 6, 1763-1768.

Address of the corresponding author:
E-mail: a_dibdz@yahoo.fr

ملخص: تتعرض الحمضيات إلى عدة آفات، نهتم في هذا العمل بالأضرار التي تسببها ذبابة البحر المتوسط *Ceratitis capitata* على منتجات المزرعة النموذجية بالفحول و معرفة الفطريات و البكتيريا المسببة لخسائر في المحاصيل. لكي نستطيع توفير وسائل لمكافحة هذه الآفات. للمبيدات الكيميائية تأثير على الحشرات النافعة، والبيئة، مما يجعلنا مضطرين إلى البحث عن مواد بديلة مستخلصة من النباتات الطبيعية ذات خصائص مضادة للميكروبات و الحشرات ومضادات الأكسدة ذات أهمية كبيرة في الزراعة والصناعات الزراعية. يمكننا تلخيص الأهداف الرئيسية لهذا العمل على النحو التالي: دراسة الأسباب المساعدة على تكاثر هذه الحشرة وفقا لثغرات التعشيش و الفواكه المتساقطة ما اظهر أن لتاريخ المعاينة، الشجرة و الاتجاه تأثيرا كبيرا على الهجمات.

استخراج الزيوت الأساسية، المياه العطرية و المستخلصات من النباتات الطبية *Thymus capitatus Tetraclinis articulata*, *Daucus crinitus* تحديد التراكيب الكيميائية وتقييم الخصائص البيولوجية: المضادة للأكسدة، مضادة للفطريات والمضادة للبكتيرية، بعد ما قمنا بالتعرف على مسببات التعفن المتمثلة في إحدى عشرة صنفا من الفطريات *Aspergillus niger*, *A.fumigatus*, *A.oryzae*, *A.flavus*, *Alternaria sp.*, *Fusarium solani*, *Pantoea sp.*, *Trichoderma sp.*, *Penicillium sp.1*, *Penicillium sp.2*, *Cladosporium sp.*, *et Rhizopus sp.* و ستة أصناف من البكتيريا *Xanthomonas sp.*, *Bacillus sp.*, *Pseudomonas sp.*, *Burkholderia sp.* *et Rhodotorula sp.* المياه العطرية خصائص مضادة للميكروبات و مضادة للبكتيريا على جميع السلالات المجربة. زيادة على القدرة على التقاط الجذور الحرة. **الكلمات الرئيسية:** الحمضيات، ذبابة البحر المتوسط، النباتات الطبية، الزيوت الأساسية، الخصائص البيولوجية

Résumé : Les agrumes sont exposés à plusieurs ravageurs, nous nous sommes intéressés à la mouche méditerranéenne des fruits *Ceratitis capitata* en étudiant sa bio-écologie au niveau de la ferme pilote d'El Fhoul, et identifier les agents pathogènes qui l'attaquent afin de proposer des moyens de lutte contre ces bioagresseurs.

Notre étude est essentiellement basée sur les variations des principaux facteurs liés à l'infestation des oranges *Citrus sinensis* de la variété sanguine par *Ceratitis capitata* dans la région d'El Fhoul (Tlemcen). En effet, l'étude des infestations en fonction des trous de ponte (piques) et des fruits chutés a montré un impact significatif des facteurs « date d'observation », « orientation » et « arbre échantillonné » sur les attaques de ce phytophage.

L'étude microbiologique a révélé onze genres de moisissures : *Aspergillus niger*, *Aspergillus fumigatus*; *Aspergillus oryzae*; *Aspergillus flavus*; *Alternaria sp*; *Fusarium solani*; *Trichoderma sp*; *Penicillium sp1*; *Penicillium sp2*; *Cladosporium sp* et *Rhizopus Sp*.

La flore bactérienne présente dans nos prélèvements est très diversifiée, nous avons isolé dix-sept aspects différents mais nous n'avons pu identifier que les cinq genres suivants : *Pantoea sp.*; *Xanthomonas sp.*; *Bacillus sp.*; *Pseudomonas sp.*; *burkholderia sp.*; et *Rhodotorula sp.*

Sachant les effets nocifs des pesticides sur les insectes utiles, les êtres humains et l'environnement, la recherche des substances végétales naturelles aux propriétés antimicrobiennes, insecticides et antioxydantes est donc d'un grand intérêt pour l'agriculture, l'agroalimentaire et la santé. Les huiles essentielles, les hydrolats et les extraits de solvant de *Thymus capitatus*, *Tetraclinis articulata* et *Daucus crinitus* dont nous avons identifié la composition chimique ont montré un pouvoirs antioxydant, antifongique et antibactérien sur l'ensemble des souches testées.

Mots clés : *Citrus sinensis*, *Ceratitis capitata*, plantes médicinales, huiles essentielles, hydrolats, activités biologiques.

Abstrat : Citrus fruits are exposed to many pests, we looked to the Mediterranean fruit fly *Ceratitis capitata* by studying its bio-ecology at the pilot farm of El Fhoul and identify pathogens that attack to propose ways to fight against these pests. Our study is based primarily on the variations of the main factors related to the infestation of orange *Citrus sinensis* variety of blood by *Ceratitis capitata* in the region of El Fhoul (Tlemcen). Indeed, the study of infestations according nesting holes (bites) and falls fruits showed a significant impact factors "Observation Date", "orientation" and "sampled tree" of attacks of this herbivore. The microbiological study revealed eleven kinds of mold: *Aspergillus Niger*, *Aspergillus fumigatus*; *Aspergillus oryzae*; *Aspergillus flavus*; *Alternaria sp*; *Fusarium solani*; *Trichoderma sp*; *Penicillium sp1*; *Penicillium sp2*; *Cladosporium sp.* and *Rhizopus Sp*. The bacterial flora present in our samples is very diverse, we isolated seventeen different aspects but we were able to identify the following five genres: *Pantoea sp.*; *Xanthomonas sp.*; *Bacillus sp.*; *Pseudomonas sp.*; *Burkholderia sp.*; and *Rhodotorula sp.* Knowing the harmful effects of pesticides on beneficial insects, humans and the environment, research natural plant substances with antimicrobial, insecticidal and antioxidant is of great interest for agriculture, food and health. Essential oils, hydrosols and solvent extracts of *Thymus capitatus*, *Tetraclinis articulata* and *Daucus crinitus* we identified the chemical composition showed an antioxidant, antifungal and antibacterial powers on all strains tested.

Keywords: *Citrus sinensis*, *Ceratitis capitata*, medicinal plants, essential oils, organic activities.