



République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieure
et de la Recherche Scientifique
Université de Tissemsilt



Faculté des Sciences et de la Technologie
Département des Sciences de la Nature et de la Vie

Mémoire de fin d'étude pour l'obtention du diplôme

De Master académique en

Filière : **Sciences biologiques**

Spécialité : **Microbiologie Appliquée**

Présenté par : *M^{elle}* TAHAR ARIBI Imene

M^{elle} ZERADNA Nour EL Houda

Thème

Test de l'Activité antifongique d'huile essentielle commercialisée

Soutenu le 21 juin 2022

Devant le Jury

Mr. BOUNOUIRA Yassine	Président	M.C.B	Univ-Tissemsilt
Mr. CHAHBAR Mohamed	Encadreur	M.C.A	Univ-Tissemsilt
<i>M^{elle}</i> HENNI Asma	Co-encadreur	M.A.A	Univ-Tissemsilt
Mr. GADOUM Abdelkader	Examineur	M.C.B	Univ-Tissemsilt

Année universitaire : 2021-2022.



République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieure
et de la Recherche Scientifique
Université de Tissemsilt



Faculté des Sciences et de la Technologie
Département des Sciences de la Nature et de la Vie

Mémoire de fin d'étude pour l'obtention du diplôme

De Master académique en

Filière : **sciences biologiques**

Spécialité : **Microbiologie Appliquée**

Présenté par : *M^{elle}* TAHAR ARIBI Imene

M^{elle} ZERADNA Nour EL Houda

Thème

Test de l'Activité antifongique d'huile essentielle commercialisée

Soutenu le 21 juin 2022

Devant le Jury

Mr. BOUNOUIRA Yassine	Président	M.C.B	Univ-Tissemsilt
Mr. CHAHBAR Mohamed	Encadreur	M.C.A	Univ-Tissemsilt
<i>M^{elle}</i> HENNI Asma	Co-encadreur	M.A.A	Univ-Tissemsilt
Mr. GADOUM Abdelkader	Examineur	M.C.B	Univ-Tissemsilt

Année universitaire : 2021-2022.

Remerciements

Un grand merci à Allah, le grand seigneur qui nous a donné les raisons d'atteindre ce jour que nous souhaitions. Merci Allah de nous avoir aidés et d'avoir éclairé notre chemin.

Nos remerciements les plus sincères à toutes les personnes qui ont contribué, de près ou de loin, à l'élaboration de ce mémoire, ainsi qu'à la réussite de notre pratique. Ce travail de fin d'étude n'aurait pas pu voir le jour sans l'aide, de nombreuses personnes. C'est pourquoi, nous tenons à remercier toutes celles et ceux qui nous ont aidé et encouragé tout au long de l'élaboration de ce mémoire.

Nous voudrions remercier particulièrement

Mr. CHAHBAR Mohamed (MCA), d'avoir proposé le thème et d'avoir accepté d'encadrer ce mémoire, nous lui adressons un grand merci.

A Mademoiselle HENNI Asma, qui nous a accompagné durant ce travail de fin d'étude Nous lui adressons nos vifs remerciements pour sa disponibilité, elle a été au sommet de sa responsabilité en remplissant son devoir de nous aider et conseiller, et son écoute face à nos questions.

Aux membres de jury :

Mr. BOUNOUIRA Yassine. Maitre de conférence B, à l'université de Tissemsilt d'avoir accepté la présidence de jury de ce mémoire.

Mr. GADOUM Abdelkader. Maitre de conférence B, à l'université de Tissemsilt d'avoir accepté d'examiner ce travail.

Aux ingénieurs de laboratoire pour leurs efficacités du point de vue méthodologie au niveau du laboratoire.

Aux Dr LABASS, Dr KIDOOD et Dr DRIZI. Merci pour vos intérêts et vos aides.

Merci à tous ceux qui nous ont aidé ou motivé, même si par une sourire .A tous et tout un grand merci.

Dédicaces

Je dédie ce travail en premier lieu aux deux personnes les plus précieuses de ma vie *mes chers parents*.

Quoi que je fasse je ne pourrais leur rendre ce qu'ils ont fait pour moi, si je suis arrivé la c'est bien grâce à eux que dieu les bénisse, et leur accorde longue vie et les protège.

A mes sœurs, Wiame et Romeissa.

A mes frères, Abd el nor et mon petit prince Mohamed.

Je demande à dieu de les bénir et de les protéger.

A mes chères et inoubliables amies : Marwa, Sarra, Habiba, Jamila, Kheira , Hadjer et Nassira .

A ma chère adorable binôme, Houda

A chère grand-mère que j'aime beaucoup, pour ses encouragements et ses prières, que dieu la protège et prolonge sa vie.

A toute ma famille

A toute la promotion de la microbiologie appliquée et la biochimie appliquée pour l'année universitaire 2021_2022.

Imene

Dédicaces

Je dédie cette mémoire :

À mes parents, ma chère mère et mon cher père pour tous leurs sacrifices, leur amour, leur tendresse, leur prières tout au long de mes études et tout cela grâce à Dieu.

Mes chers frères et sœurs :

Salah , Hocine , Amina et Djamila pour leurs encouragements permanents et leur soutien moral.

Grande merci d'être toujours là pour moi.

À mon binôme Imene et mes proches amies Khadra et Khadija et toute ma famille.

À tous ceux qui ont participé directement ou indirectement pour la réalisation de ce travail. Merci

Houda

Table des matières

Remerciements	I
Dédicaces	II
Tables de matières	IV
Listes de figures	VII
Listes des tableaux	VIII
Listes des abréviations.....	IX

Première partie: Synthèse bibliographique

Chapitre I: Généralités sur les champignons

Introduction	1
1. Définition	3
1.1. Caractères généraux des champignons	3
1.1.1. Morphologie et structure	3
1.1.2. Mode de vie	4
1.2. Classification des champignons	5
1.2.1. <i>Zygomycota</i> ou zygomycètes.....	5
1.2.2. <i>Ascomycota</i> ou ascomycètes.....	5
1.2.3. <i>Basidiomycota</i> ou basidiomycètes.....	6
1.2.4. Chytridiomycotina ou chytridiomycètes	6
1.3. La reproduction des champignons.....	7
1.3.1. Asexuée	7
1.3.2. Sexuée	7
1.4. Les principaux champignons pathogènes.....	8
1.5. Quelques maladies fongiques	10
1.5.1. L'ascosphaerose de l'abeille	10
1.5.2. L'aspergillose	11
1.6. L'antifongigramme.....	11
1.6.1. Définition.....	11
1.6.2. Fiabilité des tests de sensibilité aux antifongigramme	12
1.6.4. E-test (AB Biodisk).....	13
1.6.5. Fungi test (Bio-Rad).....	13

Chapitre II: Généralités sur les huiles essentielles

1. Historique	14
2. Définition	14
3. Répartition et localisation des huiles essentielles dans la plante.....	14
4. Propriétés physico-chimiques des huiles essentielles.....	15
5. Composition chimiques des huiles essentielles.....	15
6. Procédés d'extraction des huiles essentielles	17
7. Les principales méthodes d'extraction	17
7.1. Extraction par Hydrodistillation.....	17
7.2. Extraction par entraînement à la vapeur d'eau	18
7.3. Hydro-diffusion	19
7.4. Expression à froid.....	20
8. Rôle des huiles essentielles	20
9. Méthodes d'analyses des huiles essentielles	21
9.1. Chromatographie en phase gazeuse.....	21
9.2. Chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC-MS).....	22
10. Mode d'action des huiles essentielles.....	22
11. Activité antifongique de quelques huiles essentielles	23
11.1. Activité antifongique de l'huile d'olive	24
11.2. Activité antifongique de l'huile du Menthe poivrée.....	24
11.3. Activité antifongique d'HE de lavande	24
11.4. Activité antifongique d'huile clou de girofle	24
11.5. Activité antifongique de la nigelle	24
12. Méthodes d'évaluation de l'activité antifongique	25
12.1. Méthode de diffusion (l'aromatogramme)	25
12.1.1. La technique des disques.....	25
12.1.2. La technique de diffusion en puits.....	25
12.2. Méthode de dilution de bouillon.....	26
12.3. Méthodes des micro-atmosphères	26

Deuxième partie: partie pratique

Chapitre I: Matériels et Méthodes

1. Objectifs	27
2. Matériels.....	27
2.1. Échantillon.....	27
2.2. Le milieu de culture.....	27
2.3. Les verreries	27
2.4. Les appareillages	28
2.5. Les réactifs	28
2.6. Autre matériels	28
3. Méthodes	28
3.1. Préparation de milieu de culture.....	28
3.2. Isolement et identification d' <i>Aspergillus Niger</i> et l' <i>Ascospaera Apis</i>	29
3.3. Test de l'activité antifongique d'HE sur les deux souhes fongiques	33
3.4. Les analyses statistiques	36

Chapitre II: Résultats et Discussion

1. Résultats	37
1.1. Aspect microscopique et macroscopique des champignons étudiés.....	37
1.1.1. <i>Aspergillus Niger</i>	37
1.1.2. <i>Ascospaera Apis</i>	37
1.2. Activité antifongique des huiles essentielles commercialisées	38
1.2.1. <i>Aspergillus Niger</i>	38
1.2.2. <i>Ascospaera Apis</i>	41
1.3. L'évaluation de l'activité antifongique des huiles esentielles commercialisées	44
1.3.1. Pour <i>Aspergillus Niger</i>	44
1.3.2. Pour <i>Ascospaera Apis</i>	45
1.4. La zone d'inhibition	47
2. Discussion	47
Conclusion.....	50
Références bibliographiques	51
Résumés	55

Listes de figures

Figure 1: Thalle unicellulaire (Messaoud et Dhib, 2021).....	3
Figure 2: Thalle filamenteux (Morin-Sardin, 2016).....	4
Figure 3: Cycle de vie des champignons (Adjimi, 2019).....	8
Figure 4: Schéma du montage d'hydrodistillation de type clevenger (originale)	18
Figure 5: Montage d'entraînement à la vapeur d'eau (El haib, 2011).....	19
Figure 6: Schéma d'extraction par hydro diffusion (Eddine, 2017)	19
Figure 7: Schéma d'expression à froid (Mnayer, 2014)	20
Figure 8: Schéma du principe d'un système CPG (Labidi, 2021).	22
Figure 9: La cire battue issue d'une colonie infectée (originale)	27
Figure 10: La préparation du milieu de sabouraud d'extrose agar.A : La pesée de 32,5 de poudre déshydratée de milieu de culture. B : Agitation et chauffage (mélange de la masse avec 500 ml d'eau distillé. C : l'autoclavage est fait à 120°C pendant 15 min. D : Le refroidissement du milieu (Originale)	29
Figure 11: L'isolement d' <i>Aspergillus Niger</i> (Originale).....	30
Figure 12: Aspect macroscopique d' <i>Aspergillus Niger</i> (Belhamelet al, 2021).....	31
Figure 13: Observation microscopique (GX 40) . CO:conidiophore,TS: têtes porifère, Co:conidies globuleuse et brunes(Bouzid, 2018).....	32
Figure 14: Aspect macroscopique d' <i>Ascosphaera Apis</i> (Les colonies sont blanches) (Chahbar, 2017)	32
Figure 15: Aspect microscopique d' <i>Ascosphaera Apis</i> (Chahbar, 2017)	33
Figure 16: Le collage et l'ensemencement	34
Figure 17: L'application de disque	35
Figure 18: L'imprégnation de disque	35
Figure 19: L'application des disques mycéliens	36
Figure 20: Les boîtes de pétri mise à l'étuve	36
Figure 21: <i>Aspergillus Niger</i> après incubation à 28°C, a : Observation macroscopique, b : Observation microscopique (gx10).....	37
Figure 22: <i>Ascosphaera Apis</i> après incubation , a: Observation macroscopique , b : Observation microscopique (G X 40).....	37
Figure 23: Résultat de test d' <i>Aspergillus Niger</i>	44
Figure 24: Résultat de test d' <i>Ascosphaera Apis</i>	45

Listes des tableaux

Tableau 1: Les principaux champignons pathogènes.....	8
Tableau 2: Famille des composés présentant dans les huiles essentielles (Tolba, 2017).....	15
Tableau 3: L'activité antifongique d'huile essentielle commercialisée d' <i>Aspergillus Niger</i> mesurée en diamètre (mm).....	38
Tableau 4: Groupement des groupes homogènes pour le diamètre 1.....	39
Tableau 5: Groupement des groupes homogènes pour le diamètre 2.....	40
Tableau 6: L'activité antifongique d'huile essentielle commercialisée d' <i>Ascospaera Apis</i> mesurée en diamètre d'inhibition (mm).....	41
Tableau 7: Groupement des groupes homogènes pour le diamètre 1.....	42
Tableau 8: Groupement des groupes homogènes pour le diamètre 2.....	43
Tableau 9: Pourcentage d'inhibition d' <i>A. Niger</i> et <i>A. Apis</i> en présence de différentes doses d'huile essentielle commercialisée.....	46

Listes des abréviations

CMI : Concentration minimale inhibitrice

EUCAST : European Committee on Anti- microbial Susceptibility

NCCLS : National comitee for clinical Laboratory standards

CPG : Chromatographie en phase gazeuse

HE : Huile essentielle

CMF : Concentration minimale fongicide

MTT : Méthyle thiazole diphényle tétrazolium

PAM : Plante aromatique et médicinale

PDA : Potato d'extrose agar

A .Niger : Aspergillus Niger

A .Apis : Ascospaera Apis

Introduction

Introduction

L'importance des abeilles mellifères pour l'environnement et les humains est indéniable. En polonisant efficacement les plantes, elle permet de maintenir la diversité et d'assurer une qualité de fructification optimale. Elle fournit également aux humains les produits de la ruche tels que le miel, le pollen, la propolis et la gelée royale (**Adjlane et Kouas, 2021**).

Sa santé est devenue un véritable défi : l'affaiblissement et la perte de colonies observés depuis une décennie peuvent être le résultat de maladies causées par des facteurs environnementaux, chimiques et biologiques. Des études récentes tendent à montrer un effet synergique des pathogènes (**Vidal-Naquet, 2012**). Parmi ces agents pathogènes qui provoquent des infections mycosiques, nous citons les champignons (**Jensen et al, 2013**).

Pendant très longtemps, les humains ont été relativement impuissants face aux maladies fongiques. Au cours des vingt dernières années, une forte augmentation de ces maladies, affectant un large éventail d'hôtes, a été observée. Ces maladies sont causées par un nombre étonnamment élevé d'espèces fongiques (**Hajji, 2016**). Ces problèmes ont incité des initiatives visant à identifier des composés naturels qui ont une activité antifongique importante et peuvent être utilisés en toute sécurité pour le traitement et la prévention des maladies (**Gabriel et al, 2018**).

Les plantes aromatiques et médicinales (PAM) constituent une richesse naturelle très importante dont la valorisation nécessite une parfaite connaissance des propriétés à mettre en valeur. Les propriétés médicinales des plantes médicinales dépendent de la présence de différents agents bioactifs et appartenant à différentes classes chimiques. Ces propriétés, généralement dues à la fraction d'huile essentielle (HE), peuvent être utilisées pour traiter les infections fongiques (**El Mansouri et Moutaj, 2013**).

L'objectif principale de notre travail est de tester l'activité antifongique d'une huile essentielle commercialisée vis-à-vis *l'Aspergillus Niger* et *l'Ascospaera Apis* affectant l'abeille domestique *Apis mellifère*.

Vu que l'extraction des huiles essentielles est difficile en plus de la longue durée qu'elle nécessite. Nous avons pensé à utiliser une huile essentielle commercialisée comme un produit alternatif thérapeutique, cela est dû à sa disponibilité.

Dans ce contexte nous posons les questions suivantes : est-ce que cette huile essentielle commercialisée est efficace contre *Aspergillus Niger* ? Sur *Ascosphaera Apis* ? Elle est efficace contre les deux souches ? Ou bien ne présente aucune efficacité ?

Ce manuscrit est divisé en deux parties :

La première partie est consacrée à une étude bibliographique structurée en deux chapitres.

- Chapitre 01 : Nous avons commencé par des généralités sur les champignons pathogènes
- Chapitre 02 : présente des généralités sur les huiles essentielles et leurs activités antifongiques

La deuxième partie est la partie expérimentale qui est divisée en deux chapitres, le premier chapitre décrit le matériel et les méthodes utilisés durant la manipulation de travail. Le deuxième chapitre présentera les résultats obtenus et leurs discussions. Et en terminant par une conclusion générale qui clôturera notre travail.

Première Partie :
Synthèse bibliographique

Chapitre I :

Généralités sur les champignons

1. Définition

Les champignons, ou mycètes, sont des organismes eucaryotes unicellulaires ou multicellulaires comprenant des espèces macroscopiques (macromycètes) et d'autres espèces microscopiques (micromycètes) filamenteuses ou de type levure (**Chabasse *et al*, 2002**).

Ce sont des micro-organismes eucaryotes, donc dotés d'un noyau avec des membranes nucléaires, des chromosomes et un noyau. Ils se distinguent donc des bactéries et des actinomycètes qui sont des procaryotes (**Drillon *et al*, 2011**).

Ils possèdent une paroi glucidique rigide constituée de chitine et une membrane plasmique riche en stérols. Ils se développent grâce à un système de mycélium appelé thalle ou mycélium (**Germaud *et al*, 2010**).

1.1. Caractères généraux des champignons

1.1.1. Morphologie et structure

L'organisation cellulaire de base des champignons est le thalle qui constitue l'organe végétatif. Il se caractérise par une grande variété de structures, allant des formes unicellulaires (levure). Chaque cellule possède un noyau, le plus souvent de forme filamenteuse, constitué d'hyphes ou cellules allongées sous forme de filaments tubulaires de 2 à 10 microns de diamètre.

Ces hyphes regroupent les organites classiques de la cellule : noyau, mitochondries, cytoplasme, vésicules. Ils peuvent être segmentés ou non, et leur union forme le mycélium (**Messaoud et Dhib, 2021**).



Figure 1: Thalle unicellulaire (**Messaoud et Dhib, 2021**)

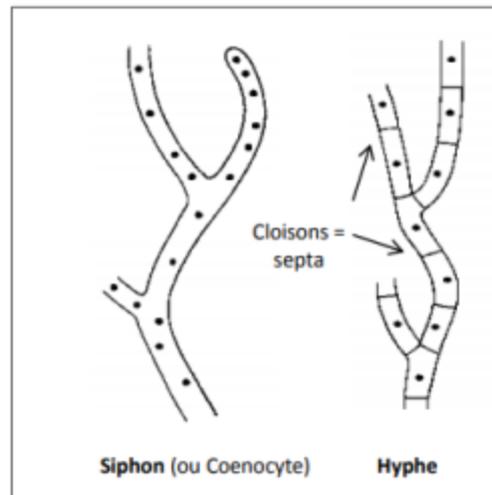


Figure 2: Thalle filamenteux (Morin-Sardin, 2016)

1.1.2. Mode de vie

Presque tous les champignons vivent de la décomposition de la matière organique, ils sont le milieu naturel de récupération des minéraux et sont appelés "saprophytes". Dans certaines conditions, de nombreux champignons microscopiques parasitent des organismes végétaux ou animaux ou même d'autres champignons (c'est le cas de *Penicillium rugulosum*, qui infecte la tête d'*Aspergillus Niger*, sur laquelle des groupes de *Penicillium* se forment et finissent par entraîner sa mort). D'autres coexistent avec différentes formes de vie dans le cadre d'un bénéfice mutuel ou d'une soi-disant «symbiose». (Kachour, 2005).

1.1.2.1. Les saprophytes

C'est l'un des trois principaux modes de champignons hétérotrophes, les saprophytes utilisent la matière organique morte, ce qui provoque (avec l'aide de bactéries) la décomposition (Berdi *et al*, 2009).

1.1.2.2. Les parasites

Certains champignons passent d'un état saprophyte à un état parasitaire occasionnel puis à un état strictement parasitaire, qui a dû apparaître il y a longtemps, lorsqu'ils ont trouvé des conditions de croissance plus favorables chez les organismes vivants. Le parasitisme des champignons sur les animaux et les plantes est dû au fait que la taille des filaments de ces derniers est beaucoup plus petite que celle de l'hôte parasite (Laamarie *et al*, 2009).

1.1.2.3. Les symbiotes

Selon la morphologie de l'organe résultant de l'union végétative - symbiotique avec des champignons, on distingue différents types de champignons mycorhiziens. Les ectendomycorhizes (caractérisées à la fois par la présence d'un revêtement d'hyphes et la croissance d'hyphes intracellulaires et extracellulaires), les endomycorhizes (caractérisées par l'absence de tubules filamenteux externes et l'infiltration d'hyphes dans les cellules) et les ectomycorhizes (où le champignon se développe principalement autour de la base) sont les plus fréquentes et les plus étudiés (**Duponnois *et al*, 2013**).

1.2. Classification des champignons

Le règne fongique contient des sous-groupes appelés divisions ou embranchements. Le nom de chaque département se termine par Mycotina, la tribu est divisée en classes, ce dernier nom se termine par Mycètes, le suffixe "ale" est utilisé pour indiquer l'ordre et le suffixe "aceae" signifie famille. Chaque famille contient les genres et les espèces qui forment la base de la classification. Par conséquent, chaque champignon, comme tout autre composant vivant, est identifié par une nomenclature binomiale qui commence par le genre et se termine par l'espèce (**Chabasse, 2008**).

1.2.1. Zygomycota ou zygomycètes

Espèce à cellules sœurs (ou siphoniques), où les cellules ne sont pas compartimentées (plusieurs noyaux coexistent dans le même "siphoning"), spores non flagellées. La taille de ces espèces est microscopique. Il répertorie :

1.2.1.1. Les champignons mucors

Auxiliaires industriels (chimiques ou pharmaceutiques), phytopathogènes, et parfois parasites humains (agents zygomycoses) (**Rapior *et Fons*, 2006**).

1.2.1.2. Les Entomophthorales

Parasites végétaux ou animaux, parfois agents de lutte biologique contre des insectes nuisibles connus (porteurs de maladies parasitaires, herbivores, etc.) (**Kiffer *et Morelet*, 1997**).

1.2.2. Ascomycota ou ascomycètes

Ces champignons ont un thalle filamenteux cloisonné ou levroïde avec des structures

caractéristiques appelées ascus, qui sont des sporanges spécialisés formés lors de la reproduction sexuée (**Botton et al, 1990**). Ces ascomycètes, généralement des octosporés, seront soit libres (Ascomyces ou Hemiascomycètes) soit produits au sein d'organes protecteurs de forme variable appelés Ascomycètes (Vrais Ascomycètes ou Eucomycètes) (**Chabasse et al, 2002**).

1.2.3. Basidiomycota ou basidiomycètes

Espèces qui ont un thalle compartimenté et produisent des spores sexuées (= basidiospores) en dehors des cellules fertiles, appelées basides. Par conséquent, la basidiospore développe une cicatrice appelée pointe d'aiguille à partir de ce point d'attache après sa libération. La présence de la pointe de l'aiguille distingue les basidiospores qui doivent être dérivées des ascospores (**Ripert, 2013**).

1.2.3.1. Les homobasidiomycètes

Sont les champignons les plus évolués. Ils forment la plupart de ce qu'on appelle les "gros champignons" en raison de leurs grandes fructifications (**Després, 2012**).

1.2.3.2. Le groupe de transition

Unit le genre avec les Calocera divisés longitudinalement de manière incomplète (**Rapier et Fons, 2006**).

1.2.3.3. Les Phragmobasidiomycètes

Représentent environ 500 espèces dont la baside reste cloisonnée. Cette classe comprend deux ordres (Tremella yeux, Tremella : baside médiastin ; oreilles, yeux, champignon : baside septum transverse) (**Després, 2012**).

1.2.3.4. Les téliomycètes

Sont des parasites des plantes. Cette classe comprend deux ordres (Urédinales, Champignon de la rouille ; Ustilaginales, Champignon de la carie dentaire et Champignon du charbon) (**Kiffer et Morelet, 1997**).

1.2.4. Chytridiomycotina ou chytridiomycètes

Ce sont les champignons les plus anciens (**James et al, 2000**). Ils sont les seuls champignons possédés, Spores monoflagellées (zoospores) (**Jennings et Lysek, 1996**). La présence de spores flagellées semble confiner ces organismes aux milieux aquatiques et aux

sols humides (James *et al*, 2000). Les organismes de ce phylum sont généralement microscopiques, mais peuvent également produire du mycélium. La plupart des chytrides sont saprophytes, aérobies ou anaérobies ; ils sont capables de dégrader un grand nombre de substrats (Powell, 1993 ; Shearer *et al*, 2007).

1.3. La reproduction des champignons

1.3.1. Asexuée

Les champignons se reproduisent de manière asexuée par fragmentation, bourgeonnement ou sporulation. Les fragments de mycélium peuvent développer de nouvelles colonies. La fragmentation des hyphes se produit lorsque le mycélium se divise en plusieurs morceaux, chaque composant se développant en un mycélium séparé. Les cellules somatiques de levure forment des pousses. Pendant le bourgeonnement (un type de cellule), un renflement se forme sur le côté de la cellule, le noyau se divise par mitose et le bourgeon finit par se séparer de la cellule mère (Naili *et al*, 2021).

1.3.2. Sexuée

Les champignons à reproduction sexuelle peuvent se combiner en fusionnant leurs hyphes ensemble dans un réseau interconnecté appelé synapse. La reproduction sexuée commence lorsque les hyphes haploïdes de deux champignons se rencontrent et fusionnent. Bien que les cellules de chaque organisme fusionnent, les noyaux restent séparés. Les hyphes produits par cette union, appelés dicaryon, ont deux noyaux distincts. Dicaryon forme des sporanges sexuels, dans lesquels les noyaux fusionnent en un seul. La cellule subit ensuite une méiose pour former des spores haploïdes et le cycle se répète. Certaines espèces de champignons n'ont pas de stade diploïde à l'exception du sporophyte sexuel, tandis que d'autres perdent complètement la capacité de se reproduire sexuellement (Samanta, 2015).

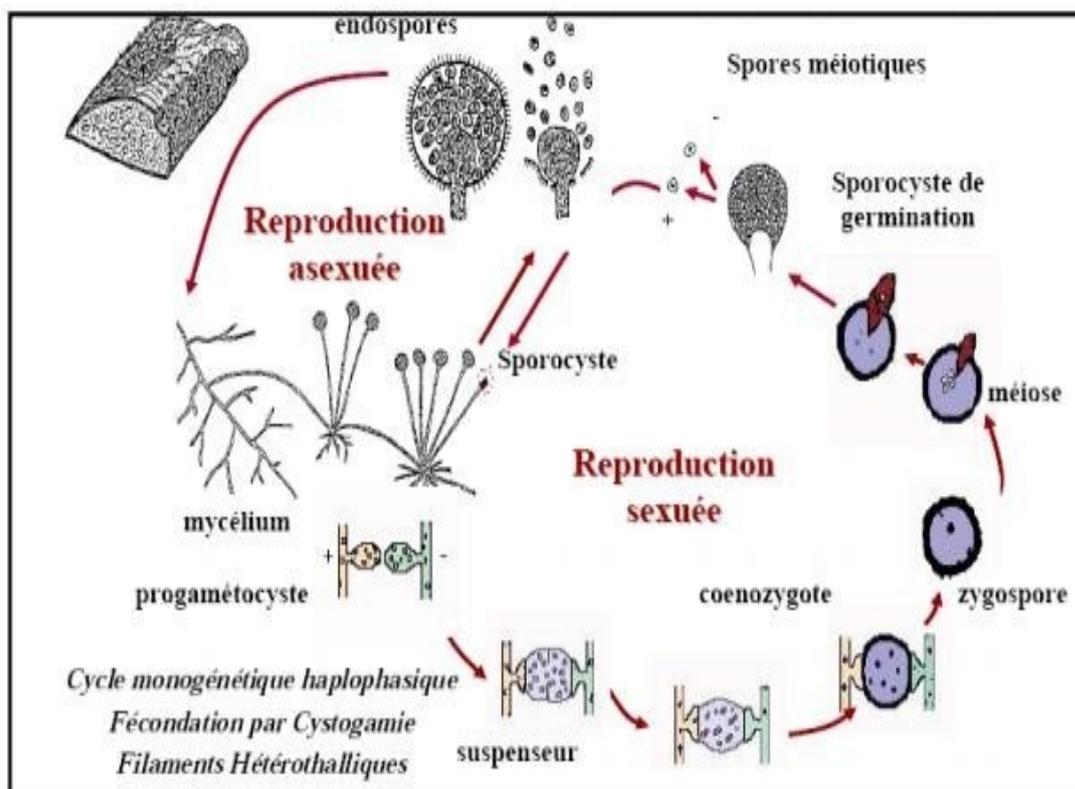


Figure 3: Cycle de vie des champignons (Adjimi, 2019)

1.4. Les principaux champignons pathogènes

Tableau 1: Les principaux champignons pathogènes

Organisme infecté	Infection	Champignons pathogènes	Pathologies
Abeilles	Infection profondes (invasives)	Genre <i>Aspergillus</i> <i>Aspergillus flavus</i> <i>Aspergillus fumigatus</i> <i>Aspergillus Niger</i>	Aspergillose (Parra et Ramos, 1998 ; Garrett et al, 1999).
		<i>Nosemaspp</i> : <i>N.apis</i> et <i>N.ceranae</i>	Nosémose (Higes et al, 2013).
		<i>Ascospaera Apis</i>	Le couvain plâtré (ascosphaerose) (Bailey, 1996 ; Gilliam, 1986).
L'humain	Infections profondes (invasives)	Les levures du genre <i>Condida</i> : <i>Condida albicans</i>)	Condidose disséminées (Hochard et al, 2008).
		<i>Aspergillus</i>	Aspergillose invasives (Agbo-godeau et Guedj, 2005).

		<i>Cryptococcus Néoformans</i>	Cryptococcose (Adoubryn <i>et al</i> , 2006)
	Infection superficielle cutanée	Dermatophytes <i>Microsporum</i> <i>Trichophyton</i> <i>Epidermatophyton</i>	Dermatophytoses (Ouraini <i>et al</i> , 2007)
Plantes	Infection cutané muqueuse	<i>Magnaportheoryzae</i>	La pyriculariose du riz(Ou, 1980).
		<i>Botrytis cinerae</i>	La pourriture grise(VanBaarlen <i>et al</i> ,2007).
		<i>Fusarium oxysporum...</i>	Le flétrissement vasculaire (Villa-Martínez <i>et al</i> ,2015) .
Animaux	Infection superficiels cutanée	Dermatophy teszoophiles : <i>Trichophyton equinum</i>	Dematophytoses Épidermophytose circinée (rare)
		<i>Microsporum canis ...</i>	Epidermophytose circinée, teigne (tineacapitis)
		Microsporid ies : <i>Encephalitozooncuniculi</i>	Encéphalitozoonose, microsporidiose neurologique, disséminée
		<i>Enterocytozoonbieneusi ...</i>	Entérocytozoonose, microsporidiose intestinale, respiratoire (Polack <i>et al</i> , 2015).

1.5. Quelques maladies fongiques**1.5.1. L'ascosphaerose de l'abeille****1.5.1.1. Définition et agent causal**

L'ascosphérose étant une maladie de l'abeille et également une forme de mycose due à un champignon hétérothallique à reproduction sexuée *Ascosphaera Apis* (**Jensen et al, 2013 ; OIE, 2014 ; Hemmerlé, 2015**).

Elle est également connue sous le nom de couvain calcifié, de couvain rustique ou de maladie fongique (**Bamford et Heath, 1989**).

1.5.1.2. Symptômes

Au fond de la ruche ou au petit matin avant le trou de mouche se trouvent des larves momifiées : larves d'abeilles mortes et sèches, recouvertes d'un mycélium blanc (rarement noir grisâtre) (**Fluri et al, 1998**).

Au couvain, il apparaît clairsemé, "mosaïque" et non serré avec une répartition aléatoire des larves à différents âges. Cette pathologie provoque également la formation autour de la larve d'une masse filamenteuse cotonneuse blanche occupant les alvéoles (**Adjlane, 2012**).

1.5.1.3. Dégâts

L'*Ascosphérose* affecte les géniteurs non cultivés. Elle n'est dangereuse que lorsque la colonie est affaiblie par d'autres facteurs, notamment en cas de manque de nutrition (**Flores et al, 2005**).

Elle tue rarement les abeilles. Cependant, cela peut entraîner un retard de la croissance printanière, ainsi qu'une diminution de la force de la ruche à mesure que le miel coule, entraînant éventuellement une mauvaise récolte (**Colin, 1989**).

1.5.2. L'aspergillose**1.5.2.1. Définition et Agent causal**

L'aspergillose est une maladie du couvain très rare des abeilles, causée par plusieurs champignons du genre *Aspergillus*. *Aspergillus Flavus* a été le plus souvent signalé, suivi de *A. Fumigatus*, mais d'autres espèces incluant *A. Niger* peuvent tuer les abeilles mellifères. *Aspergillus* est capable d'infecter l'hôte par le biais de l'intestin si les spores sont ingérées;

par conséquent, tout comme pour *Ascosphaera Apis* (couvain plâtré), les larves et les adultes peuvent être infectés (**Jensen et al, 2013**).

Cette maladie, peu contagieuse, est répandue en Europe et en Amérique. L'aspergillose touche aussi bien les abeilles adultes que les larves (**Oie, 2014**).

1.5.2.2. Dégâts

Les mauvaises conditions climatiques (trop humides ou trop froides), les carences alimentaires et l'excès de pollen transporté dans les hausses hâtivement sont les principaux facteurs favorables au développement de l'aspergillose (**Fernandez et Coineau, 2007**).

La plupart des espèces d'*Aspergillus* produisent des aflatoxines qui ont été la cause principale de la mort des abeilles mellifères infectées le piétin (**Syedmousavi et al, 2015**).

1.6. L'antifongigramme

1.6.1. Définition

L'antifongigramme est un apport indéniable options de traitement pour les cliniciens, mais ce derniers doivent être accompagné d'une pièce d'identité décrire précisément la nature du champignon et tester utilisé car pour un même antifongique, la CMI Il peut y avoir différentes interprétations selon le test (par exemple CLSI ou EUCAST) et dépend de l'espèce (ex. *Candida albicans* ou *Candida glabrata*) (**Paugam, 2010**).

La carte antifongique est un test conçu pour déterminer la concentration minimale inhibitrice (CMI) d'une souche fongique contre divers agents antifongiques. Par définition, la concentration minimale inhibitrice est la concentration la plus faible d'un agent antifongique capable d'inhiber complètement la croissance d'une souche donnée après une certaine période d'incubation. La fiabilité de la carte antifongique est affectée par de nombreux paramètres qui doivent être étroitement contrôlés (**Bourouda, 2010**).

1.6.2. Fiabilité des tests de sensibilité aux antifongigramme

De toute évidence, la réalisation de tests de sensibilité est incontestable pour identifier les champignons résistants aux médicaments et déterminer la concentration minimale inhibitrice (CMI) des souches fongiques, mais surtout pour prédire l'évolution clinique du traitement. Cependant, leur fiabilité est limitée par diverses difficultés, parmi elles on peut citer. Tout d'abord, rappelez-vous que les champignons sont des eucaryotes. De ce fait, leur

biologie est beaucoup plus complexe que celle des bactéries, et la compréhension du phénomène de résistance aux médicaments anti-infectieux reste incomplète.

Les résultats de l'antifongigramme obtenus *in vitro* dépendent de nombreux facteurs liés à l'agent antifongique lui-même (propriétés physicochimiques très différentes parmi les trois classes d'agents antifongiques : polyènes, azolés, fluoropyrimidines), à la méthode (méthode de macro dilution ou méthode de microdilution, méthode de diffusion sur gélose), conditions opératoires (pH et composition du milieu, température et durée d'incubation, densité de l'inoculum), stade des champignons testés (spores/pseudomycélium de levure, spores/mycélium de moisissure).

Ces variations affectent fortement l'interprétation et la reproductibilité des résultats, non seulement d'un laboratoire à l'autre, mais aussi au sein d'un même laboratoire. Pour l'amphotéricine B, l'effet des conditions opératoires est relativement limité, et pour la 5-fluorocytosine ces paramètres sont actuellement bien maîtrisés. Pour les azolés, en revanche, ces variables ont un impact significatif sur les résultats. Jusqu'à ces dernières années, les quelques études qui lui ont été consacrées n'ont pas permis d'aborder ces difficultés.

Enfin, un manque de corrélation est souvent constaté entre les résultats *in vitro* et *in vivo*. Compte tenu des limites liées aux tests *in vitro* impliquant notamment les azolés, des efforts considérables ont été faits en recherche clinique pour développer des modules d'infections fongiques expérimentales. Actuellement, c'est le moyen le plus fiable d'évaluer et de prédire l'efficacité et la tolérabilité des agents antifongiques avant leur utilisation chez l'homme (Grillot,1996 ; JD,2007).

1.6.3. Tests de sensibilité d'antifongigramme

Quelle que soit la technique utilisée, le critère de sensibilité optimal reste la détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI). Les seuils définissant la sensibilité ou la résistance ne s'appliquent qu'aux levures (Paugam, 2010).

Deux méthodes ont été validées par le National comitee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) aux Etats-Unis : E-test (AB Biodisk) et Fungi test (Bio-Rad).

1.6.4. E-test (AB Biodisk)

C'est une méthode par diffusion à partir d'une bandelette imprégnée d'un gradient de concentration antifongique, qui est secondairement déposée sur la gélose, permettant une

lecture directe de la CMI effective. Il s'agit de la technique la plus proche de la méthode de référence développée par le NCCLS. Il permet de tester tous les antifongiques systémiques contre les souches de *Candida*, *Cryptococcus neoformans*, *Aspergillus*, *Fusarium* et *Mucor* (Paugam, 2010).

✓ L'interprétation

Lecture de la concentration minimale inhibitrice (CMI). Une fois la période d'incubation écoulée, lorsque la croissance devient apparente et que le point final est clair, lisez la valeur CMI à l'intersection entre la région d'inhibition et la bande E-test. D'autre part, lorsque différentes combinaisons d'inhibition de croissance ont été observées, les illustrations disponibles dans la lecture expérimentale E-test ont été utilisées pour sélectionner avec précision le point final CMI. Lorsque la croissance se produit sur toute la bandelette, c'est-à-dire qu'aucune ellipse d'inhibition n'est observée, la CMI doit être indiquée comme étant supérieure à la valeur la plus élevée indiquée sur l'échelle de la CMI. Lorsque l'ellipse d'inhibition se situe en dessous de la bande, c'est-à-dire qu'il n'y a pas de croisement bande-bande d'inhibition, la CMI doit être déclarée inférieure au minimum sur l'échelle des CMI (Bourouda, 2010).

1.6.5. Fungitest (Bio-Rad)

Cette technique évalue la croissance des levures en milieu liquide et en présence de six agents antifongiques testés à deux concentrations différentes. Les six principes actifs utilisés dans cette technique sont : 5-fluorocytosine, amphotéricine B, miconazole, kétoconazole, itraconazole et fluconazole (Linac et Cassaing, 2001).

La microplaque Fungitest comporte 16 puits, dont deux sont destinés au contrôle négatif et deux autres puits au contrôle positif, tandis que les 12 puits restants contiennent les six agents antifongiques à deux concentrations différentes sous forme déshydratée (JD, 2007).

✓ L'interprétation

L'interprétation se fait en fonction de la couleur des 2 cupules pour chaque antifongique

Bleu–Bleu: absence de croissance : souche inhibée par l'antifongique

Rose -Bleu : faible croissance : souche intermédiaire

Rose-Rose: croissance: souche non inhibée par l'antifongique *in vitro* (Bourouda, 2010).

Chapitre II :
Généralités sur
les huiles
essentielles

1. Historique

Les premières preuves de la fabrication et de l'utilisation des huiles essentielles remontent à 3000 avant cette époque. Ainsi, les huiles essentielles semblent avoir accompagné la civilisation humaine depuis ses origines les plus reculées (**Belkhiri, 2015**).

Il est difficile de savoir quand les premières huiles essentielles ont été extraites ; en effet, les écrits anciens parlant d'eau distillée à des fins médicinales ne décrivent pas avec précision les procédés utilisés. Le premier document décrit un procédé de distillation datant du IX^e siècle, lorsque les Arabes ont introduit les huiles essentielles (HE) en Europe.

Au XVI^e siècle, le concept d'huiles essentielles et d'huiles grasses, et la méthode de séparation des essences des eaux aromatiques, sont devenus bien connus. A l'époque, les huiles essentielles étaient commercialisées à des fins industrielles, thérapeutiques et cosmétiques. A la fin du 19^{ème} siècle, les chimistes ont réussi à isoler, séparer et répliquer les molécules actives des huiles essentielles en parfumerie, thérapeutique et autres industries (**Malik, 2019**).

2. Définition

Il existe plusieurs façons de définir les huiles essentielles, également appelées « essences » ou « huiles volatiles » (**Chouitah, 2012**), qui sont des mélanges naturels complexes de métabolites secondaires volatils, lipophiles et généralement liquides ; extraits des plantes par vapeur ou hydro-distillation et par expression à froid (**Guinoiseau et al, 2015**).

Ils sont prélevés sur les feuilles, les graines, les bourgeons, les fleurs, les branches, l'herbe, l'écorce, le bois, les racines ou les fruits (**Abed, 2018**). Il est important de faire la distinction entre les huiles essentielles et les essences. Ces dernières sont des sécrétions naturelles produites par des organismes végétaux, tandis que les huiles essentielles sont le résultat de l'extraction d'essences (**Benmeggoura et al, 2021**).

3. Répartition et localisation des huiles essentielles dans la plante

Les huiles essentielles sont des sécrétions naturelles produites par les plantes, contenues dans des cellules ou des parties de plantes telles que les fleurs (rose), les sommités fleuries (*lavande*), les feuilles (*citronnelle*), l'écorce (*cannelle*), les racines (*iris*), les fruits (*vanille*), bulbes (*ail*), rhizomes (*gingembre*) ou graines (*muscade*) (**Boukhatem, 2019**).

Les huiles essentielles sont synthétisées à partir de plantes aromatiques en tant que métabolites secondaires. Ces plantes se caractérisent par la présence de structures sécrétoires d'huiles essentielles très spécifiques, telles que des poils sécrétoires (*Lamiacées*), des sacs sécrétoires (*Myrtacées*, *Rutacées*) et des canaux sécréteurs (*Apiacées*, *Astéracées*) des cellules à huiles essentielles (*lauracées*, *Zingibéracées*). Ils interviennent également dans le stockage des huiles essentielles (**Brunechon, 1987 ; Bouyahya et al, 2018**).

4. Propriétés physico-chimiques des huiles essentielles

Les huiles essentielles sont caractérisées par la propriété d'être liquides et volatiles à une température ambiante. Ils sont généralement de couleur claire et dégagent une forte odeur. Leur densité est sous l'eau. Ils sont extrêmement insolubles dans l'eau, mais peuvent être emportés par la vapeur d'eau. En revanche, l'HE est soluble dans les solvants organiques courants et est donc qualifiée de liposoluble (**Kamatou et al, 2013**).

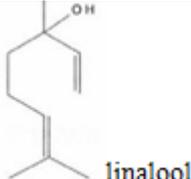
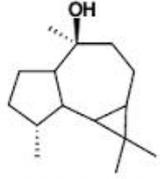
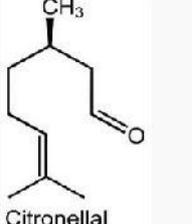
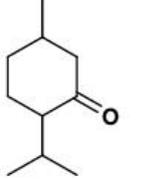
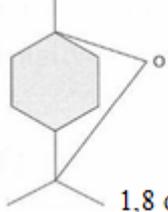
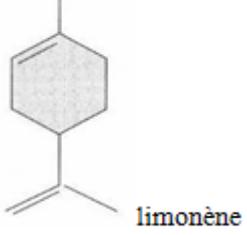
Ils sont principalement formés de composés asymétriques qui leur confèrent la capacité de tourner. Ceux à haute teneur en mono terpènes ont une faible densité et un indice de réfraction élevé, par contre une teneur élevée en dérivés contenant de l'oxygène aura l'effet inverse. Les huiles essentielles doivent être conservées à l'abri de l'air et de la lumière car elles sont sensibles à l'oxydation et ont tendance à polymériser (**Guezil, 2012**).

5. Composition chimiques des huiles essentielles

Les huiles essentielles sont constituées d'un mélange complexe de composants, généralement parlant, la plupart ont un à cinq. Parmi les innombrables substances présentes dans les huiles essentielles, on retrouve celles présentes dans le tableau 2.

Tableau 2: Famille des composés présentant dans les huiles essentielles (**Tolba, 2017**)

Famille	Structure
Phénols <i>Thymol, carvacrol, eugénol</i>	 Thymol Carvacrol

<p>Alcools terpéniques</p> <p><i>Linalol, géraniol, thuyanol, bornéol, menthol</i></p>	 <p>linalool</p>
<p>Alcools sesquiterpéniques</p> <p><i>Bisabolol, viridiflorol, nérolidol</i></p>	 <p>Viridiflorol</p>
<p>Aldéhydes terpénique</p> <p><i>Néral, géranial, citronnellal</i></p>	 <p>Citronellal</p>
<p>Cétones terpéniques</p> <p><i>Menthone, thuyone, cryptone, carvone</i></p>	 <p>Menthone</p>
<p>Oxydes terpéniques</p> <p><i>1,8Cinéole, ascaridole</i></p>	 <p>1,8 cinéole</p>
<p>Terpènes</p> <p><i>Paracymène, limonène, myrcène</i></p>	 <p>limonène</p>

6. Procédés d'extraction des huiles essentielles

L'extraction des huiles essentielles (HE) est une opération complexe et délicate. En effet, il vise à capter et collecter les produits les plus volatils, délicats et fragiles issus des plantes, sans en altérer la qualité (Lahlou, 2004 ; Richter *et* Schellenberg, 2007).

Différentes méthodes sont employées pour l'extraction des essences végétales, cette diversité étant due à la variété des matières premières et à la grande sensibilité de leurs certains composants (**Ibtissam et Benchercher ,2021**).

7. Les principales méthodes d'extraction

- Hydrodistillation
- L'Entraînement à la vapeur d'eau
- L'hydro diffusion
- L'expression à froid

Quel que soit le type d'extraction utilisé, Les étapes de l'extraction des huiles essentielles d'origine végétale restent identiques. Il est nécessaire dans un premier temps d'extraire de la matière végétale les molécules aromatiques constituant l'huile essentielle, puis dans un second temps de séparer ces molécules du milieu par distillation (**Lucchesi, 2005**).

7.1. Extraction par Hydrodistillation

Ce procédé consiste à plonger la matière première dans un bain-marie et à porter l'ensemble à ébullition (**Figure 4**). Ce procédé est généralement réalisé à pression atmosphérique. La distillation peut être réalisée avec ou sans cohobage de l'eau aromatique obtenue lors de la décantation. Ce procédé présente des limites principalement dues à l'action de la vapeur ou de l'eau bouillante (**Farhat, 2010**). Cependant, le contact direct des constituants de l'HE avec l'eau provoque des réactions chimiques entraînant des modifications des constituants finaux de l'extrait (**Lamamra, 2018**).

Les conditions opératoires et surtout le temps de distillation ont un effet significatif sur le rendement et la composition en HE. C'est pourquoi des modèles mathématiques sont actuellement développés qui peuvent optimiser au mieux ces conditions pour générer des HE de manière reproductible. L'hydrodistillation a des limites. Un chauffage fort et prolongé provoque la dégradation de certaines plantes et la dégradation de certaines molécules aromatiques (**Bruneton, 1999**).



Figure 4: Schéma du montage d'hydrodistillation de type clevenger (**originale**)

7.2. Extraction par entraînement à la vapeur d'eau

La distillation à la vapeur est l'un des procédés d'extraction les plus anciens pour obtenir de l'HE. Dans ce système d'extraction, la matière végétale est soumise à un flux de vapeur ascendant ou descendant sans traitement préalable. Cette technique ne permet pas de contact direct entre l'eau et les plantes, évitant ainsi une certaine hydrolyse ou décomposition pouvant affecter la qualité de l'huile (**Chenni, 2016**). De plus, les parfums des HE sont obtenus plus délicatement et la distillation, plus régulière et plus rapide, fait que les notes de tête sont riches en esters (**Raaman, 2006**).

La partie dite "de tête", un arôme très volatil dû aux molécules légères, apparaît en premier. Typiquement, une demi-heure recueille 95 % des molécules volatiles (**Kaloustian et Hadjiminaglou, 2012 ; Masango, 2005 ; Gavahian et Chu, 2018**) (Figure 5).

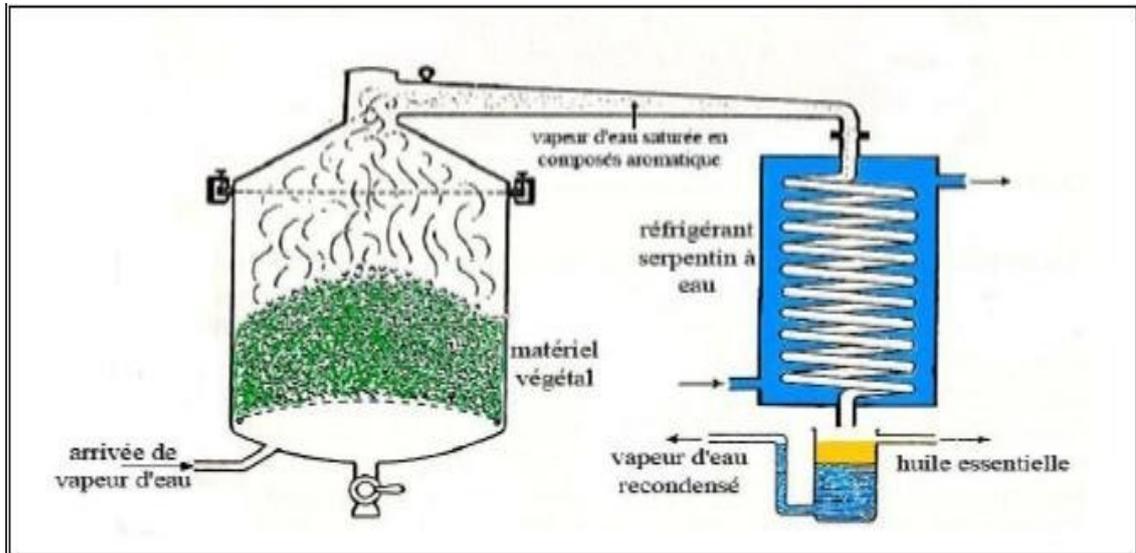


Figure 5: Montage d'entrainement à la vapeur d'eau (El haib, 2011)

7.3. Hydro-diffusion

Cette technique relativement récente, consiste à faire passer du haut vers le bas et à pression réduite la vapeur d'eau à travers une matrice végétale (**figure 6**). L'avantage de cette technique est traduit par l'amélioration quantitative et qualitative de l'huile essentielle (Touhami, 2017).

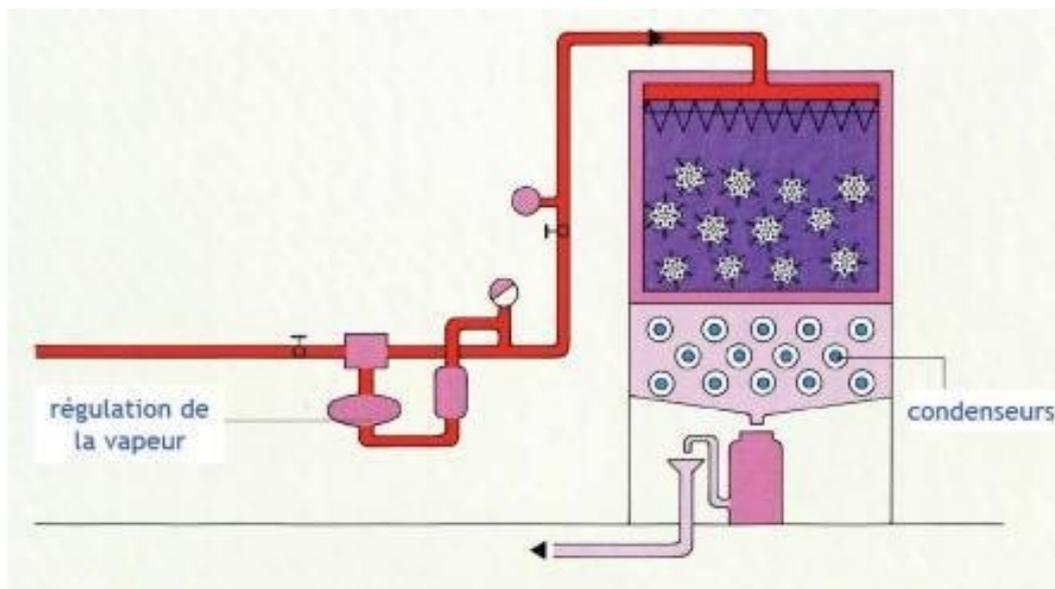


Figure 6: Schéma d'extraction par hydro diffusion (Eddine, 2017)

7.4. Expression à froid

Cette technique est la plus simple, mais ne s'applique qu'aux agrumes dont l'écorce des fruits comporte des poches sécrétrices d'essences. Cela concerne les citrus (*orange, citron, mandarine, bergamote...*). Cette méthode se fait sans chauffage et consiste à dilacérer (brise mécaniquement) les péricarpes ou «zestes» en exerçant une forte pression à l'aide d'une presse hydraulique (**figure 7**). Cela permet de faire sortir l'essence contenue dans les sacs oléifères, qui tapissent l'écorce du fruit, et de récupérer cette dernière par un procédé physique (**Laurent, 2017**).

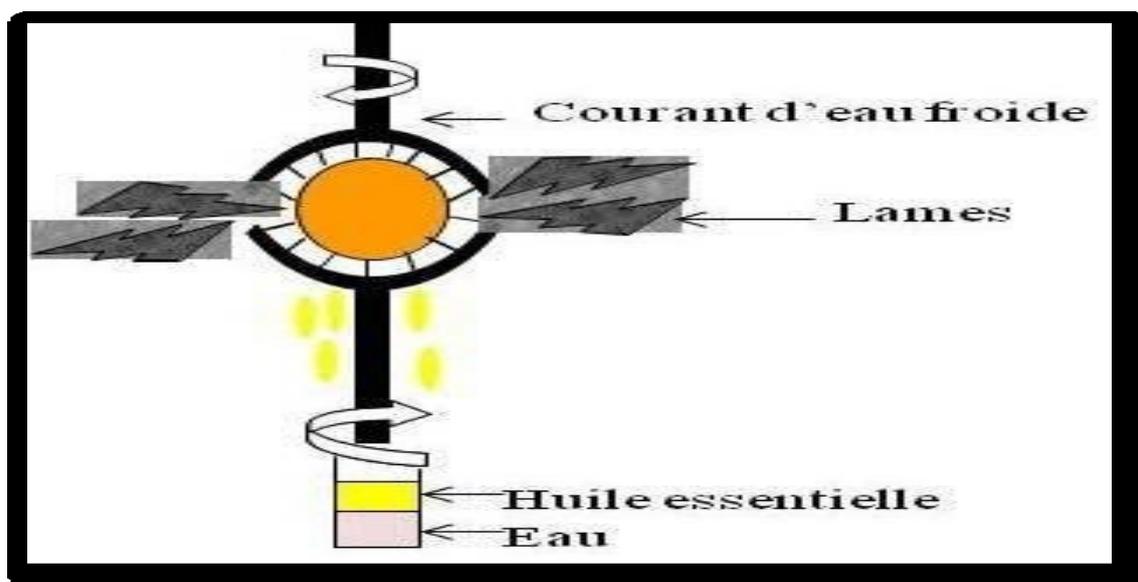


Figure 7: Schéma d'expression à froid (**Mnayer, 2014**)

8. Rôle des huiles essentielles

Les huiles essentielles jouent un rôle important dans la protection des plantes. Ils contiennent divers métabolites secondaires qui peuvent inhiber ou ralentir la croissance bactérienne (**Bouyahya et al, 2017**). Ils sont responsables de l'odeur caractéristique des plantes aromatiques, importante pour attirer les insectes pollinisateurs des graines. De plus, les huiles essentielles ont des effets défensifs contre les prédateurs et les maladies (**Moro et al, 2018**).

Bousquet, (1972) pensait que certains de ces produits seraient des composés intermédiaires du métabolisme et qu'ils seraient libres pendant certaines périodes liées à l'activité végétative de la plante.

Les monoterpènes et les sesquiterpènes peuvent jouer des rôles différents car ils sont importants dans la relation des plantes à leur environnement. Par exemple, le 1,8 cinéole et le

camphre ont inhibé la germination d'organes infectés ou la croissance d'agents pathogènes à partir de ces organes (Boueiz, 2016). Enfin, un développement de Croteau, (1986) suggère que les huiles volatiles auront bien un rôle dans la mobilisation de l'énergie lumineuse et des thermostats au profit de la plante.

9. Méthodes d'analyses des huiles essentielles

Il existe de nombreuses techniques pour l'analyse des huiles essentielles et les extraits végétaux, on peut distinguer les techniques chromatographiques de séparation

des composants chimiques, les techniques spectroscopiques et les techniques de couplage (Benazzouz, 2011).

9.1. Chromatographie en phase gazeuse

La GC est une méthode d'analyse par séparation et convient aux composés gazeux ou aux composés qui s'évaporent facilement par chauffage sans se décomposer. Les progrès technologiques dans les colonnes capillaires, les phases stationnaires et les détecteurs ont rendu la caractérisation GC de l'HE essentielle (Bouchonn *et* Libong, 2002).

L'unité GC se compose de trois parties : l'injecteur, la colonne et le détecteur, qui sont combinés dans un cadre. La phase mobile qui entraîne l'échantillon dans la colonne est un gaz appelé gaz porteur. L'analyse commence au moment où une très petite quantité d'échantillon liquide ou gazeux (1µl) est introduite via un micro-injecteur dans une seringue qui a la double capacité d'amener l'échantillon à l'état de vapeur et d'amener le flux de gaz vers le haut de la colonne. Celui-ci est logé dans une enceinte à température réglable (four) et contient la phase stationnaire **Figure 8 (Labidi, 2021)**.

Les différentes molécules contenues dans la phase gazeuse vont se séparer une à une et quitter la colonne vers le détecteur selon leur affinité avec la phase stationnaire (Al-Alam, 2017).

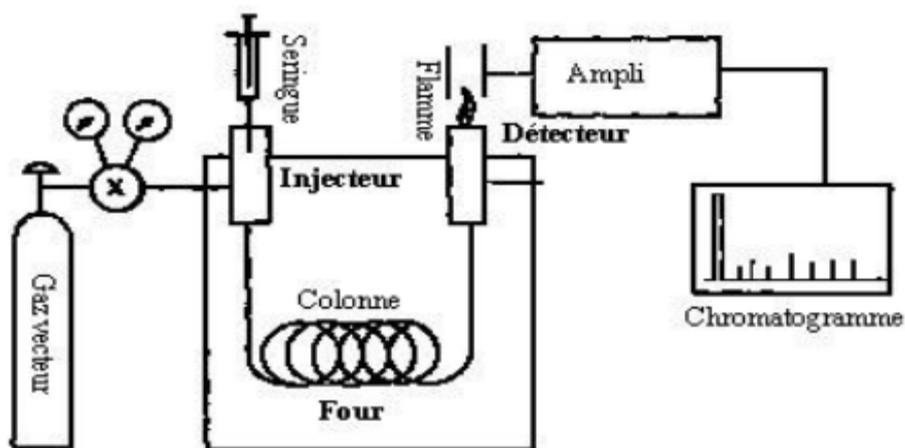


Figure 8: Schéma du principe d'un système CPG (Labidi, 2021).

9.2. Chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC-MS)

La chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse est aujourd'hui l'une des techniques les plus utilisées en chimie analytique. Le principe de cette technique est de transférer des composés séparés par chromatographie en phase gazeuse à travers une phase mobile (gaz vecteur) dans un spectromètre de masse pour les scinder en ions de masse variable dont la séparation sera basée sur leur masse. La principale difficulté rencontrée dans ce procédé de couplage est due à la grande différence de pression (Bendif, 2017).

En fait, la spectrométrie de masse nécessite des niveaux de pression très bas, tandis que la chromatographie en phase gazeuse nécessite des niveaux de pression plus élevés. L'identification est ensuite effectuée en comparant l'indice de rétention et le spectre de masse des composants individuels à ceux des produits de référence contenus dans une bibliothèque informatisée contenant des milliers de spectres (Ounoughi et Ramdani, 2021).

10. Mode d'action des huiles essentielles

Les huiles essentielles et leurs constituants ont des mécanismes d'action divers et très ciblés, affectant notamment les membranes cellulaires et le cytoplasme, et dans certains cas altérant complètement la morphologie cellulaire, voire affectant l'expression des gènes (Bouyahya *et al*, 2017).

Les HE sont des molécules lipophiles, ce qui leur permet de se répartir dans les lipides des membranes cellulaires bactériennes et de les désintégrer, augmentant ainsi leur

perméabilité (Oussalah *et al*, 2006). Les bactéries Gram-négatives agissent légèrement différemment : les composés hydrophobes de l'HE sont capables d'atteindre leur périplasme directement à travers les porines (Helander *et al*, 1998).

De manière générale, leurs actions se déroulent en trois étapes (Chouitah, 2012) :

- ✓ L'attaque de la paroi bactérienne entraîne une perméabilité accrue.
- ✓ Acidification à l'intérieur des cellules, entravant la production d'énergie.
- ✓ Détruire le matériel génétique qui cause la mort cellulaire

11. Activité antifongique de quelques huiles essentielles

Les huiles essentielles constituent une source potentielle de nouveaux médicaments antifongiques, soit sous forme pure, soit sous forme de dérivés des composés originaux pour optimiser l'efficacité thérapeutique, la rendre plus efficace et plus sûre (Peralta *et al*, 2015). Les huiles essentielles ou leurs composés actifs peuvent être utilisés comme agents protecteurs contre les champignons et les micro-organismes entrant dans les aliments (Juarez *et al*, 2016).

Les extraits les plus étudiés dans la littérature pour leurs propriétés antifongiques sont principalement obtenus à partir des plantes suivantes (*Menthe, Thym, Lavande, Romarin*, etc.) En effet, ils sont riches en composés phénoliques (Saliha *et Ahlem*, 2018).

11.1. Activité antifongique de l'huile d'olive

L'activité antifongique de cette huile est très puissante. Certains chercheurs révèlent qu'elle est en grande partie due à ses acides gras tels que les acides linoléique, oléique et linoléique (Kesari *et al*, 2010).

11.2. Activité antifongique de l'huile du Menthe poivrée

La menthe poivrée est riche en menthol, acétate de méthyle et menthone (Carlier-Loy, 2015). Les concentrations minimales inhibitrices (CMI) et les concentrations fongicides (CMF) de *Mentha* sur *Aspergillus Flavus* étaient inférieures à toutes les valeurs rapportées dans diverses études d'huiles essentielles étudiées, notamment *Lippia alba* (Shukla *et al*, 2009), *Cinnamomum glaucescens* (Prakash *et al*, 2013), *Cinnamomum jensenianum* (Tian *et al*, 2012) et *Canangaodorata* (Prakash *et al*, 2012) ainsi que des fongicides de synthèse

comme la nystatine (Prakash *et al*, 2010), ces informations confirment les recommandations d'utilisation des huiles essentielles à des dosages plus faibles pour une économie remarquable (Carlier-Loy, 2015).

11.3. Activité antifongique d'HE de lavande

L'huile essentielle de Lavande montre des activités fongistatique (inhibition de la croissance fongique) à la concentration de 0,062 % et fongicide (par atteinte de la formation de spores) contre les souches de *Candida Albicans* (Ozek, 2010). Les souches responsables d'infections vaginales sont plus sensibles à l'huile essentielle de Lavande que celles impliquées dans les infections oropharyngées (CMI 0,69 vs 1,04 %). Le linalol montre une activité cytotoxique élevée: à une concentration de 0,5%, toutes les cellules de *C.Albicans* sont détruites en 30 secondes tandis que l'acétate de linalyle à la concentration de 2 % tue 93 % des cellules en 30 min (D'auria *et al*, 2005). Le linalol est fongistatique tandis qu'à plus forte concentration (150 µg/ml), il est fongicide.

Cette activité fongistatique a été observée contre divers *Aspergillus* tels *A. Niger*, *A. ochraceus* et *A. Fumigatus* (Moon *et al*, 2007). L'activité fongicide des huiles essentielles de Lavande et Lavandin sur les mycéliums de *Tineapedis*, responsables du pied d'athlète, est renforcée par la chaleur (Inouye *et al*, 2007).

11.4. Activité antifongique d'huile clou de girofle

L'huile essentielle de clou de girofle possède une puissante activité antifongique contre les pathogènes fongiques opportunistes, comme le *Candidat albicans*, le *cryptococcus néoformés* ou l'*Aspergillus fumigatus*. Elle a été particulièrement efficace sur un modèle expérimental de vaginite murine sur un modèle animal (Goetz *et al*, 2010).

11.5. Activité antifongique de la nigelle

L'huile de nigelle est connue pour sa forte activité antifongique par rapport aux fongicides classiques. Des études précédentes ont montré que différents composants de cette huile avaient une activité importante contre les champignons pathogènes pour l'homme, notamment *Aspergillus flavus* et *Aspergillus Niger* (Asdadi *et al*, 2014).

12. Méthodes d'évaluation de l'activité antifongique**12.1. Méthode de diffusion (l'aromatogramme)**

Méthode d'utilisation de disques de cellulose stériles (diamètre : 6 mm) imprégnés d'huiles essentielles à tester. Ils sont déposés sur une surface gélosée stérile, fondue et coulée aseptiquement dans une boîte de Pétri où sont ensemencés les microorganismes à tester à raison de 10^7 à 10^8 germes/ml (**Boulaghmen et al, 2018**).

Le milieu utilisé pour les champignons est le PDA (**Potato dextrose agar**: milieu de culture spécifique). L'incubation se fait à 28°C de 3 à 5 jours.

Deux modes d'incorporation des huiles essentielles sont possibles : sur un disque de papier (**Omer et al, 1998 ; Aboutabl et El-Sakhawy, 2000**) ou dans le puits (trou) réalisé dans le milieu agar (**Ascensão et al, 1998 ; Baratta et al, 1998**).

12.1.1. La technique des disques

Actuellement, cette méthode est la plus connue et la plus couramment utilisée (**Fontanay et al, 2015**). Car elle permet d'accéder à des résultats essentiellement qualitatifs (**Hayes et Markovic, 2002**). Elle implique l'utilisation de disque en papier imprégnés des différentes substances à tester. Placer le disque sur la surface de la gélose et ensemencer uniformément la suspension microbienne à étudier (**Fauchère et Avril, 2002**). Pendant l'incubation, la substance diffuse dans la gélose (en surface et/ou dans la masse), ce qui crée un gradient de concentration selon la substance.

Lorsqu'une activité antifongique est observée, un halo d'inhibition se produit autour du disque. Le diamètre mesuré donne des données qualitatives sur l'inhibition, avec la règle suivante : "Plus le diamètre d'inhibition est grand, plus l'activité antimicrobienne de l'échantillon testé est importante" (**Fontanay et al, 2015**).

12.1.2. La technique de diffusion en puits

Il s'agit de créer une cavité dans la gélose. Cette cavité est ensuite remplie d'un volume donné d'huiles essentielles qui diffusent dans la gélose (**Rhayour, 2002 ; Wilkinson, 2006**). Après incubation, des zones d'inhibition de la croissance microbienne (pour les huiles actives) ont été obtenues et mesurées (**Dorman et Deans, 2000**).

Pour ces deux techniques, la sensibilité du germe testé peut être appréciée en fonction

du diamètre de l'inhibition obtenue. En effet, la sensibilité d'un germe est nulle pour un diamètre inférieur ou égal à 8 mm. Elle est limitée aux diamètres de 8 à 14 mm et moyenne aux diamètres de 14 à 20 mm. Pour un diamètre supérieur ou égale à 20 mm le germe est très sensible (**Bouzeraa-Bessila, 2013**).

12.2. Méthode de dilution de bouillon

La méthode de dilution en bouillon a également été utilisée pour déterminer la concentration minimale inhibitrice. Une gamme de dilutions d'huiles essentielles sont ajoutées à une série de tubes contenant des milieux de culture liquides de la composition appropriée. Après ensemencement des microorganismes étudiés et incubation dans les mêmes conditions, la concentration minimale inhibitrice est indiquée par le tube de dilution à partir duquel aucune croissance n'est observée. Cela signifie qu'aucune turbidité ou perturbation n'a été observée dans le milieu (**kechkar, 2008**). Des méthodes de micro-bouillon ont été également développées, utilisant des microplaques et de ce fait réduisant le volume de l'extrait requis (**Del-Vechio-Vieira et al, 2009**).

Une mesure de turbidité ou une utilisation d'un indicateur de viabilité des microorganismes permettent la détermination des concentrations minimales inhibitrices « *resazurine, methyl thiazol diphenyl tetrazolium (MTT)* » (**Hussain et al, 2010**).

12.3. Méthodes des micro-atmosphères

La méthode dite de la micro atmosphère, une méthode de diffusion sur disque d'agar légèrement modifiée, est parfaitement adaptée à l'estimation de l'activité des huiles essentielles en phase vapeur. Elle est utilisée pour définir l'activité des huiles essentielles qui doivent être employées comme conservateurs atmosphériques. Dans ce cas, un disque humidifié avec de l'huile essentielle est fixé au couvercle d'une boîte de Pétri, qui est ensuite inversée et incubée (**Bishop et Thornton, 1997**).

Il y a volatilisation de substances volatiles dans l'enceinte de la boîte. La lecture des résultats de ce test porte sur la croissance ou non de l'inoculum, se traduisant par un halot qui sera mesuré par un pied à coulisse (**Kellner et Kobert, 1954**).

Deuxième partie:
Partie expérimentale

Chapitre I:

Matériels et méthodes

1. Objectifs

Les champignons pathogènes sont considérés parmi les micro-organismes les plus dangereux qui ont un rôle majeurs dans l'apparition de nombreuses affections et troubles grâce à ça pathogénicité, c'est ce qu'il nous poussée de trouver des alternatifs efficaces et thérapeutiques pour minimiser ou inhiber la croissance fongique.

Dans ce contexte, notre étude est basée sur l'utilisation d'une huile essentielle commercialisée afin de tester leur activité antifongique sur deux champignons pathogènes d'abeille domestique *Apis mellifère* : *Aspergillus Niger* et *Ascosphaera Apis*.

2. Matériel

Le matériel utilisé pour la réalisation de cette étude est détaillé dans cette partie.

2.1. Échantillon

Nous avons isolé deux souches fongiques (*Aspergillus Niger* et *Ascosphaera Apis*), à partir des colonies d'abeille infectées.



Figure 9: La cire battue issue d'une colonie infectée (**originale**)

Ces souches ont été choisies parce qu'elles figurent parmi les genres les plus pathogènes qui provoquent des affections mycosiques nocives chez les abeilles.

2.2. Le milieu de culture

Le milieu de culture utilisé est le Sabouraud d'extrose agar, c'est un milieu favorable pour la croissance des champignons.

2.3. Les verreries

- ✓ Les boîtes de pétri
- ✓ Pipette pasteur
- ✓ Lames et lamelles
- ✓ Tube à essai

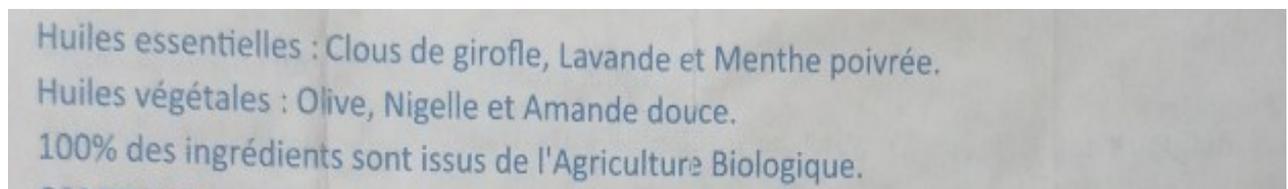
2.4. Les appareillages

- ✓ Étuve à 28°C
- ✓ Bain mari
- ✓ Bec benzène
- ✓ Four à moufle
- ✓ Microscope optique

2.5. Les réactifs

2.5.1. Produits naturels

Huile essentielle commercialisée composé de



2.5.2. Produits chimiques

- ✓ L'alcool.
- ✓ Le bleu de méthylène

2.6. Autre matériels

- ✓ Anse de platine
- ✓ Micropipette réglable
- ✓ Disques préparés par les papiers wattman
- ✓ Les embouts
- ✓ Scotche
- ✓ Pince
- ✓ Parafilme
- ✓ Pied à coulisse

3. Méthodes**3.1. Préparation de milieu de culture**

Le milieu de culture est préparé comme suit :

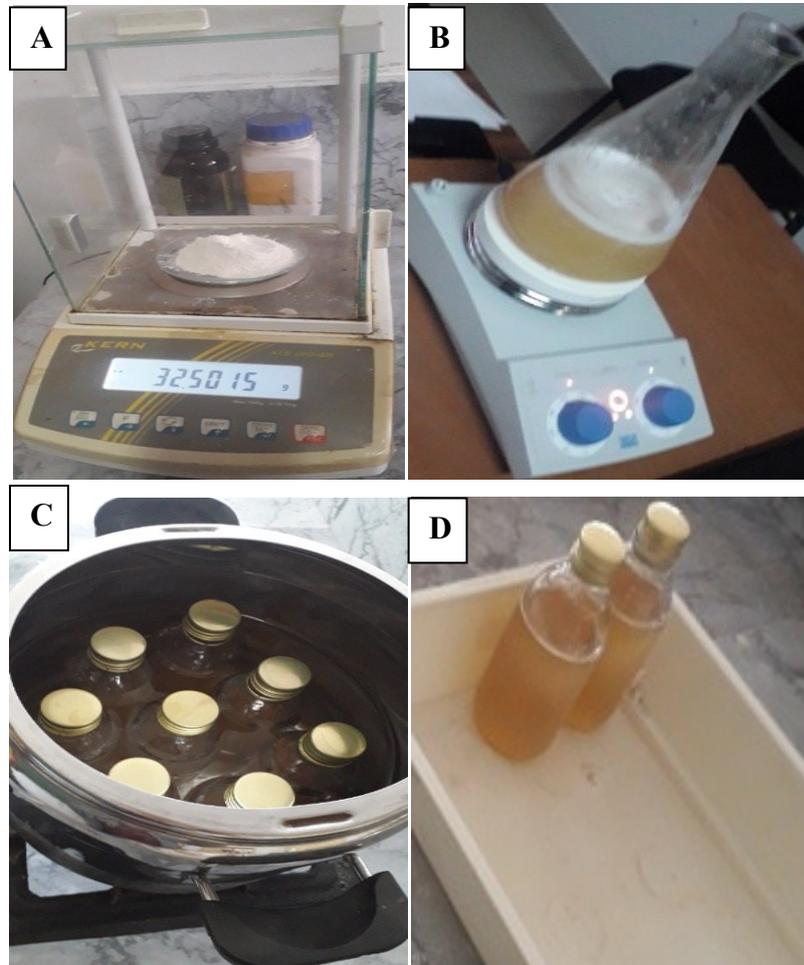


Figure 10: La préparation du milieu de sabouraud d'extrose agar. **A** : La pesée de 32,5 de poudre déshydratée de milieu de culture. **B** : Agitation et chauffage (mélange de la masse avec 500 ml d'eau distillé. **C** : l'autoclavage est fait à 120°C pendant 15 min. **D** : Le refroidissement du milieu (**Originale**)

3.2. Isolement et identification d'*Aspergillus Niger* et l'*Ascosphaera Apis***a. Ensemencement**

Le prélèvement d'un échantillon infecté de la cire battue, ensuite elle a été placée dans des boîtes de pétri contenant du milieu Sabouraud dans des conditions stériles et individuelle (**Figure 11**). L'incubation des boîtes de pétri à 28°C pendant 2 à 5 jours.

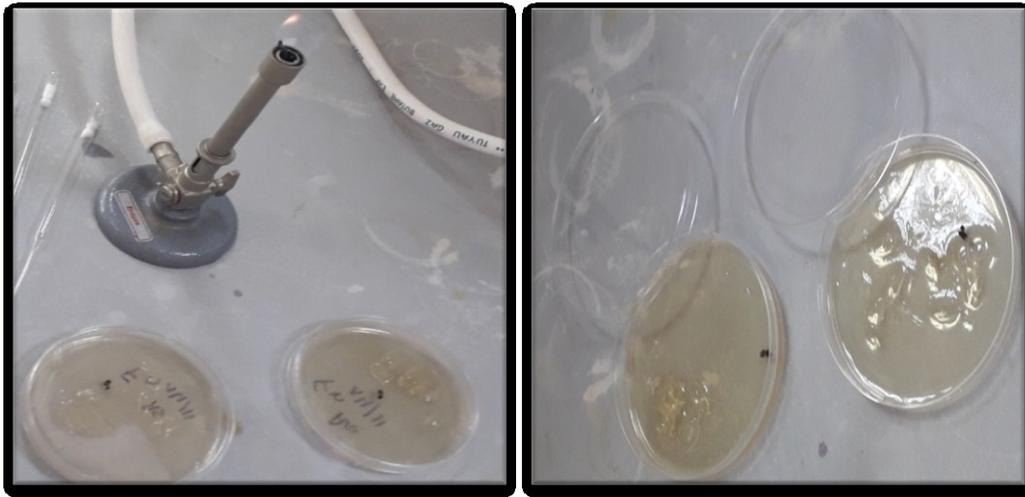


Figure 11: L'isolement d'*Aspergillus Niger* (Originale)

b. Purification

Le but de la purification est d'obtenir des colonies fongiques purifiées et spécifiques par un repiquage successive des colonies, pour identifier les champignons cibles. Ce qui se fait comme suite :

Un prélèvement d'un échantillon infecté de la cire battue est ensemencé sur un milieu de sabouraud d'extrose agar. La boîte est incubée dans l'étuve à 28°C pendant 5 jours. Après l'incubation, les colonies obtenues s'apparaissent en plusieurs aspects macroscopiques. A l'aide de l'extrémité inférieure d'une pipette pasteur stérile, deux disques mycéliens l'un blanc et l'autre noir ont été coupés. Puis, chacun a été déposé dans une nouvelle boîte de pétri en contact de mycélium avec le milieu de culture. Ensuite, Les boîtes de pétri contenant les colonies fongiques sont incubées. Cette opération doit être répétée jusqu'à l'obtention des colonies pures.

c. Identification

Après l'obtention des colonies pures, une étape d'identification de ces dernières basée sur l'observation des critères cultureux et morphologiques est réalisée par deux examens, macroscopique et microscopique.

1. Examen macroscopique

Cet examen est basé sur l'observation à l'œil nu de plusieurs critères culturels de la souche fongique en cause parmi eux : l'aspect des colonies, la couleur, le rêver, la forme, le diamètre et la vitesse de croissance.

Après l'incubation de l'*Aspergillus*. Les colonies apparaissent d'abord blanches, puis jaunes, et enfin granuleuses noires à la maturation. En effet, ce champignon produit également du mycélium aérien blanc et de très nombreuses structures sporifères érigées, pulvérulentes, brun-noir, qui est généralement disposées en cercles concentriques (**Quatresous, 2011**).

Le rêver de la colonie est incolore ou jaune clair (**Tabeuc, 2007**). Et la présence de gouttelettes aqueuses transpirées par le mycélium aérien (exsudats) (**Sadrati, 2021**).

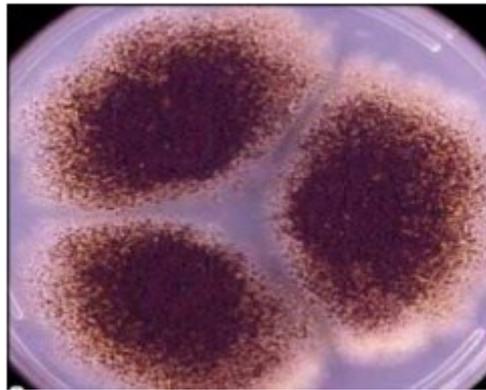


Figure 12: Aspect macroscopique d'*Aspergillus Niger* (**Belhamelet al, 2021**)

1. Examen microscopique

Plusieurs structures morphologiques de mycélium sont observées au Grossissement **X10** et **X40** (absence ou présence de cloisons, couleur, différenciation) et des spores (forme, couleur, texture de parois). Le prélèvement à l'aide d'une aiguille stérile une fraction mycélienne jeune (à l'extrémité de la colonie). Puis, on a été déposer sur une lame stérile qui contient une goutte d'eau. L'étalement bien délicatement de toute la fraction pour avoir une préparation homogène. L'ensemble est recouvert par une lamelle, en évitant la formation des bulles d'air. Ensuite, l'observation au microscope optique au grossissement **GX40**.

Des études microscopiques nous ont révélé que les têtes des conidies étaient en deux rangées, radiales et disposées en plusieurs colonnes brunes ou noires. Les vésicules sont sphériques et complètement fertiles. Les phialides sont portées par des métules brunes et de

taille variable. Les conidies sont généralement sphériques, parfois légèrement aplaties. Ils sont également bruns avec des bavures allongées (Chahbar, 2017).

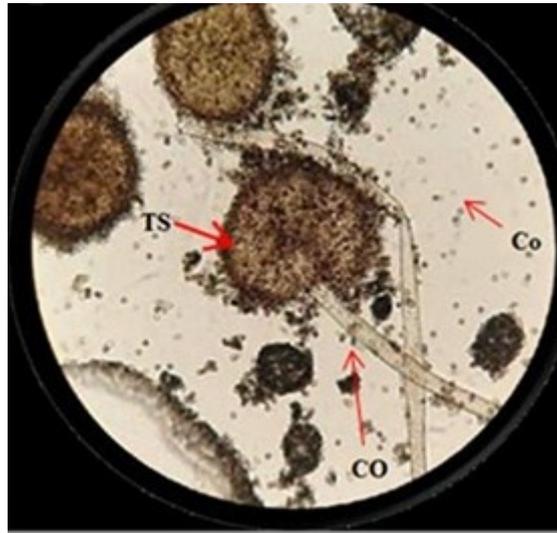


Figure 13: Observation microscopique (GX 40) . CO:conidiophore,TS: têtes porifère, Co:conidies globuleuse et brunes(Bouزيد, 2018)

a. Méthodes d'identification d'*Ascosphaera Apis*

1. Examen macroscopique

Basé sur l'observation de l'aspect du champignon dans une zone bien éclairée, en vérifiant l'uniformité des colonies (l'obtention des colonies identique). Les colonies sont blanches et denses, variant en diamètre de 5 cm à 8 cm. Après 8 jours de germination, le mycélium était blanchâtre et aérien.



Figure 14: Aspect macroscopique d'*Ascosphaera Apis*(Les colonies sont blanches) (Chahbar, 2017)

2. Examen microscopique

Cet examen, porte sur l'observation de la morphologie des spores, leur taille, et surtout la façon dont elles se fixent sur les filaments (séparation en ramifications, présence de produits phialides , etc.). Les hyphes ont des septa , qui fluctuent entre 2,5 μm et 8 μm de diamètre ,présentant une bi-ramification distincte .Les fructifications sont des kystes de spores sphériques (sporoblastes ou ascoma),variant entre 47 μm et 140 μm (**figure 15**) .

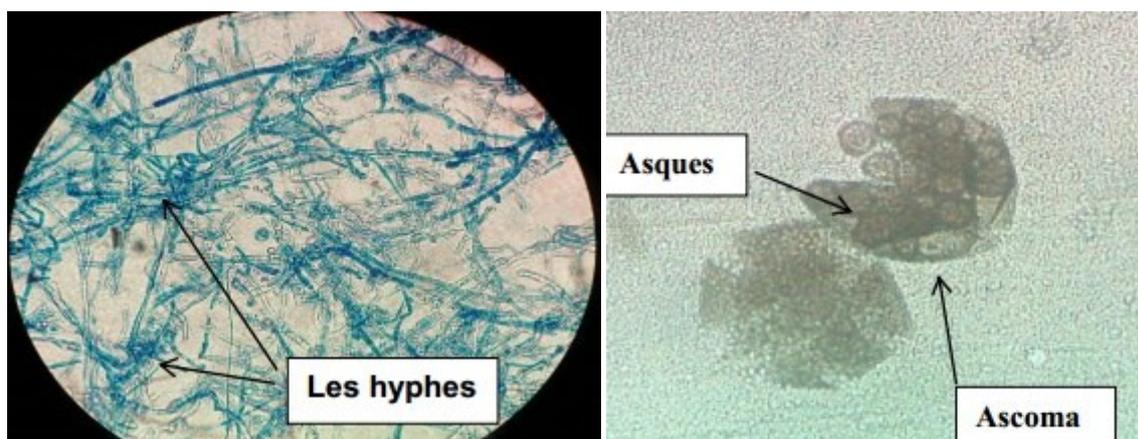


Figure 15: Aspect microscopique d'*Ascospaera Apis* (Chahbar, 2017)

2.2. Test de l'activité antifongique d'HE sur les deux souches fongiques

L'évaluation de l'activité antifongique de l'huile essentielle commercialisé est réalisée par la méthode de diffusion en gélose décrite par **Boulaghmen *et al* en 2018** .Elle consiste à l'utilisation des disques de papier wathman stériles déposés au centre des boites de pétri contenant le sabouraud d'extrose agar .Ces disques sera imbibés par différentes concentrations d'huiles essentielle commercialisé (20 μl ,40 μl , 60 μl , 80 μl et 100 μl). Chaque concentration est répétée 3 fois.

a. La préparation des disques

Les disques sont coupés à partir d'un papier wathman qui doivent posséder un contour régulier pour donner une zone d'inhibition qui sera facilement mesurable. Ensuite , ces disques sont stérilisés dans un four à moufle à 180°C pendant 20 min .

b. Le collage

L'utilisation d'un milieu de culture de sabouraud d'extrose agar ,autoclavé et fondu dans un bain mari , puis colée dans 17 boites de pétri .

c. L'ensemencement

Après la solidification du milieu. L'ensemencement se fait par le prélèvement à l'aide d'une anse de platine stérile une fraction mycélienne de l'*Aspergillus Niger*, puis l'ensemencement par stries de toute la surface de la gélose.

La même techniques est répétée pour les 16 boîtes de pétri restées.



Figure 16: Le collage et l'ensemencement

d. L'application des disques

Dans des conditions aseptiques et à l'aide d'une pince stérile, des disques de papier wathman (1 disque / boîte) sont déposés au centre de la gélose, précédemment inoculée avec la fraction mycélienne de l'*Aspergillus Niger*. Puis, les imbibés à l'aide d'une micropipette réglable par les 5 concentrations de l'huile essentielle (**Figure 17et 18**).

Chaque disque est imprégné par les doses suivantes : 20 μ l ,40 μ l , 60 μ l , 80 μ l et 100 μ l .

Chaque concentration est répétée 3 fois. Les boîtes de pétri sont incubés à 28°C pendant 2 à 5 jours.

Le témoin est réalisé dans les mêmes conditions sans disque et sans huile essentielle.



Figure 17: L'application de disque

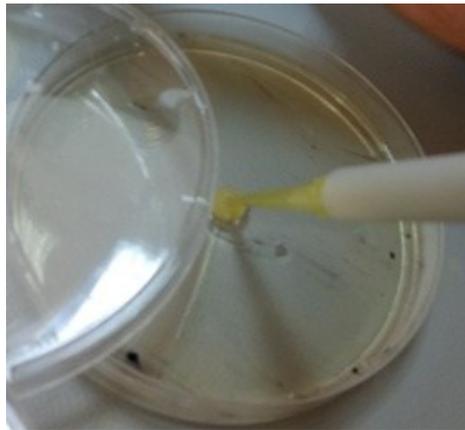


Figure 18: L'imprégnation de disque avec l'huile essentielle

e. La lecture

Après 5 jours d'incubation, l'activité antifongique est évaluée par l'apparition d'un halo d'inhibition de la croissance mycélienne autour des disques qui contiennent l'huile essentielle à tester.

L'utilisation de pied de coulisse pour prendre les mesures des diamètres des zones d'inhibitions dans les deux sens de la zone.

Pour *l'Ascospaera Apis* les mêmes étapes que *l'Aspergillus Niger* ont été suivies, avec une seule différence concernant l'ensemencement, dans laquelle la méthode d'ensemencement par disques est réalisée décrite par **Fontanay et al, 2015**).

Après l'application d'un disque de papier Whatman au centre de chaque boîte de pétri, la méthode est réalisée comme suit :

Deux disques mycéliens sont prélevés à l'aide de l'extrémité inférieure d'une pipette Pasteur, et ensuite déposés en contact direct avec la gélose de chaque boîte de pétri vis-à-vis l'autre (**Figure 19**). Les disques d'aromatogramme sont imbibés par les mêmes concentrations utilisés précédemment et par les mêmes répétitions, sauf les deux boîtes de témoins. Les boîtes sont mises à l'étuve à 28°C pendant 5 jours (**Figure 20**).

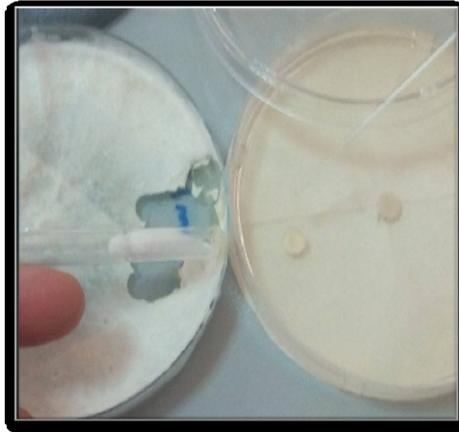


Figure 19: L'application des disques mycéliens

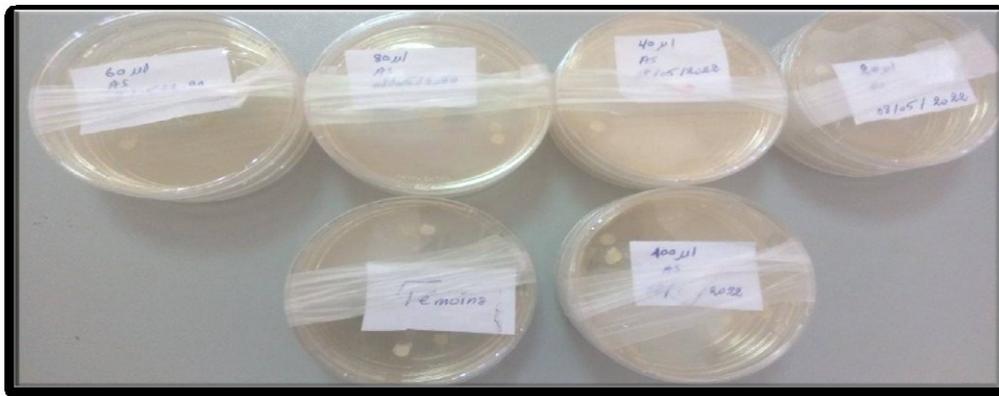


Figure 20: Les boîtes de pétri mise à l'étuve

2.3. Les analyses statistiques

Toutes les analyses statistiques sont effectuées par logiciel SAS version 9. La probabilité est choisie à 95 %. L'analyse descriptive est réalisée par la procédure Means dans SAS 9. Pour la comparaison des moyennes entre les différentes doses appliquées, le test non paramétrique de Wilcoxon est utilisé. Ainsi, un modèle linéaire généralisé (GLM) est réalisé pour comparer entre les différents facteurs fixes, à savoir les doses appliquées et les répétitions. Pour le groupement des doses homogènes, le test de Duncan-Waller est utilisé.

Chapitre II:

Résultats et Discussion

1. Résultats

1.1. Aspect microscopique et macroscopique des champignons étudiés

1.1.1. *Aspergillus Niger*

Les colonies d'*Aspergillus Niger* sont à croissance rapide (2 à 3 jours) sur le milieu de sabouraud, le mycélium extensif hyalin est immergé partiellement dans la gélose s'apparaisse sous forme des clones rondes, granuleuses et noires. Les têtes conidiennes sont noires, globuleuse à radiale. Elles sont portées par de longs conidiophores à paroi épaisse, lisse et incolore et se terminant en une vésicule globuleuse à sous globuleuse. Conidies globuleuse et parfois légèrement aplaties.

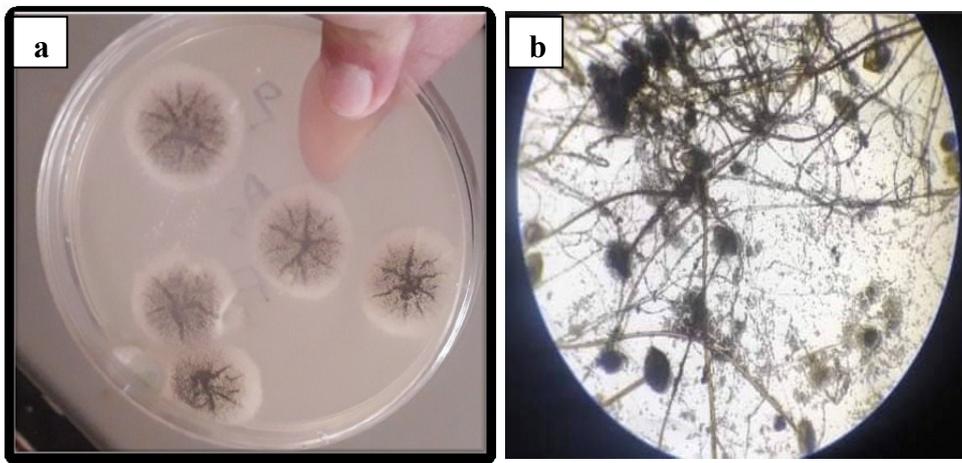


Figure 21: *Aspergillus Niger* après incubation à 28°C, **a** : Observation macroscopique, **b** : Observation microscopique (gx10)

1.1.2. *Ascospheera Apis*

Le mycélium est apparaisse blanc et dense. Les hyphes sont cloisonnés, les fructifications sont des sporanges sphériques (sporocytes ou ascomas).

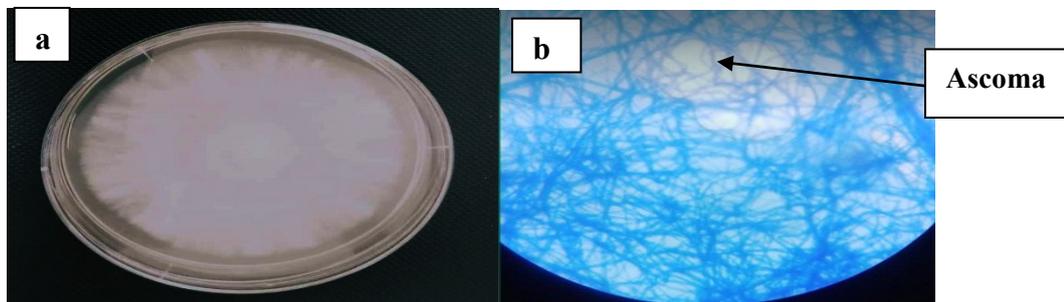


Figure 22: *Ascospheera Apis* après incubation , **a**: Observation macroscopique , **b** : Observation microscopique (G X 40)

1.2. Activité antifongique des huiles essentielles commercialisées

Les résultats indiquent que l’huile essentielle commercialisée a une activité sur les souches fongiques (**tableau 3 et 6**). On constate de calculer la moyenne des zones d’inhibition de *l’Aspergillus Niger* et *l’Ascosphaera Apis*.

1.2.1. Aspergillus Niger

1.2.1.1. Analyse descriptive

Nous avons utilisé pour ce test un témoin plus de 5 doses d'huile essentielle commercialisée, à savoir **20 , 40,60,80 et 100** pour une unité de **ul/disque** .

D’après le tableau de résultats (**Tableau 3**), plus qu'on augmente en concentration plus que la zone d'inhibition augmente, allant de $9,33 \pm 1,52$ mm jusqu'au $24,66 \pm 3,05$ mm pour respectivement les doses de 20ul/disque et 100 ul/disque, et ce pour le diamètre 1. Et quant au diamètre 2, les valeurs augmentent de 8 ± 2 jusqu'au $20,66 \pm 1,52$ mm pour les doses de 20 à 100 ul/disque respectivement

Tableau 3: L'activité antifongique d'huile essentielle commercialisée d’*Aspergillus Niger* mesurée en diamètre (**mm**)

Les doses	<i>Aspergillus Niger</i>	
	Diamètre 1 (mm)	Diamètre 2 (mm)
Témoin (µl)	0 ± 0	0 ± 0
20	9,33 ± 1,52	8 ± 2
40	12,33 ± 0,57	10 ± 1
60	13,83 ± 1,25	12,33 ± 1,15
80	16 ± 2	12 ,66 ± 3,51
100	24,66 ± 3,05	20,66 ± 1,52

1.2.1.2. Relation dose – efficacité

Par l’utilisation d'un test non paramétrique de WILCOXON.une différence hautement significative à été trouvée entre les différentes doses pour le diamètre 1 ($Kh^2 = 16,1938$; DDL = 5 ; $P = 0,0063$) et le diamètre 2 ($Kh^2 = 14,6990$; DDL = 5 ; $P = 0,0117$). Effectivement, l'analyse de différence pour l’utilisation d’un modèle linéaire généralisé a donné les mêmes

résultats .Une différence très hautement significative à été trouvé entre les différentes doses appliquées pour le diamètre 1 (Valeur de F= 66,43 ; DDL = 5 ; P < 0,0001) et le diamètre 2 (Valeur F =34,02 ; DDL = 5 ; P < 0,0001) avec des valeurs de R² qui égalent à 0,97 et 0,94 pour diamètre 1 et le diamètre 2 respectivement.

1.2.1.3. Similarité entre les répétitions

Pour chaque test, trois répétitions ont été appliquées sans aucune différence significative à été trouvé entre ces répétitions pour l'ensemble des diamètres estimés. Pour le diamètre 1 (Valeur F = 0,93 ; DDL = 2 ; P = 0,4253), en ce qui concerne le diamètre 2 (Valeur F = 0,22 ; DDL = 2 ; P = 0,8055).

1.2.1.4. Groupement des doses homogènes

A. Pour le diamètre 1

Le test de Ducan Waller a été utilisé pour grouper les doses homogènes, 5 groupes distinctifs ont été trouvés avec 2 groupes intermédiaires. Le groupe A contient seulement la dose maximale de 100 ul/disque .Le groupe B est représenté par deux doses (80 et 60 ul) . Pour le groupe C , on trouve les deux doses (60 et 40 ul) . Quant au groupe D , on observe les deux doses (20 et 40 ul) .Finalement , le groupe E qui contient seulement le témoin . Pour les groupes intermédiaires, nous avons constaté un groupe intermédiaire,BC qui est représenté par la dose 60 ul et le groupe intermédiaire CD qui contient la dose 40 ul (**Tableau 4**).

Tableau 4: Groupement des groupes homogènes pour le diamètre 1

Ducan Groupement		Moyenne	Nb	Traitement (ul)
	A	24,667	3	100
	B	16,000	3	80
	B			
C	B	13,833	3	60
C				
C	D	12,333	3	40
	D			
	D	9,333	3	20
	E	0,000	3	Témoin

B. Pour le diamètre 2

4 groupes distinctifs ont été trouvées avec un seul groupe intermédiaire . Le groupe A contient seulement La dose maximale de 100 ul. Le groupe B regroupe trois doses (40 , 60 et 80 ul) . Pour le groupe C on trouve les deux doses (20 et 40 ul) . Finalement, le groupe D qui contient seulement le témoin .Pour les groupes intermédiaires, nous avons constaté un seul groupe intermédiaire, BC qui est représenté par la dose 40 ul (**Tableau 5**).

Tableau 5: Groupement des groupes homogènes pour le diamètre 2

Ducan Groupement		Moyenne	Nb	Traitement (ul)
C C C	A	20.667	3	100
	B	12,667	3	80
	B	12,333	3	60
	B	10,000	3	40
	B	8,000	3	20
	D	0,000	3	Témoin

1.2.2. *Ascosphaera Apis*

1.2.2.1. Analyse descriptive

Nous avons utilisé pour ce test un témoin plus de 5 doses d'huile essentielle commercialisée, à savoir 20, 40, 60,80 et 100 ul /disque. D'après le tableau de résultats (**Tableau 4**), plus qu'on augmente en concentration plus que la zone d'inhibition augmente.

Le diamètre 1 allant de $3,66 \pm 1,52$ mm jusqu'au 19 ± 1 mm pour respectivement les doses de 20 ul /disque à 100 ul /disque. Et quant au diamètre 2, les valeurs augmentent de $2,33 \pm 1,52$ jusqu'au 17 ± 1 pour les doses de 20 à 100 ul /disque respectivement (**Tableau 6**).

Tableau 6: L'activité antifongique d'huile essentielle commercialisée d'*Ascosphaera Apis* mesurée en diamètre d'inhibition (mm)

Les doses	<i>Ascosphaera Apis</i>	
	Diamètre 1 (mm)	Diamètre 2 (mm)
Témoin (µl)	0 ± 0	0 ± 0
20	3,66 ± 1,52	2,33 ± 1,52
40	8,66 ± 3,21	5,66 ± 2,30
60	12 ± 1	9,33 ± 1,52
80	15 ± 1,73	12,33 ± 1,52
100	19 ± 1	17 ± 1

1.2.2.2. Relation dose – efficacité

Par l'utilisation d'un test non paramétrique de WILCOXON, une différence hautement significative à été trouvé entre les différentes doses pour le diamètre 1 ($Kh^2 = 16,4044$; DDL = 5 ; $P= 0,0058$) et le diamètre 2 ($Kh^2 = 16,3939$; DDL = 5 ; $P= 0,0058$) .Effectivement, l'analyse de différence pour l'utilisation d'un modèle linéaire généralisé à donné les mêmes résultats.

Une différence très hautement significative à été trouvé entre les différentes doses appliquées pour le diamètre 1 (Valeur F= 66,43 ; DDL = 5 ; $P < 0,0001$) et le diamètre 2 (Valeur F= 46,41 ; DDL = 5 ; $P < 0,0001$) avec une valeurs de $R^2 = 0,96$ pour les deux diamètres.

1.2.2.3. Similarité entre les répétitions

Pour chaque test, trois répétitions ont été appliquées sans aucune différence significative à été trouvé entre ces répétitions pour l'ensemble des diamètres estimés. Pour le diamètre 1 (Valeur F = 0,48; DDL = 2 ; $P < 0,6307$) , en ce qui concerne le diamètre 2 (Valeur F= 0,08 ; DDL = 2 ; $P < 0,9194$)

1.2.2.4. Groupement des doses homogènes

A. Pour le diamètre 1

Le test de Ducan Waller a à été utilisé pour grouper les doses homogènes, 5 groupes distinctifs ont été trouvé avec aucun groupes intermédiaires.

Le groupe A est représenté par une seule dose de 100 ul /disque. Pour le groupe B on trouve les deux doses (80 et 60 ul /disque) . Le groupe C contient seulement la dose de 40 ul /disque. Quant au groupe D on observe une seule dose de 20 ul /disque. Finalement, le groupe E qui est représenté par le témoin .Pour les groupes intermédiaires, nous avons constaté aucun groupes intermédiaires (**Tableau 7**).

Tableau 7: Groupement des groupes homogènes pour le diamètre 1

Ducan Groupement	Moyenne	Nb	Traitement (ul)
A	19,000	3	100
B	15,000	3	80
B	12,000	3	60
C	8,667	3	40
D	3,667	3	20
E	0,000	3	Témoin

B. Pour le diamètre 2

5 doses distinctives ont été trouvées avec l'absence des groupes intermédiaires. Le groupe A contient seulement la dose maximale de 100 ul /doses .Le groupe B est représenté par la dose de 80 ul /disque. Quant au groupe C on observe une seule dose de 60 ul /disque. Le groupe D qui contient seulement la dose de 40 ul /disque. Enfin, pour le groupe E on trouve la dose de 20 ul / disque et le témoin. On constate, l'absence des groupes intermédiaires (**Tableau 8**) .

Tableau 8: Groupement des groupes homogènes pour le diamètre 2

Ducan Groupement	Moyenne	Nb	Traitement (ul)
A	17,000	3	100
B	12,333	3	80
C	9,333	3	60
D	5,667	3	40
E	2,333	3	20
E			
E	0,000	3	Témoin

2.3. L'évaluation de l'activité antifongique des huiles essentielles commercialisées

Les résultats de l'activité antifongique des huiles essentielles sur milieu de sabouraud indiquent que celles-ci exercent une action inhibitrice sur la croissance mycélienne d'*Aspergillus Niger* et *Ascosphaera Apis* (**Figure 23 et 24**)

2.3.1. Pour l'*Aspergillus Niger*

Les résultats de la méthode de diffusion en gélose montrent que, plus qu'on augmente la dose d'huile essentielle commercialisée plus que la zone d'inhibition augmente (**Figure 23**).

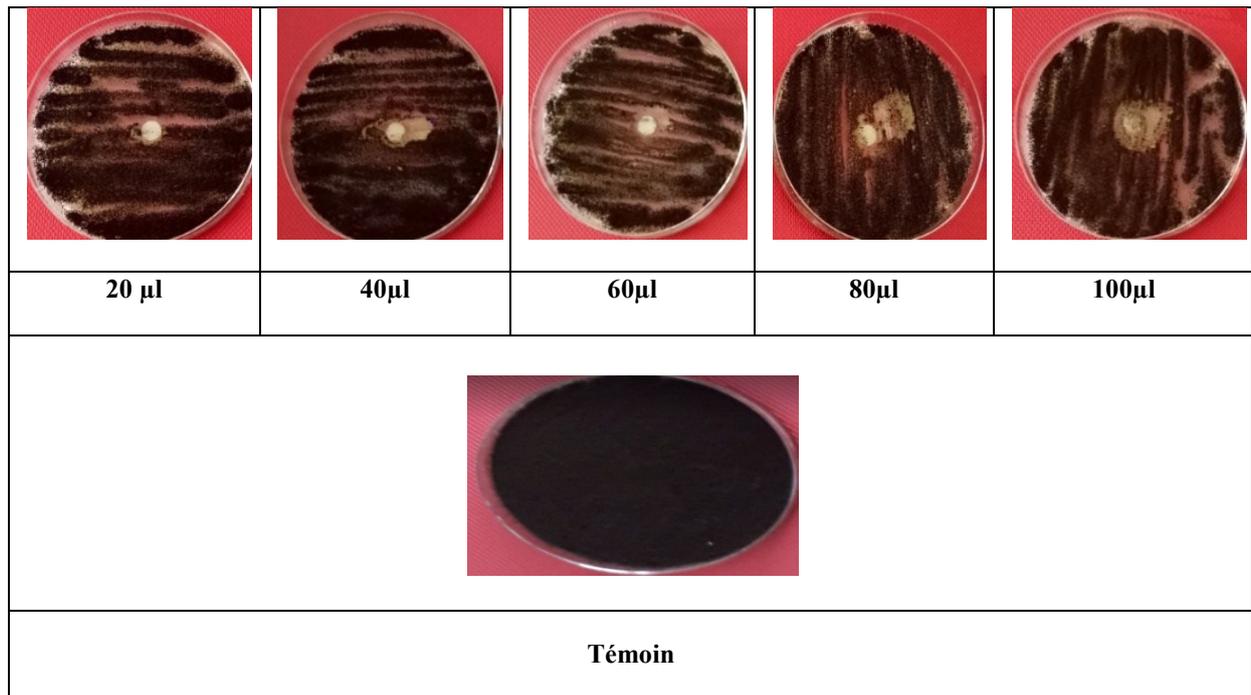


Figure 23: Résultat de test *d'Aspergillus Niger*

2.3.2. Pour l'*Ascospaera Apis*

D'après les résultats obtenus, on constate que la croissance *d'Ascospaera Apis* diminue lorsque les doses augmentent. Et la zone d'inhibition se diffuse en intermédiaire des disques mycéliens (**Figure 24**).

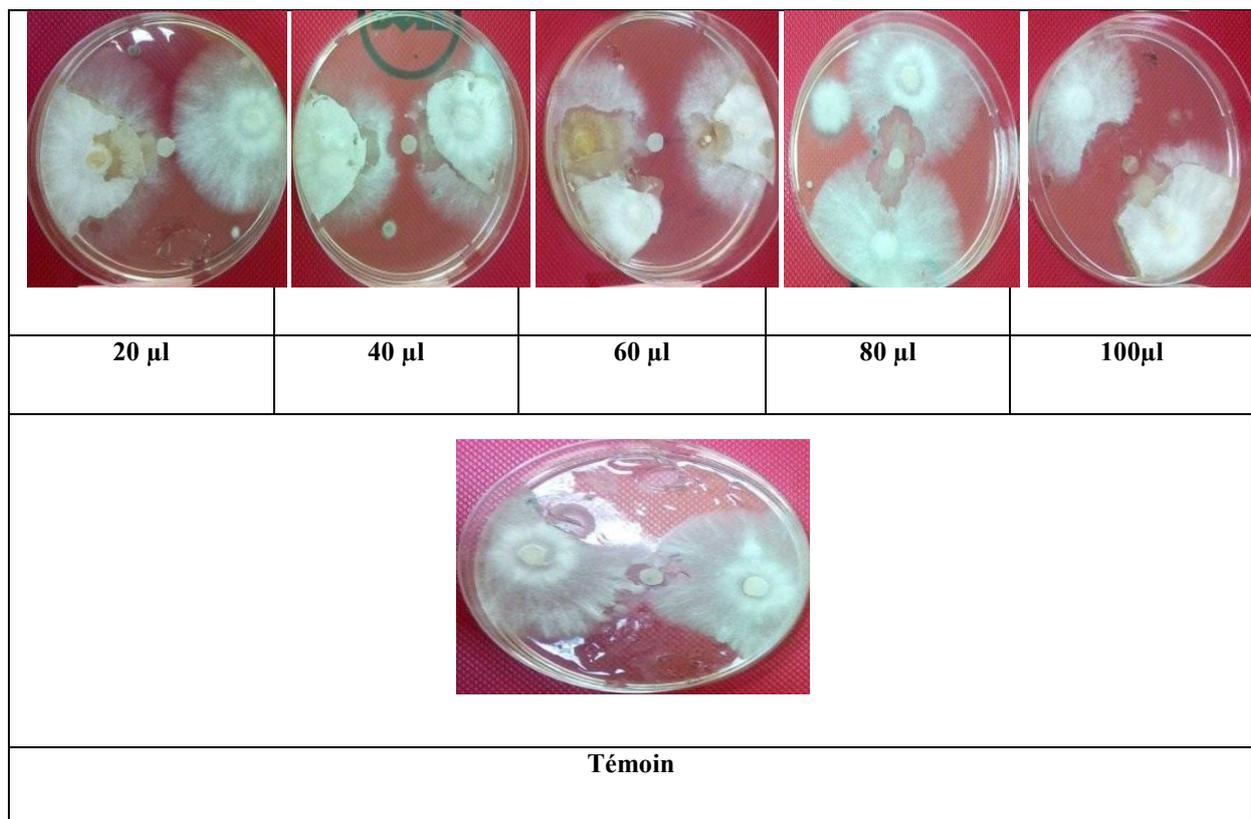


Figure 24: Résultat de test d'*Ascosphaera Apis*

2.4. La zone d'inhibition

Les résultats obtenus lors de la mesure de taux d'inhibition (% d'inhibition), sont représentés dont **le tableau 09** et **la figure 25**.

Ils semblent que le pourcentage d'inhibition augmente avec l'augmentation de la concentration d'huile essentielle commercialisée. Il varie entre 0,92% et 6,34% pour l'*Aspergillus Niger* et entre 0,11% et 4% pour l'*Ascosphaera Apis* pour les doses de 20 à 100 ul/disque. La concentration 100 ul semble la concentration la plus efficace contre les champignons ciblé avec des taux d'inhibition maximale de 6,34% pour *Aspergillus Niger* et un taux de 4% concernant l'*Ascosphaera Apis* (**Tableau 9**).

On remarque que le taux d'inhibition d'*A. Niger* est plus important que l'*A. Apis* pour toutes les respectivement concentrations utilisées. Il est et proportionnel avec la concentration d'huile essentielle (**Figure 25**).

Tableau 9: Pourcentage d'inhibition d'*A. Niger* et *A. Apis* en présence de différentes doses d'huile essentielle commercialisée

Les souches fongiques	T	20 ul	40 ul	60 ul	80 ul	100 ul
<i>A.Niger</i>	0	0,92%	1,53%	2,11%	2,53%	6,34%
<i>A.Apis</i>	0	0,11%	0,63%	1,40%	2,30%	4%

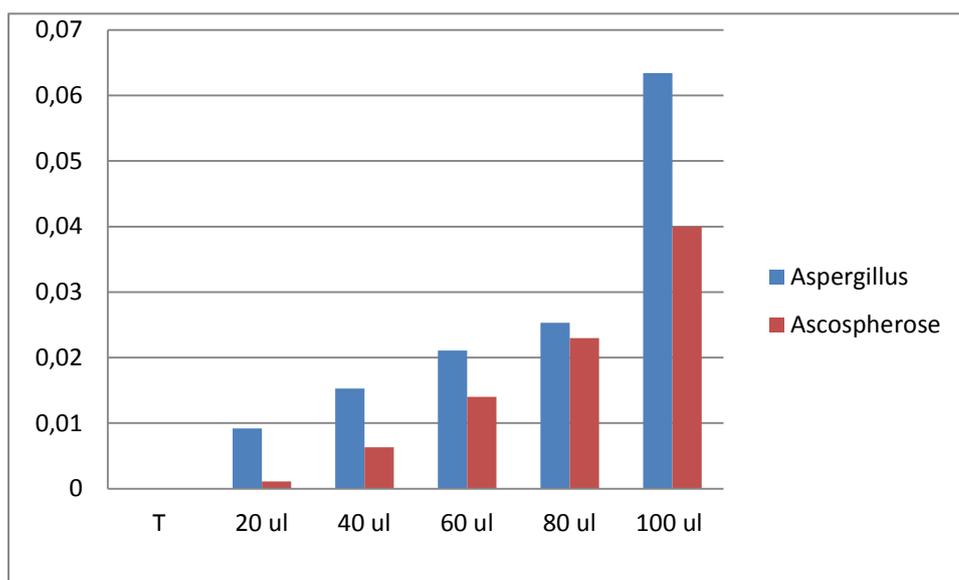


Figure 25: Histogramme de taux d'inhibition d'*Aspergillus Niger* et l'*Ascospheose*

2. Discussion

Les résultats obtenus par l'observation macroscopique d'*A. Niger*, sont similaires avec ce qui a été trouvé par plusieurs chercheurs (**Istikorini et Sari, 2022 ; Habisukan et al, 2021 ; Al-issawi et al, 2019**) qui ont montré que l'*Aspergillus Niger* possède des colonies rondes et noires sur la surface supérieure, et peu de mycélium aérien. De plus, plusieurs chercheurs (**Budiarti et Nuryanti ; Saryono et al, 2022 ; George et Ramteke ; Nalawade et al, 2019**) ont révélés que la morphologie microscopique d'*Aspergillus Niger* a montré des têtes conidiens larges, globuleuses et noires, qui sont devenues radiées et bisériées, tendant à se diviser en plusieurs colonnes. Les conidiophores étaient à parois lisses, hyalines devenant foncés vers la vésicule. Les conidies étaient globuleuses à sub globuleuses, noires et à parois rugueuses.

Même aspect macroscopique et microscopique d'*Ascospaera Apis* a été trouvé par (**Chahbar, 2017 ; Hemmerlé, 2015 ; Reynaldi et al, 2015 ; Jensen et al, 2013**) , ces auteurs ont relevés que les colonies d'*Ascospaera Apis* sont blanches et danses. L'examen microscopique a montré des hyphes septes avec la ramification dichotomique habituellement prononcée. Les corps de fructification, aussi appelés « sporocystes ».

Une différence hautement significative a été trouvée entre les différentes doses pour les diamètres d'*Aspergillus Niger* et *Ascospaera Apis*, Des résultats similaires sont obtenus par plusieurs auteurs (**Belhamel et al, 2021 ; Nadjat et Naima, 2019 ; Boutarfaia et Benyahia, 2015**). Ces auteurs ont trouvé que les diamètres de la croissance mycélienne ont diminué en parallèle avec l'augmentation de la dose des huiles essentielles, ceci peut être dû à la présence de plus de composés actifs avec l'accroissement de la concentration en huile essentielle. L'huile essentielle commercialisée exerce une efficacité contre les deux champignons pathogènes affectant l'abeille domestique à savoir *Aspergillus Niger* et *Ascospaera Apis*. **Villar-Rodríguez et al (2022)** ont montré que les huiles essentielles ont une thérapie alternative possible avec des preuves empiriques de bons résultats, et les effets antifongiques des HE peuvent être une solution très prometteuse pour surmonter les insuffisances thérapeutiques des médicaments antimycotiques qui augmentent avec l'apparition de souches résistantes. **El mehdi et al (2021)** ont constaté que l'effet antifongique de ces composés volatiles est dû à sa richesse en composés terpéniques, alcooliques et phénoliques avec des concentrations relativement différentes.

Des chercheurs ont montré qu'il ya d'autres produits naturels qui sont efficaces contre les infections mycosique, parmi ces auteurs, nous citons **Angaman et al(2018)** et **Hassikou et al(2014)**. Ces chercheurs ont montré que l'*Aspergillus Niger* possède une efficacité sur l'extrait d'écorce éthanolique . De plus, d'autres auteurs (**Colin et al, 2007 ;Albo et al, 2003 ;Colin et al, 1989**) ont montré que des huiles essentielles de labiées (*thym type carvacol, origan*) présentent des pouvoirs fongicides sur *Ascosphaera Apis*, déterminés in vitro.

Aucune différence significative n'a été trouvée entre les répétitions pour l'ensemble des diamètres estimés, cela peut être justifié par les meilleures conditions de manipulations au laboratoire relatif à trois principaux paramètres. Premièrement, le milieu de culture qui a été préparé correctement, par le respect du protocole et le mode de sa préparation. Deuxièmement, l'isolement, qui a été effectué adéquatement dans des conditions d'asepsie. Troisièmement, l'incubation qui a été faite sans aucun problème de contamination par des levures ou autre microorganismes.

Nous avons utilisé différentes doses pour tester l'efficacité d'une huile essentielle commercialisée. Cependant, l'inhibition n'a pas atteint un taux maximal de 100%. Tandis que ce travail de recherche doit être complété par d'autres études afin d'évaluer la dose qui inhibe la croissance à 100%. En effet, plusieurs chercheurs (**Boutarfaia et Benyahia, 2015 ;Belhamel et al, 2021**) rapportent que les champignons ont montré une sensibilité accrue à l'augmentation de la concentration de l'huile essentielle dans leur milieu de culture où le diamètre de la colonie se réduit à chaque fois qu'on augmente la dose jusqu'à une inhibition totale où aucune croissance n'est observée.

Les résultats de l'activité antifongique des huiles essentielles indiquent que celles-ci exercent une action inhibitrice sur la croissance mycélienne d'*Aspergillus Niger* et *Ascosphaera Apis*. Des résultats similaires sont obtenus par certains auteurs (**Belhamel et al,2021 ;Nadjet et Naima, 2019 ;Boutarfaia et Benyahia, 2015**).Ces auteurs ont trouvé que les diamètres de la croissance mycélienne ont diminué en parallèle avec l'augmentation de la dose des huiles essentielles, ceci peut être dû à la présence de plus de composés actifs avec l'accroissement de la concentration en huile essentielle. Certains chercheurs ont suivi la même méthode dont nous avons utilisé (**Khaldi et al, 2021 ; Abou Nabila, 2017**). Ils ont signalé que l'évaluation de l'activité antifongique des HEs est influencée par la méthode de test utilisée.

Le taux d'inhibition est proportionnel avec la concentration d'huile essentielle commercialisée vis-à-vis l'*Aspergillus Niger* et *Ascosphaera Apis*. Des études similaires ont été menées sur le champignon *Aspergillus Niger*, dont l'inhibition a été assurée par l'extrait d'écorce éthanolique.

Les taux d'inhibition suivant la relation dose-effet après 7 jours d'incubation ont été $53,21 \pm 11,35$ % pour la plus petite concentration et $92,17 \pm 11,12$ % pour la plus grande concentration (**Angaman et al, 2018 ;Hassikou et al, 2014**). En effet, les traitements appliqués ont montré une importante activité antifongique due à la forte inhibition de la croissance mycélienne et de la germination des conidies (**AyónReyna et al, 2022**).

Par conséquent, l'analyse de l'effet inhibiteur des huiles essentielles sur les champignons et les mycotoxines nous aidera à éliminer la pollution due aux champignons et aux mycotoxines et à mieux protéger la santé humaine et animale (**Cai et al, 2022**).

Les résultats obtenus sont encourageants et suggèrent l'utilisation des huiles essentielles comme agents antifongiques potentiels pour la lutte contre les champignons pathogènes (**Hamdani et al, 2021**).

Conclusion et perspectives

Conclusion et perspectives

L'émergence de souches fongiques responsables d'infections mycosiques conduit à la recherche d'alternatives thérapeutiques efficaces. Par conséquent, le traitement chimique aux huiles essentielles est l'une des meilleures méthodes qui ont été utilisées efficacement contre la contamination et les infections fongiques.

Dans ce contexte, ce travail a été consacré à tester et évaluer l'activité antifongique d'une huile essentielle commercialisée contre la croissance mycélienne de deux champignons pathogènes (*Aspergillus Niger* et *Ascosphaera Apis*) infectant les abeilles mellifères.

D'autre part, cette huile essentielle commercialisée peut être utilisée afin de limiter d'autres moyens de lutte contre les champignons pathogènes, notamment avec des doses plus élevées que celles de notre étude.

Les résultats obtenus révèlent une activité antifongique marquée de l'huile essentielle commercialisée sur *Aspergillus Niger* et *Ascosphaera Apis*. Cette efficacité reste variable selon les doses. Toutefois son pouvoir antifongique en général n'inhibe pas complètement la croissance des champignons, de ce fait l'évaluation de l'effet de ce traitement sur le pouvoir des souches fongiques devrait être liée à la nature de ces champignons.

Une augmentation de la concentration de l'HEs commercialisée peut entraîner une augmentation dans le pouvoir inhibiteur de celle-ci, les diamètres de la croissance mycélienne ont évolué en fonction de la durée d'incubation et ont augmenté avec l'augmentation de la concentration d'huile essentielle commercialisée. Ces résultats montrent que l'HEs commercialisée exerce une activité antifongique plus forte sur *Aspergillus Niger* que celle d'*Ascosphaera Apis*.

D'après ces résultats, les HEs commercialisée reste des produits alternatives thérapeutique moins efficace que celles naturelles obtenus par l'extraction. On peut penser alors qu'elles méritent une étude plus approfondies, afin d'obtenir une efficacité élevée contre les activités antifongique. En conclusion, nous disons que le test de l'activité antifongique des HEs a encore besoin de nombreuses études pour découvrir ses secrets, et notre étude n'était rien d'autre qu'une tentative de découvrir l'efficacité des huiles essentielles commercialisée sur les champignons pathogènes.

Références bibliographiques

Références bibliographiques

- Abed, A. R. A. B. I. (2018). *Effet antimicrobien des huiles essentielles de Pistacia Lentiscus L. sur quelques espèces bactériennes multirésistantes de la microflore digestive humaine* (Doctoral dissertation, Université Abdelhamid Ibn Badis).
- Abou Nabila, F. K. (2017). *Activité antioxydante et antimicrobienne des huiles essentielles de Mentha pulegium L* (Doctoral dissertation).
- Aboutabl, E. A., El-Sakhawy, F. S., Fathy, M. M., & Megid, R. M. A. (2000). Composition and Antimicrobial Activity of the Leaf and Fruit Oils from Amooa rohituka Wigth. et Arn. *Journal of Essential Oil Research*, 12(5), 635-638.
- Adjlane, N. (2012). *Etude des principales maladies bactériennes et virales de l'abeille locale Apis mellifera intermissa dans la région médio-septentrionale de l'Algérie* (Doctoral dissertation).
- Adjlane, N., & KOUAS, H. (2021). Les méthodes de l'insémination artificielle des reines d'abeille. *Maghrebian Journal of Pure and Applied Science*, 7(2).
- Adoubryn, K. D., Ouhon, J., Cisse-Camara, M., Eholie, S. P., Brou, K. J., Kouadio-Yapo, C. G., ... & Kone, M. (2006). Étude biochimique et sérotypique de 40 souches de Cryptococcus neoformans isolées de patients VIH+ à Abidjan (Côte-d'Ivoire). *Journal de Mycologie Médicale*, 16(2), 95-99.
- Agbo-Godeau, S., & Guedj, A. (2005). Mycoses buccales. *EMC-Stomatologie*, 1(1), 30-41.
- Al-Alam, J. (2017). *Polluants organiques: analyse, application au «biomonitoring» environnemental et introduction des biopesticides (algues marines) comme alternative* (Doctoral dissertation, Université de Strasbourg; Université libanaise).
- Albo, Graciela N., HENNING, Cynthia, RINGUELET, Jorge, et al.(2003). Evaluation of some essential oils for the control and prevention of American Foulbrooddisease in honeybees. *Apidologie*, , vol. 34, no 5, p. 417-427.
- Al-Issawi, H. A., Alwan, S. L., & AL-Abedy, A. N. (2019). Molecular diagnosis of different isolates of Aspergillus niger isolated from grapes. *Molecular diagnosis*, 4(3).
- Angaman, R. K., Orsot, B. M. A. B., Camara, D., Abo, K., & Zirihi, N. G. (2018). Etude ethnobotanique de plantes de la flore du Département d'Abengourou, en Côte d'Ivoire et évaluation in vitro de l'activité antifongique d'extraits de TerminaliasuperbaEngl. Diels sur deux

Références bibliographiques

espèces de champignons, *Aspergillus niger* Van Tieghem et *Fusa*. *International Journal of Biological and Chemical Sciences*, 12(3), 1208-1224.

Angaman, R. K., Orsot, B. M. A. B., Camara, D., Abo, K., & Zirihi, N. G. (2018). Etude ethnobotanique de plantes de la flore du Département d'Abengourou, en Côte d'Ivoire et évaluation in vitro de l'activité antifongique d'extraits de *Terminalia superba* Engl. Diels sur deux espèces de champignons, *Aspergillus niger* Van Tieghem et *Fusa*. *International Journal of Biological and Chemical Sciences*, 12(3), 1208-1224.

Ascensao, L., Figueiredo, A. C., Barroso, J. G., Pedro, L. G., Schripsema, J., Deans, S. G., & Scheffer, J. J. (1998). *Plectranthus madagascariensis*: morphology of the glandular trichomes, essential oil composition, and its biological activity. *International Journal of Plant Sciences*, 159(1), 31-38.

Asdadi, A., Harhar, H., Gharby, S., Bouzoubaâ, Z., Yadini, A. E., Moutaj, R., ... & Hassani, L. M. I. (2014). Chemical composition and antifungal activity of *Nigella Sativa* L. oil seed cultivated in Morocco. *International Journal of Pharmaceutical Science Invention*, 3(11), 09-15.

Ayón Reyna, L. E., Uriarte Gastelum, Y. G., Camacho Díaz, B. H., Tapia Maruri, D., López López, M. E., López Velázquez, J. G., & Vega García, M. O. (2022). Antifungal Activity of a Chitosan and Mint Essential Oil Coating on the Development of *Colletotrichum Gloeosporioides* in Papaya Using Macroscopic and Microscopic Analysis. *Food and Bioprocess Technology*, 1-11.

Bailey, L. (1966). The effect of temperature on the pathogenicity of the fungus, *Ascosphaera apis*, for larvae of the honey bee, *Apis mellifera*. *Insect Pathology and Microbial Control*, 162.

Bamford, S., & Heath, L. A. F. (1989). The infection of *Apis mellifera* larvae by *Ascosphaera apis*. *Journal of apicultural research*, 28(1), 30-35.

Baratta, M. T., Dorman, H. D., Deans, S. G., Figueiredo, A. C., Barroso, J. G., & Ruberto, G. (1998). Antimicrobial and antioxidant properties of some commercial essential oils. *Flavour and fragrance journal*, 13(4), 235-244.

Belhamel, I., Belaachi, B., & Zellagui, A. (2021). Les Huiles essentielles a usage therapeutique.

Belhamel, Imane, Bouthayna Belaachi, and Amar Zellagui. (2021). "Les Huiles essentielles a usage therapeutique."

Références bibliographiques

Belkhiri, F. Z. (2015). *Etude de l'activité antibactérienne des huiles essentielles de Rosmarinus officinalis L* (Master's thesis).

Benazzouz, M. A. (2011). *Les huiles essentielles, importance et potentialités: Mise à jour bibliographique des dernières recherches sur leurs emplois et toxicité, et analyse de la composition des huiles essentielles de quinze plantes des plus consommées au Maroc* (Doctoral dissertation).

Bendif H., 2017. Caractérisation phytochimique et détermination des activités biologiques in vitro des extraits actifs de quelques *Lamiaceae*: *Ajuga reptans* (L.) Schreb., *Teucrium polium* L., *Thymus munbyanus* subsp. *coloratus* (Boiss. & Reut.) Greuter & Burdet et *Rosmarinus eriocalyx* Jord & Fourr. Thèse de Doctorat en Sciences Biologiques. L'Ecole Nationale Supérieure de Kouba-Alger. P198.

Benmeggoura, R., Zerroukhi, A., & Bouhabila, A. (2021). Contribution à l'étude phytochimique et l'activité antioxydante et antibactérienne de quelques extraits de *Pistacia lentiscus* L de l'Est Algérien.

Berdi, S., Boukadoum, R., & Bouziane, Z. E. (2009). *Etude bibliographique de l'antagonisme entre les champignons* (Doctoral dissertation, Université de Jijel).

Bishop, C. D., & Thornton, I. B. (1997). Evaluation of the antifungal activity of the essential oils of *Monarda citriodora* var. *citriodora* and *Melaleuca alternifolia* on post-harvest pathogens. *Journal of Essential Oil Research*, 9(1), 77-82.

Botton, B., Breton, A., Fèvre, M., Guy, P., Larpent, J. P., & Veau, P. (1990). Moisissures utiles et nuisibles. Importance industrielle.

Bouchonnet, S., & Libong, D. (2004). Le couplage chromatographie en phase gazeuse-spectrométrie de masse. *ACTUALITE CHIMIQUE*, 7-14.

Boueiz, J. (2016). Étude de la composition chimique et de l'activité antimicrobienne des composants volatils des huiles essentielles de *Matricaria recutita* L. et *Artemisia herba-alba* Asso.

Bougara, M. H. (2016). La culture du fraisier est en plein développement mais la production reste encore faible malgré son grand pouvoir d'adaptation qui nécessite beaucoup de soins et d'entretien. Cependant, le fraisier rencontre beaucoup de problèmes phytosanitaires, tels que les. *Revue Agrobiologia*, 6(2).

Références bibliographiques

Boukhatem, M. N., Ferhat, A., & Kameli, A. (2019). Méthodes d'extraction et de distillation des huiles essentielles: revue de littérature. *Une*, 3(4), 1653-1659.

Boulaghmen, F., Chaouia, C., Hazzit, M., Nouas, M., & Saidi, F. (2018). Chemical composition and microbial activity of essential oil extract from *Thymus guyonii* de Noé from Aflou Algeria. *AgroBiologia*, 8(1), 853-862.

Bourouda, N. (2010). *Place de l'antifongigramme dans la prise en charge des infections fongiques* (Doctoral dissertation).

Bousquet, A. (1972). Plantes médicinales du Congo Brazzaville: *Uvariopsis pauridiantha*. *Diospyros ORSTOM, Paris*.

Boutarfaia, a., & benyahia, I. (2015). Contribution à l'extraction et l'activité de l'huile essentielle du *Pélargonium graveolens* 'L'Hér' de la région d'Ouargla (*Doctoral dissertation*).

Bouyahya, A., Abrini, J., Bakri, Y., & Dakka, N. (2018). Les huiles essentielles comme agents anticancéreux: actualité sur le mode d'action. *Phytothérapie*, 16(5), 254-267.

Bouyahya, A., Bakri, Y., Et-Touys, A., Talbaoui, A., Khouchlaa, A., Charfi, S., ... & Dakka, N. (2017). Résistance aux antibiotiques et mécanismes d'action des huiles essentielles contre les bactéries. *Phytothérapie*, 1-11.

Bouzeraa-Bessila, M. (2013). Chemical study of two natural substances extracted from *Medicago sativa* grown on different soils and analysis of their effects on the growth of some pathogenic bacteria. *TOJSAT*, 3(1), 46-51.

Bouزيد, D. (2018). *Évaluation de l'activité biologique de l'huile essentielle d'une plante endémique Hélichrysum italicum (Roth) G. DON* (Doctoral dissertation).

Brunechon, J. (1987). Pharmacognosie, Ecole technique de documentation. *Ravoilie*.

Bruneton, J. (1999). Huiles essentielles. Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales. *Doc et Tec*.

Budiarti, L., & Nuryanti, N. S. P. (2022, April). Entomopathogenic Fungus from Rice Rhizosphere Soil in Politeknik Negeri Lampung Land. In *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science* (Vol. 1012, No. 1, p. 012059). IOP Publishing.

Références bibliographiques

- Cai, J., Yan, R., Shi, J., Chen, J., Long, M., Wu, W., & Kuca, K. (2022). Antifungal and mycotoxin detoxification ability of essential oils: A review. *Phytotherapy Research*, 36(1), 62-72.
- Carlier-Loy, P. (2015). *Mentha spicata: description et utilisations en thérapeutique et en agriculture comme antigerminatif sur la pomme de terre* (Doctoral dissertation, UNIVERSITE DE PICARDIE JULES VERNE).
- Chabasse, D. (2008). *Classification des champignons d'intérêt médical*. EMC - Maladies Infectieuses, 5(4), 1-10. doi:10.1016/s1166-8598(08)50187-6
- Chabasse, D., Bouchara, J. P., De Gentile, L., Brun, S., Cimon, B., & Penn, P. (2002). Les moisissures d'intérêt médical. *Cahier de formation*, (25).
- Chahbar, M. (2017). *Principales maladies et ennemis de l'abeille domestique Apis mellifera L., 1758 en Algérie* (Doctoral dissertation).
- Chaima, A. I. D., & Ghania, Z. (2018). Etude de l'activité antifongique des huiles essentielles de Rosmarinus officinalis L. et du Thymus capitatus L. sur des agents d'otomycose: Cas d'Aspergillus niger.
- Chenni, M. (2016). Etude comparative de la composition chimique et de l'activité biologique de l'huile essentielle des feuilles du basilic «Ocimum basilicum L.» extraite par hydro-distillation et par micro-ondes. *Mémoire de doctorat, université d'Oran, 1*.
- Chouitah, O. (2012). *Composition chimique et activité antibactérienne des huiles essentielles des feuilles de Glycyrrhiza glabra* (Doctoral dissertation, Université d'Oran1-Ahmed Ben Bella).
- Colin, M. E., de Lahitte, J. D., Larribau, E., & Boué, T. (1989). Activité des huiles essentielles de Labiées sur Ascophaera apis et traitement d'un rucher. *Apidologie*, 20(3), 221-228.
- Colin, Marc-Edouard, MARCHAND, Patrice, et BONMATIN, Jean-Marc. (2007) *L'apiculture écologique*. L'Écologiste, vol. 21, p. 41-43.
- Croteau, R. (1986). Biochemistry of monoterpenes and sesquiterpenes of essential oils. *Herbs, spices, and medicinal plants: recent advances in botany, horticulture, and pharmacology*.
- D'auria, F. D., Tecca, M., Strippoli, V., Salvatore, G., Battinelli, L., & Mazzanti, G. (2005). Antifungal activity of Lavandula angustifolia essential oil against Candida albicans yeast and mycelial form. *Medical mycology*, 43(5), 391-396.

Références bibliographiques

Del-Vechio-Vieira, G., Sousa, O. V., Yamamoto, C. H., & Kaplan, M. A. (2009). Chemical Composition and Antimicrobial Activity of the Essential Oils of *Ageratum fastigiatum* (Asteraceae). *Records of Natural Products*, 3(1).

Després, J. (2012). *L'univers des champignons*. Les Presses de l'Université de Montréal.

Djabi, A., & KHOBIZI, B. (2018). *Etude de l'effet des extraits aqueux et éthanoliques de Romarin sur la croissance de quelques champignons phytopathogènes* (Doctoral dissertation, Université de Bouira).

Dorman, H. D., & Deans, S. G. (2000). Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. *Journal of applied microbiology*, 88(2), 308-316.

Drillon, S., Frouin, E., Letscher-Bru, V., & Donato, L. (2011). Mycoses de l'enfant. *EMC-Pédiatrie-Mal Infect*, 1-23.

Duponnois, R., Hafidi, M., Ndoeye, I., Ramanankierana, H., & Bâ, A. M. (2013). Généralités sur la symbiose mycorhizienne: introduction. *Duponnois R, Hafidi M, Ndoeye I*.

Eddine, B. C. S. (2017). *Etude de L'activité des huiles essentielles de la plante Teucrium Poliumssp Aurasianum Labiatae* (Doctoral dissertation, Thèse De Doctorat, Université Kasbi Merbah (Ouargla)).

El Haib, A. (2011). *Valorisation de terpènes naturels issus de plantes marocaines par transformations catalytiques* (Doctoral dissertation, Université de Toulouse, Université Toulouse III-Paul Sabatier).

El Mansouri, K., & MOUTAJ, R. (2013). Recherche et évaluation de l'activité antifongique des extraits de plantes médicinales.

El Mehdi, A. A., El KHETABI, A., BELMALHA, S., & LAHLALI, R. (2021). Utilisation des extraits de plantes contre les maladies de post-récolte des fruits. *Revue Marocaine des Sciences Agronomiques et Vétérinaires*, 9(2).

Farhat, A. (2010). *Vapo-diffusion assistée par micro-ondes: conception, optimisation et application* (Doctoral dissertation, Université d'Avignon).

Fauchère, J. L., & Avril, J. L. (2002). *Bactériologie générale et médicale*. Ellipses.

Références bibliographiques

- Fernandez, N., & Coineau, Y. (2007). *Maladies, parasites et autres ennemis de l'abeille mellifère*. Atlantica.
- Flores, J. M., Spivak, M., & Gutiérrez, I. (2005). Spores of *Ascosphaera apis* contained in wax foundation can infect honeybee brood. *Veterinary microbiology*, 108(1-2), 141-144.
- Fluri, P., Herrmann, M., Imdorf, A., Bühlmann, G., & Charrière, J. D. (1998). Santé et maladies des abeilles Connaissances de base. *Communication du Centre Suisse de Recherche Apicole*, (33).
- Fontanay, S., Mougenot, M. E., & Duval, R. E. (2015). Évaluation des activités antibactériennes des huiles essentielles et/ou de leurs composants majoritaires. *Hegel*, (2), 109-118.
- Gabriel, K. T., Kartforosh, L., Crow, S. A., & Cornelison, C. T. (2018). Antimicrobial activity of essential oils against the fungal pathogens *Ascosphaera apis* and *Pseudogymnoascus destructans*. *Mycopathologia*, 183(6), 921-934.
- Garrett, D. O., Jochimsen, E., & Jarvis, W. (1999). Invasive *Aspergillus* spp infections in rheumatology patients. *The Journal of rheumatology*, 26(1), 146-149.
- Gavahian, M., & Chu, Y. H. (2018). Ohmic accelerated steam distillation of essential oil from lavender in comparison with conventional steam distillation. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 50, 34-41.
- George, M., & Ramteke, P. W. (2019). Morphology, molecular identification and phylogenetic analysis based on internal transcribed spacer (ITS) of the ribosomal nuclear DNA (rDNA) sequence of a pathogenic fungal isolate *Aspergillus niger* LKO1. *Trop Plant Res*, 6, 166-170.
- Germaud, P., Boutoille, D., & Gay-Andrieu, F. (2010). Mycoses bronchopulmonaires (aspects immunoallergiques exclus). *EMC (Elsevier Masson SAS, Paris), Pneumologie*, 6.
- Gilliam, M. (1986). Infectivity and survival of the chalkbrood pathogen, *Ascosphaera apis*, in colonies of honey bees, *Apis mellifera*. *Apidologie*, 17(2), 93-100.
- Goetz, P., Ghedira, K., et Le Jeune, R. (2010). *Syzygium aromaticum* (L.) Merr. & Perry (Myrtaceae) Giroflier. *Phytotherapie*, 8(1), 37-43.
- Grillot, R. (1996). Tests de détermination de sensibilité aux antifongiques: actualités et perspectives. *Reanimation Urgences*, 5(4), 13s-17s.

Références bibliographiques

Guezil, F. Z. (2012). *Etude de la cinétique d'extraction des huiles essentielles de deux plantes médicinales Algériennes* (Doctoral dissertation, Faculté de Chimie).

Guinoiseau, E., Luciani, A., de Rocca Serra, D., Quilichini, Y., Berti, L., & Lorenzi, V. (2015). Primary mode of action of *Cistus ladaniferus* L. essential oil active fractions on *Staphylococcus aureus* strain. *Advances in Microbiology*, 5(13), 881-890.

Habisukan, U. H., ELFITA, E., WIDJAJANTI, H., SETIAWAN, A., & KURNIAWATI, A. R. (2021). Diversity of endophytic fungi in *Syzygium aqueum*. *Biodiversitas Journal of Biological Diversity*, 22(3).

Hajji, H. (2016). Evaluation in vitro de l'activité antifongique de quatre plantes médicinales marocaines sur cinq champignons phytopathogènes. *Revue Marocaine de Protection des Plantes*, (10).

Hamdani, F. Z., Ziri, S., Benallou, A., Djani, H., & Belkacemi, A. (2021). Fort potentiel antifongique des huiles essentielles de *Thymus vulgaris*. *Phytothérapie*, 19, 190-194.

Hassikou, R., Oulladi, H., & Arahou, M. (2014). Activité antimycosique des extraits du chêne-liège *Quercus suber* sur *Trichophyton rubrum* et *Candida albicans*. *Phytothérapie*, 12(4), 206-212.

Hayes, A. J., & Markovic, B. (2002). Toxicity of Australian essential oil *Backhousia citriodora* (Lemon myrtle). Part 1. Antimicrobial activity and in vitro cytotoxicity. *Food and Chemical Toxicology*, 40(4), 535-543.

Helander, I. M., Alakomi, H. L., Latva-Kala, K., Mattila-Sandholm, T., Pol, I., Smid, E. J., ...& von Wright, A. (1998). Characterization of the action of selected essential oil components on Gram-negative bacteria. *Journal of agricultural and food chemistry*, 46(9), 3590-3595.

Hemmerlé J., 2015. Le point sur l'ascosphérose. *Santé des abeilles, Abeille de France*, 22 (1025),4p.

Higes, M., Meana, A., Bartolomé, C., Botías, C., & Martín-Hernández, R. (2013). *Nosema ceranae* (Microsporidia), a controversial 21st century honey bee pathogen. *Environmental microbiology reports*, 5(1), 17-29.

Références bibliographiques

- Hochart, S., Barrier, F., Durand-Joly, I., Horrent, S., Decaudin, B., & Pascal, O. D. O. U. (2008). Les antifongiques systémiques: Partie 1: éléments pharmaceutiques. *Le Pharmacien Hospitalier*, 43(173), 103-109.
- Hussain, A. I., Anwar, F., Chatha, S. A. S., Jabbar, A., Mahboob, S., & Nigam, P. S. (2010). Rosmarinus officinalis essential oil: antiproliferative, antioxidant and antibacterial activities. *Brazilian Journal of Microbiology*, 41(4), 1070-1078.
- Ibtissam, B., & Benchercher Besema, B. R. (2021). Evaluation de l'activité antibactérienne de deux types d'huiles essentielles de la carotte sauvage (*Daucus carota* L.).
- Inouye, S., Uchida, K., Nishiyama, Y., Hasumi, Y., Yamaguchi, H., & Abe, S. (2007). Combined effect of heat, essential oils and salt on the fungicidal activity against Trichophyton mentagrophytes in foot bath. *Nippon Ishinkin Gakkai Zasshi*, 48(1), 27-36.
- Istikorini, Y., & Sari, O. Y. (2022). Identification of Endophytic Fungi of Balangeran (*Shorea balangeran* Korth.) by Morphological Characterization. *Jurnal Sylva Lestari*, 10(2), 211-222.
- James, T. Y., Porter, D., Leander, C. A., Vilgalys, R., & Longcore, J. E. (2000). Molecular phylogenetics of the Chytridiomycota supports the utility of ultrastructural data in chytrid systematics. *Canadian Journal of Botany*, 78(3), 336-350.
- JD.Cavallo.Médecine et armées, *revue du service de santé de armés T 35-n°2-Avril 2007*
- Jennings, D. H., & Lysek, G. (1996). *Fungal biology: understanding the fungal lifestyle*. Oxford: BIOS Scientific Publishers.
- Jensen, A. B., Aronstein, K., Flores, J. M., Vojvodic, S., Palacio, M. A., & Spivak, M. (2013). Standard methods for fungal brood disease research. *Journal of apicultural research*, 52(1), 1-20.
- Juárez, Z. N., Bach, H., Sánchez-Arreola, E., Bach, H., & Hernández, L. R. (2016). Protective antifungal activity of essential oils extracted from *Buddleja perfoliata* and *Pelargonium graveolens* against fungi isolated from stored grains. *Journal of Applied Microbiology*, 120(5), 1264-1270.
- Kachour, L. (2005). *Identification des moisissures isolées à partir des eaux du lac Oubeira (PNEK) et impact des eaux usées sur leur diversité* (Doctoral dissertation, Annaba).P :260.

Références bibliographiques

- Kaloustian, J., & Hadji-Minaglou, F. (2012). *La connaissance des huiles essentielles: qualilogie et aromathérapie; Entre science et tradition pour une application médicale raisonnée*. Springer.
- Kamatou, G. P., Vermaak, I., Viljoen, A. M., & Lawrence, B. M. (2013). Menthol: a simple monoterpene with remarkable biological properties. *Phytochemistry*, 96, 15-25.
- Kechkar, M. M. (2008). Extraction de la silymarine et étude de son activité antimicrobienne. Mémoire du Magister de l'Université Mentouri, Constantine.
- Kellner, W., & Kober, W. (1954). * MOGLICHKEITEN DER VERWENDUNG ATHERISCHER OLE ZUR RAUMDESINFEKTION. 1. DIE WIRKUNG GEBRAUCHLICHER ATHERISCHER OLE AUF TESTKEIME. *ARZNEIMITTEL-FORSCHUNG-DRUG RESEARCH*, 4(5), 319-325.
- Kesari, V., Das, A., & Rangan, L. (2010). Physico-chemical characterization and antimicrobial activity from seed oil of Pongamia pinnata, a potential biofuel crop. *Biomass and Bioenergy*, 34(1), 108-115.
- Khaldi, F. E., AMAR, A., & ABDENNOUR, M. (2021). Etude de l'activité antifongique des huiles essentielles d'Origanum floribundum Munby. et Thymus capitatus L. sur Aspergillus fumigatus.
- Kiffer, E., & Morelet, M. (1997). *Les deutéromycètes: Classification et clés d'identification générique*. Editions Quae.
- Laamari, M., Jousselin, E., & d'Acier, A. C. (2009). Assessment of aphid diversity (Hemiptera: Aphididae) in Algeria: a fourteen-year investigation. *Entomologie faunistique-Faunistic entomology*, 62(2), 73-87.
- Labidi, A. (2021). Lilial (butylphényl méthylpropional): Synthèse et Problématique Sanitaire.
- Lahlou, M. (2004). Methods to study the phytochemistry and bioactivity of essential oils. *Phytotherapy Research: An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives*, 18(6), 435-448.
- Lamamra, M. (2018). *Activités biologiques et composition chimique des huiles essentielles d'Ammiopsis aristidis Coss.(Syn. Daucus aristidis Coss.) et d'Achillea santolinoides Lag* (Doctoral dissertation).

Références bibliographiques

Laurent, J. (2017). *Conseils et utilisations des huiles essentielles les plus courantes en officine* (Doctoral dissertation, Université Toulouse III-Paul Sabatier).

Linaz, M. D., & Cassaing, S. (2001). Méthodes d'évaluation in vitro des antifongiques: étude comparative des différents tests. *Revue Française des Laboratoires*, 2001(332), 49-56.

Lucchesi, M. E. (2005). *Extraction Sans Solvant Assistée par Micro-ondes Conception et Application à l'extraction des huiles essentielles* (Doctoral dissertation, Université de la Réunion).

Malik, S. (Ed.). (2019). *Essential Oil Research: Trends in Biosynthesis, Analytics, Industrial Applications and Biotechnological Production*. Springer.

Manel ADJIMI, A. K. (2019). Activités hydrolases de moisissures isolées du sol des sources thermales.

Masango, P. (2005). Cleaner production of essential oils by steam distillation. *Journal of Cleaner Production*, 13(8), 833-839.

MESSAOUD, B., & DHIB, C. (2021). Les techniques modernes d'identification et de classification des champignons.

Mnayer, D. (2014). *Eco-Extraction des huiles essentielles et des arômes alimentaires en vue d'une application comme agents antioxydants et antimicrobiens* (Doctoral dissertation, Université d'Avignon).

Moon, T., Cavanagh, H. M., & Wilkinson, J. M. (2007). Antifungal activity of Australian grown *Lavandula* spp. essential oils against *Aspergillus nidulans*, *Trichophyton mentagrophytes*, *Leptosphaeria maculans* and *Sclerotinia sclerotiorum*. *Journal of essential oil research*, 19(2), 171-175.

Morin-Sardin, S. (2016). *Etudes physiologiques et moléculaires de l'adaptation des *Mucor* aux matrices fromagères* (Doctoral dissertation, Brest).

Moro, I. J., Gondo, G. D. G. A., Pierri, E. G., Pietro, R. C. L. R., Soares, C. P., Sousa, D. P. D., & Santos, A. G. D. (2018). Evaluation of antimicrobial, cytotoxic and chemopreventive activities of carvone and its derivatives. *Brazilian journal of pharmaceutical sciences*, 53.

Références bibliographiques

Nadjet, M., & Naima, M. E. H. A. R. Z. I. (2019). Potentialités fongicides des huiles essentielles de Géranium rosat (Famille des Géraniacée) agent de la moisissure noire contre *Aspergillus niger* (Famille des Trichocomaceae).

Naili, I., Ababsa, D., & Bensalama, O. (2021). Les Biofongicides comme moyen de biocontrôle contre les champignons phytopathogènes.

Nalawade, R. R., Joshi, M. S., Rathod, R. R., & Suryawanshi, A. P.(2019). Morphological and cultural characters of fungi isolated from copra and copra oil.

Oie., 2014. *Chapter 2.2.2. American foulbrood of honey bees*. In: (OIE.) Office international des épizooties, Manual of standards for diagnostic test and vaccines 2014. Paris, France,15p.

Omer, E. A., Khattab, M. E., & Ibrahim, M. E. (1998). First cultivation trial of *Perilla frutescens* L. in Egypt. *Flavour and fragrance journal*, 13(4), 221-225.

Ou, S. H. (1980). Pathogen variability and host resistance in rice blast disease. *Annual review of phytopathology*, 18(1), 167-187.

Ounoughi, A., & Ramdani, M. (2021). Valorisation des espèces végétales de l'est Algérien «étude phytochimique, caryologique et activités biologiques des huiles essentielles».

Ouraïni, D., Agoumi, A., Ismaili-Alaoui, M., Alaoui, K., Cherrah, Y., Alaoui, M. A., & Belabbas, M. A. (2007). Activité antifongique de l'acide oléique et des huiles essentielles de *Thymus saturejoides* L. et de *Mentha pulegium* L., comparée aux antifongiques dans les dermatoses mycosiques. *Phytothérapie*, 5(1), 6-14.

Oussalah, M., Caillet, S., & Lacroix, M. (2006). Mechanism of action of Spanish oregano, Chinese cinnamon, and savory essential oils against cell membranes and walls of *Escherichia coli* O157: H7 and *Listeria monocytogenes*. *Journal of food protection*, 69(5), 1046-1055.

Ozek, T., Tabanca, N., Demirci, F., Wedge, D. E., & Baser, K. (2010). Enantiomeric distribution of some linalool containing essential oils and their biological activities.

Parra, H., & Ramos, G. (1998). Cutaneous aspergillosis: a report of six cases. *British Journal of Dermatology*, 139(3), 522-526.

Paugam, A. (2010). Le point sur l'antifongigramme. *La Lettre de l'infectiologue*, 25(6), 222-227.

Références bibliographiques

- Peralta, M. A., da Silva, M. A., Ortega, M. G., Cabrera, J. L., & Paraje, M. G. (2015). Antifungal activity of a prenylated flavonoid from *Dalea elegans* against *Candida albicans* biofilms. *Phytomedicine*, 22(11), 975-980.
- Polack, B., Boulouis, H. J., Guillot, J., & Chermette, R. (2015). Les zoonoses (tableaux synthétiques: animaux réservoirs de pathogènes et modes de transmission). *Revue Francophone des Laboratoires*, 2015(477), 67-79.
- Powell, M. J. (1993). Looking at mycology with a Janus face: a glimpse at Chytridiomycetes active in the environment. *Mycologia*, 85(1), 1-20.
- Prakash, B., Shukla, R., Singh, P., Kumar, A., Mishra, P. K., & Dubey, N. K. (2010). Efficacy of chemically characterized Piper betle L. essential oil against fungal and aflatoxin contamination of some edible commodities and its antioxidant activity. *International Journal of Food Microbiology*, 142(1-2), 114-119.
- Prakash, B., Singh, P., Kedia, A., & Dubey, N. K. (2012). Assessment of some essential oils as food preservatives based on antifungal, antiaflatoxin, antioxidant activities and in vivo efficacy in food system. *Food Research International*, 49(1), 201-208.
- Prakash, B., Singh, P., Yadav, S., Singh, S. C., & Dubey, N. K. (2013). Safety profile assessment and efficacy of chemically characterized *Cinnamomum glaucescens* essential oil against storage fungi, insect, aflatoxin secretion and as antioxidant. *Food and chemical toxicology*, 53, 160-167.
- Quatresous, N. (2011). *Aspergillose humaine: Épidémiologie, diagnostic biologique, contrôle* (Doctoral dissertation, Thèse Pharmacie, Université de Limoges).
- Raaman, N. (2006). Phytochemical techniques New India Publishing agency, New Delhi, India, pp19-24. *Methods*.
- Rapior, S., & Fons, F. (2006). La classification des champignons. In *Annales de la Société d'Horticulture et d'Histoire Naturelle de l'Hérault* (Vol. 146, No. 4, pp. 81-86).
- Reynaldi, F. J., Lucia, M., & Garcia, M. L. G. (2015). *Ascospaera apis*, the entomopathogenic fungus affecting larvae of native bees (*Xylocopa augusti*): First report in South America. *Revista iberoamericana de micologia*, 32(4), 261-264.
- Rhayour, K. (2002). Etude du mécanisme de l'action bactéricide des huiles essentielles sur *Esherichia coli*, *Bacillus subtilis* et sur *Mycobacterium phlei* et *Mycobacterium fortuitum*.

Références bibliographiques

Richter, J., & Schellenberg, I. (2007). Comparison of different extraction methods for the determination of essential oils and related compounds from aromatic plants and optimization of solid-phase microextraction/gas chromatography. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 387(6), 2207-2217.

Ripert, C. (2013). *Mycologie médicale*. Tec & Doc.

Sadrati, N. (2021). *Isolement, identification et culture des champignons endophytes isolés à partir des plantes médicinales algériennes pour la production des métabolites secondaires biologiquement actifs* (Doctoral dissertation).

Saliha, M. B., & Ahlem, E. M. B. (2018). Effet des extraits de la Menthe Poivrée (*Mentha Peperita*) chez *Staphylococcus aureus* responsable des infections uro-génitales.

Samanta, I. (2015). General Characteristics of Fungi. In *Veterinary Mycology* (pp. 3-8). Springer, New Delhi.

Saryono, S., Novianty, R., Suraya, N., Piska, F., Devi, S., Pratiwi, N. W., & Ardhi, A. (2022). Molecular identification of cellulase-producing thermophilic fungi isolated from Sungai Pinang hot spring, Riau Province, Indonesia. *Biodiversitas Journal of Biological Diversity*, 23(3).

Seyedmousavi, S., Guillot, J., Arné, P., De Hoog, G. S., Mouton, J. W., Melchers, W. J., & Verweij, P. E. (2015). *Aspergillus* and aspergilloses in wild and domestic animals: a global health concern with parallels to human disease. *Medical mycology*, 53(8), 765-797.

Shearer, C. A., Descals, E., Kohlmeyer, B., Kohlmeyer, J., Marvanová, L., Padgett, D., ...& Voglymayr, H. (2007). Fungal biodiversity in aquatic habitats. *Biodiversity and Conservation*, 16(1), 49-67.

Tabuc, C. (2007). *Flore fongique de différents substrats et conditions optimales de production des mycotoxines* (Doctoral dissertation).

Tian, J., Huang, B., Luo, X., Zeng, H., Ban, X., He, J., & Wang, Y. (2012). The control of *Aspergillus flavus* with *Cinnamomum jensenianum* Hand.-Mazz essential oil and its potential use as a food preservative. *Food Chemistry*, 130(3), 520-527.

Tolba, H. (2017). *Extraction des huiles essentielles des plantes de la flore algérienne, Etude des effets thérapeutiques en vue d'une application pharmaceutique* (Doctoral dissertation, Faculté de Génie Mécanique et de Génie des Procédés).

Références bibliographiques

Touhami, A. (2017). Etude chimique et microbiologique des composants des huiles essentielles de différents genres *Thymus* récoltées dans les régions de l'Est Algérien pendant les deux périodes de développement. *Université de Badji Mokhtar Annaba*.

van Baarlen, P., Woltering, E. J., Staats, M., & van Kan, J. A. (2007). Histochemical and genetic analysis of host and non-host interactions of *Arabidopsis* with three *Botrytis* species: an important role for cell death control. *Molecular Plant Pathology*, 8(1), 41-54.

Vidal-Naquet, N. (2012). Les maladies de l'abeille domestique d'élevage, *Apis mellifera* L. *Bulletin de l'Académie vétérinaire de France*, 165(4), 307-316.

Villa-Martínez, A., Pérez-Leal, R., Morales-Morales, H. A., Basurto-Sotelo, M., Soto-Parra, J. M., & Martínez-Escudero, E. (2015). Situación actual en el control de *Fusarium* spp. y evaluación de la actividad antifúngica de extractos vegetales. *Acta Agronómica*, 64(2), 194-205.

VillarRodríguez, J., Pérez-Pico, A. M., Mingorance-Álvarez, E., & MayordomoAcevedo, R. (2022). Meta-analysis of the antifungal activities of three essential oils as alternative therapies in dermatophytosis infections. *Journal of Applied Microbiology*.

Wilkinson, J. M. (2006). Methods for testing the antimicrobial activity of extracts. *Modern phytomedicine: turning medicinal plants into drugs*, 157-171.

Résumé :

Cette étude porte sur l'étude de l'activité antifongique d'huile essentielle commercialisée vis-à-vis deux champignons pathogènes l'*Aspergillus Niger* et l'*Ascosphaera Apis*. Dans le but de rechercher des nouveaux produits thérapeutiques naturels de lutte contre les champignons pathogènes responsables des infections mycosiques. Les champignons sont isolés par le prélèvement d'un échantillon de la cire battue. Les tests de l'activité antifongique d'huile essentielle commercialisée ont été réalisés par la méthode de diffusion en gélose. Cinq doses sont appliqués 20, 40, 60, 80 et 100 uL/disque, chaque dose est répétée trois fois. Les résultats montrent une activité inhibitrice significative pour les deux souches fongiques testés, on constate l'augmentation de la zone d'inhibition avec l'augmentation des concentrations d'HE commercialisées, le Taux d'inhibition d'*A. Niger* varient entre 0,092% et 6,34% et pour *A. Apis* ils varient entre 0,1% et 4%. L'activité antifongique de l'HE commercialisée exerce une action inhibitrice plus forte sur *A. Niger*, mais elle est moins efficace que celle d'*A. Apis*.

Mots clés : huile essentielle commercialisée, *A. Niger*, *A. Apis*, Les champignons pathogènes, Les infections mycosiques, Taux d'Inhibition.

ملخص:

تركز هذه الدراسة على دراسة النشاط المضاد للفطريات للزيوت الأساسية التي يتم تسويقها مقابل اثنين من الفطريات المسببة للأمراض *Aspergillus Niger* و *Ascosphaera Apis*. بهدف البحث عن منتجات علاجية طبيعية جديدة لمكافحة الفطريات المسببة للأمراض المسؤولة عن الالتهابات الفطرية. يتم عزل الفطر عن طريق أخذ عينة من الشمع المطروق. تم إجراء اختبارات النشاط المضاد للفطريات للزيت العطري المسوق بطريقة انتشار الأجار. يتم وضع خمس جرعات 20 و 40 و 60 و 80 و 100uL/disc، وتكرر كل جرعة ثلاث مرات. تزيد النتائج من النشاط المثبط الكبير للسلاطين الفطريتين اللتين تم اختبارهما، ونلاحظ زيادة منطقة التثبيط مع زيادة تركيزات HE التجارية، ويتراوح معدل تثبيط *A. Niger* بين 0.092% و 6.34% وبالنسبة لـ *A. Apis* تختلف بين 0.1% و 4%. يمارس النشاط المضاد للفطريات في HE المسوق إجراءً مثبطاً أقوى على *A. Niger*، لكنه أقل فعالية من نشاط *A. Apis*.

الكلمات المفتاحية: الزيت الأساسي التجارية، *A. Niger*, *A. Apis*, الفطريات المسببة للأمراض، الالتهابات الفطرية، معدل التثبيط.

Abstract :

This study focuses on the study of the antifungal activity of essential oils marketed vis-à-vis two pathogenic fungi *Aspergillus Niger* and *Ascosphaera Apis*. With the aim of researching new natural therapeutic products for the control of pathogenic fungi responsible for mycotic infections. The mushrooms are isolated by taking a sample of the beaten wax. Tests of the antifungal activity of marketed essential oil were carried out by the agar diffusion method. Five doses are applied 20, 40, 60, 80 and 100uL/disc, each dose is repeated three times. The results increase a significant inhibitory activity for the two fungal strains tested, we note the increase of the zone of inhibition with the increase of HE concentrations commercialized, the rate of inhibition of *A. Niger* vary between 0,092% and 6.34% and for *A. Apis* they vary between 0.1% and 4%. The antifungal activity of marketed HE exerts a stronger inhibitory action on *A. Niger*, but it is less effective than that of *A. Apis*.

Keywords: commercialized essential oil, *A. Niger*, *A. Apis*, Pathogenic fungi, Mycotic infections, Inhibition rate.