

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

République Algérienne Démocratique Et Populaire  
Ministère De L'enseignement Supérieur Et De La Recherche Scientifique

Université 08 mai 1945 de Guelma  
Faculté des sciences de la nature et de la vie et sciences de la terre et de l'univers



## Mémoire En Vue de l'Obtention du Diplôme de Master

**Domaine :** Science de la Nature et de la Vie

**Filière :** Sciences biologiques

**Spécialité :** Parasitologie

**Département :** Biologie

### Thème :

Etude de l'activité antifongique des huiles essentielles d'*Origanum floribundum* Munby. et *Thymus capitatus* L. sur *Aspergillus fumigatus*

### Préparé par :

ACHOURI Amar

MAHYADINE Abdenmour

KHALDI Fakher el islam

### Devant le jury composé de :

Président(e) : Dr. CHRAIRIA M.	MCA	Université de Guelma
Examinatrice : Dr. ALLIOUI N.	MCB	Université de Guelma
Encadreur : Dr. KSOURI S.	MCA	Université de Guelma

2020-2021





## *Dédicace*

Ce travail n'est fait que grâce à la volonté d'Allah, mon Créateur et mon Maître.

Je dédie mon travail de mémoire à ma famille et à mes nombreux amis. Un sentiment spécial de gratitude à mes parents aimants, dont les mots d'encouragement et de poussée pour la ténacité résonnent dans mes oreilles. Mon frère qui n'a jamais quitté mes côtés et qui est très spécial.

Je dédie également ce mémoire à mon chère amis **Ahmed** et à ma famille étendue qui m'ont soutenue tout au long du processus. J'apprécierai toujours tout ce qu'ils ont fait. Je tiens également à exprimer ma profonde et sincère gratitude à mon encadreur de recherche **Dr. Ksouri Samir**, Son énergie, sa vision, sa sincérité et sa motivation m'ont profondément inspiré. Il m'a enseigné la méthodologie pour mener à bien la recherche et pour présenter les travaux de recherche de la manière la plus claire possible. Ce fut un grand privilège et un honneur de travailler et d'étudier sous sa direction. Et à toutes les personnes de ma vie qui touchent mon cœur, je vous dédie ce projet de fin d'étude.

**Amar**

## *Dédicace*

Je tiens avant tout à exprimer ma reconnaissance à **Dr.Ksouri Samir** pour avoir accepté de m'encadrer dans cette étude. Je la remercie pour son implication, son soutien et ses encouragements tout au long de ce travail.

Je tiens également à remercier mes collègues **Amar Achouri** et **Abdennour Mahyadine** pour la confiance qu'ils m'accordent et leur soutien alors que nous travaillons ensemble.

Je dédie ce travail à ma famille, en particulier mes parents, mes frères et sœurs, pour leur confiance en moi, leurs encouragements et leur soutien en tout temps et en toutes circonstances. Merci à la responsable du laboratoire de nous avoir aidés, d'avoir bien traité avec nous et de faire son travail comme elle se doit.

**Fakhri**

## *Dédicace*

Que ce travail traduit ma gratitude et mon affection pour tous qui ma  
soutenu

*A ma très chère mère*

Quoi que je fasse ou que je dis je ne serai point te remercier comme il se  
doit. Ton affection me couvre, ta bienveillance me guide et ta présence à  
mes côtés a toujours été ma source de force pour avancer.

*A mon très cher père*

Tu as toujours été à mes coté pour me soutenir et m'encourager. J'espère  
que tu es fière à moi.

*A mes belles sœurs, et mon frère **Khaled** pour ses conseils.*

*A mes chers amies **Doungl, Hamori et Hakim** pour le bon entourage et  
pour la bonne amitié.*

*Spécial dédicace pour monsieur **Abdelghani khacha** qui à me rendre  
plus fort, et m'a soutenu, guidé pendant mes études et ma vie.*

*Abdenmour*

## ***REMERCIEMENTS***

D'abord et avant tout, des louanges et des remerciements à Allah, le Tout-Puissant, pour ses bénédictions tout au long de notre travail de recherche afin de le mener à bien.

Nous voulons aussi adresser tous nos remerciements aux personnes avec lesquelles nous avons pu échanger et qui nous ont aidés pour la rédaction de ce mémoire.

Madame **Cherairia M**, président du jury. Docteur **Allioui N**, l'examinatrice.

Nous tenons à exprimer notre profonde et sincère gratitude à notre directeur de recherche, **Docteur Ksouri S**, pour nous avoir donné l'opportunité de faire des recherches et pour nous avoir fourni des conseils inestimables tout au long de cette recherche.

Nous adressons un grand merci à tous les enseignants de **la faculté des Sciences de la Nature et de la Vie et des Sciences de la Terre et de l'Univers de l'université de Guelma**, nos remerciements vont également à tous nos anciens professeurs.

*Amar, Abdennour et fakher el islam*

## ***SOMMAIRE***

<b>INTRODUCTION GENERALE</b> .....	1
<b>ETUDE PRATIQUE</b> .....	7
<b>I. Matériel et méthodes</b> .....	7
<b>I.1. Matériel</b> .....	7
I.1.1. Matériel végétale .....	7
I.1.2. Matériel de laboratoire .....	7
I.1.3. Matériel fongique .....	8
<b>I.2. Méthodes</b> .....	9
I.2.1. Séchage des plantes aromatiques .....	9
I.2.2. Extraction des huiles essentielles .....	9
I.2.3. Rendement des PAMs en HE .....	10
I.2.4. Techniques d'évaluation d'activité antifongique des huiles essentielles .....	11
I.2.4.1. Méthode de microdilution en bouillon .....	11
➤ Préparation de la suspension sporale (milieu de culture inoculé) .....	11
➤ Evaluation d'activité antifongique .....	12
I.2.4.2. Méthode de microatmosphère .....	14
<b>II. Résultat</b> .....	16
II.1. Paramètres organoleptiques des HEs .....	16
II.2. Rendement des plantes en HE.....	16
II.3. Résultats de l'évaluation de l'activité antifongique des HEs des deux Plantes aromatiques.....	17
II.3.1. Evaluation de l'activité antifongique des HEs par la méthode de microdilution en bouillon.....	17
II.3.2. Evaluation de l'activité antifongique des HEs par méthode de microatmosphère.....	18
II.3.2.1. Evaluation de la fongitoxicité de la phase volatile de l'HE de <i>Thymus capitatus</i> L. ....	18
II.3.2.2. Evaluation de la fongitoxicité de la phase volatile de l'HE d' <i>Origanum floribundum</i> Munby.....	20
II.3.2.3. Détermination des valeurs de CMI et CMF de la fraction volatiles des HEs testées par méthode de microatmosphère .....	21

<b>III. Discussion.....</b>	<b>23</b>
<b>IV. Conclusion.....</b>	<b>29</b>
<b>REFERANCES BIBLIOGRAPHIQUES .....</b>	<b>31</b>
<b>ANNEXES .....</b>	<b>38</b>

## ***LISTE DES FIGURES***

<b>N°</b>	<b>Titre</b>	<b>Page</b>
<b>1</b>	<b>Localisation Géographique des sites d'échantillonnage</b>	<b>7</b>
<b>2</b>	<b>Représentation schématique de l'équipement d'hydrodistillation de type Clevenger</b>	<b>10</b>
<b>3</b>	<b>Préparation de l'inoculum d'<i>aspergillus</i> pour la méthode de microdilution</b>	<b>12</b>
<b>4</b>	<b>Illustration schématique de la technique de microdilution en bouillon</b>	<b>13</b>
<b>5</b>	<b>Illustration de la méthode de microatmosphère</b>	<b>15</b>
<b>6</b>	<b>Résultats de test CMI par méthode de microdilution de <i>Thymus capitatus</i> L. et <i>Origanum floribundum</i> Munby.</b>	<b>17</b>
<b>7</b>	<b>Résultats de test CMF pour les microplaques de <i>Thymus capitatus</i> L. et d'<i>Origanum floribundum</i> Munby.</b>	<b>17</b>
<b>8</b>	<b>Résultats de test CMI par méthode de microatmosphère de l'HE d'<i>Origanum floribundum</i> Munby.</b>	<b>19</b>
<b>9</b>	<b>Résultats de test CMI par méthode de microatmosphère de l'HE de <i>Thymus capitatus</i> L.</b>	<b>19</b>

## ***LISTE DES TABLEAUX***

<b>N°</b>	<b>Titre</b>	<b>Page</b>
<b>1</b>	<b>Matériel de laboratoire.</b>	<b>8</b>
<b>2</b>	<b>Caractéristiques organoleptiques de l'HE d'<i>Origanum floribundum</i> Munby. et <i>Thymus capitatus</i> L..</b>	<b>16</b>
<b>3</b>	<b>Rendement des PAMs étudiées en HEs étudiées.</b>	<b>16</b>
<b>4</b>	<b>Concentration minimales inhibitrices (CMI) et concentration minimales fongicides (CMF) des HEs d'<i>Origanum floribundum</i> Munby. et <i>Thymus capitatus</i> L..</b>	<b>18</b>
<b>5</b>	<b>Pourcentage d'inhibition de la croissance fongique des souches d'<i>Aspergillus fumigatus</i>, testées par fumigation d'HE de <i>Thymus capitatus</i> L..</b>	<b>20</b>
<b>6</b>	<b>Pourcentage d'inhibition de la croissance fongique des différentes souches d'<i>Aspergillus fumigatus</i>, testées par fumigation d'HE d'<i>Origanum floribundum</i> Munby..</b>	<b>20</b>
<b>7</b>	<b>Valeurs de CMIs et CMFs de la fraction volatile des HEs d'<i>Origanum floribundum</i> Munby. et <i>Thymus capitatus</i> L..</b>	<b>21</b>

## ***LISTE DES ABREVIATIONS***

- APC** : Aspergillose Pulmonaire Chronique.
- APCN** : Aspergillose Pulmonaire Chronique Nécrosant.
- API** : Aspergillose Pulmonaire Invasive.
- CFU** : Colony Forming-Unit
- CLSI** : Clinical and Laboratory Standards Institute.
- CMF** : Concentration Minimale Fongicide.
- CMI** : Concentration Minimale Inhibitrice.
- HEs** : Huiles essentielles.
- I%**: Pourcentage d'Inhibition.
- Mh** : Masse d'Huile essentielle.
- Mv** : Masse de matière Végétale sèche.
- OF** : *Origanum floribundum*.
- PAMs** : Plantes Aromatiques et Médicinales.
- RHE** : Rendement en Huile Essentielle.
- SIDA** : Syndrome d'Immunodéficience Acquise.
- TC** : *Thymus capitatus*.

***INTRODUCTION***

***GENERALE***

**L**es espèces du genre *Aspergillus* sont des champignons saprophytes que l'on trouve dans les débris organiques, la poussière, le compost, les aliments, les épices et les plantes en décomposition, elles jouent un rôle important dans le recyclage du carbone et de l'azote (Van de Veerdonk et al., 2017; Soubani et Chandrasekar, 2002). L'une des caractéristiques d'*Aspergillus* est sa forte capacité de sporulation, qui se traduit par l'omniprésence de fortes concentrations de conidies (1-100 conidies/m<sup>3</sup>) dans l'air (Latgé et Chamilos, 2019). *Aspergillus*, comme d'autres champignons filamenteux, est principalement acquis à partir d'un réservoir inanimé, généralement par inhalation de spores, d'où l'atteinte préférentielle des poumons et des voies aériennes supérieures comme les bronches ou les sinus. Le genre *Aspergillus* comprend près de 200 espèces (Dagenais et Keller, 2009; Soubani et Chandrasekar, 2002; Bodey and Vartivarian, 1989), mais seules quelques-unes sont connues pour être pathogènes pour l'homme. L'espèce la plus courante causant des maladies allergiques et invasives est dans 80% des cas *Aspergillus fumigatus* (Institut Pasteur, 2015; Maschmeyer et al., 2007; Bodey et Vartivarian, 1989).

*A.fumigatus* est un champignon saprotrophe dont la vie mycélienne végétative se produit dans le sol sur la matière organique en décomposition. Il se propage par sporulation asexuée. Les spores asexuées (conidies) sont produites en chaînettes sur des phialides séparées émergeant de conidiophores. Les conidies d'*A.fumigatus* sont des structures sphériques pigmentées et échinulées (Latgé et Chamilos, 2019). Chaque tête conidienne produisant des milliers de conidies, qui peuvent survivre dans un large éventail de conditions environnementales. Les spores libérées dans l'atmosphère ont un diamètre suffisamment petit (2 à 3 µm), ce qui facilite l'atteinte des alvéoles pulmonaires. Les études environnementales indiquent que tout être humain inhale au moins plusieurs centaines de conidies d'*A.fumigatus* par jour (Latgé, 1999). Chez les hôtes immunocompétents, ces spores ne causent généralement aucun danger car elles sont éliminées par les mécanismes de défense pulmonaires. Par contre, chez les personnes immunodéprimées qu'elle soit due à un traitement médicamenteux comme les corticostéroïdes ou la chimiothérapie, ou secondaire à une maladie sous-jacente comme le diabète ou VIH/SIDA, dont les réponses immunitaires sont altérées ou affaiblies, les conidies inhalées sont capables de développer des mycoses pulmonaires connues sous le nom d'aspergillose.

L'aspergillose peut être considérée comme un large éventail de maladies, chacune étant liée à un spectre de réponses immunitaires anormales de l'hôte. Le spectre clinique de la maladie s'étend des formes localisées (colonisation ou infections d'évolution chronique) aux infections aiguës disséminées (atteintes invasives multiviscérales). Il comprend également des manifestations immuno-allergiques. Le diagnostic de ces mycoses est difficile et repose sur un faisceau d'arguments cliniques, biologiques et radiologiques.

L'aspergillose donc se manifeste sous différentes formes, dont l'une d'entre elles est l'aspergillose pulmonaire chronique (APC). Les formes chroniques d'aspergillose touchent les patients immunocompétents ou modérément immunodéprimés qui présentent une pathologie pulmonaire préexistante. Parmi les formes chroniques d'aspergillose, les plus fréquentes étant :

- L'aspergillome simple, une colonisation du champignon d'une cavité pulmonaire préexistante et résultant d'une maladie antérieure, telle que la tuberculose ou la sarcoïdose (Soubani et Chandrasekar, 2002; Regnard et *al.*, 2000). Les spores germent dans cette cavité pour former une balle fongique, ou « truffe aspergillaire ».
- L'aspergillose pulmonaire chronique nécrosante (APCN), est une forme intermédiaire entre l'aspergillose invasive et l'aspergillose chronique. Elle survient chez les patients avec immunosuppression modérée (éthylisme, diabète, dénutrition...), qui souffrent d'une maladie pulmonaire sous-jacente. Il s'agit d'une forme qui cause une destruction inflammatoire progressive du tissu pulmonaire.

La deuxième forme d'aspergillose est l'aspergillose immunoallergique où *Aspergillus fumigatus* ici comporte comme tout autre allergène et peut entraîner :

- L'asthme aspergillaire, qu'il se traduit par un asthme (sans infection fongique pulmonaire) qui survient et s'aggrave dans des conditions de forte exposition aux spores aspergillaires.
- L'alvéolite allergique extrinsèque ou « le poumon du fermier », est une condition clinique provoquée par l'inhalation massive et répétée de spores fongiques chez des sujets non atopiques (Cano-Jiménez et *al.*, 2016; Reboux et *al.*, 2001), cette atteinte évolue avec des épisodes de toux, dyspnée, fièvre

et râles crépitant pulmonaires à chaque exposition à l'allergène. La répétition des accès peut conduire à la chronicité.

Mais, la forme la plus grave de cette maladie est l'aspergillose pulmonaire invasive (API), une infection nosocomiale qui affecte 1.4% des patients ayant subi une transplantation d'organe (Gavalda et *al.*, 2005), 3.4% des patients de transplantation de moelle osseuse (Goodley et *al.*, 1994) et de 10 à 25% des patients atteints de leucémie ou d'une autre hémopathie maligne (Denning et *al.*, 1997; Rogers, 1995). Ainsi, autres catégories de patients sont considérées à haut risque : les patients sous corticothérapie et/ou chimiothérapie prolongée(s), les patients atteints de déficit immunitaire congénital, ou encore les patients traités par biothérapies immun-modulatrices. Malgré l'instauration d'un traitement, la mortalité est supérieurs à 50 %, atteignant 95 % dans certaines situations (Balloy et Chignard, 2009).

L'aspergillose n'affecte pas seulement les humains. En fait, *Aspergillus spp.* a été identifiée pour la première fois comme un agent pathogène chez les animaux par Mayer en 1815 (Rinaldi, 1983), elle est également une cause majeure de morbidité et de mortalité chez les mammifères et les volailles. *A.fumigatus* est le responsable majeur d'aspergillose sinonasale chez les canidés, la mycose de la poche gutturale chez les équidés (Tell, 2005), et a été responsable de 3.1% des avortements mycosiques bovins (Knudtson et Kirkbride, 1992), mais les animaux les plus affectés sont les oiseaux, dont *A.fumigatus* étant l'espèce responsable d'environ 95% des cas d'aspergillose aviaire (Tell, 2005), qui peut être une maladie aiguë, rapidement mortelle, ou une maladie plus chronique (Khosravi et *al.*, 2008). Son apparition semblent favorisé par plusieurs conditions d'élevage, un environnement chaud et humide, une mauvaise ventilation (Phalen, 2000), un manque d'hygiène et le stockage à long terme des aliments (Khosravi et *al.*, 2008) sont autant des facteurs qui permet au nombre de spores d'augmenter et donc le risque d'aspergillose. Le traitement d'aspergillose aviaire est un défi en raison du stade tardif auquel les oiseaux sont généralement présentés, de la présence des maladies concomitantes et/ou d'une immunosuppression, et le cout et la législation qui limitent l'utilisation de ces antifongiques (Beernaert et *al.*, 2010).

Les choix thérapeutiques actuels pour le traitement de différentes formes d'aspergillose se limitent à quatre classes d'agents antifongiques ayant une activité anti-*Aspergillus* : les polyènes, les triazoles, les échinocandines et les allylamines. La plupart de

ces agents ne sont pas totalement efficaces en raison du développement de résistances surtout aux antifongiques azolés par *Aspergillus fumigatus* (Patterson et al., 2016; Vermeulen et al., 2013; Bueid et al., 2010), et le fait qu'il a été démontré que beaucoup de ces médicaments ont des effets cancérigènes, et une toxicité aiguë comme l'amphotéricine B (Butler, 1964).

Une étude mondiale impliquant 19 pays a rapporté une prévalence globale de la résistance aux azolés de 3.2% dans ces pays et allant de 0 à 25.5% parmi les centres participants dans cette étude (van der Linden et al., 2015). Denning et al., (1997), a également signalé le fait que des souches d'*Aspergillus fumigatus* isolé chez des patients atteints d'aspergillose invasive présentait une résistance aux traitements à base d'itraconazole. Une autre étude réalisée aux Pays-Bas entre 2014 et 2015 par Meis et al., (2016) a montré qu'en moyenne, 7 % des isolats d'*A.fumigatus* isolés chez des patients dont la culture est positive sont résistants aux azolés.

A cet égard, l'exploitation de traitements alternatifs peut offrir une nouvelle opportunité de développement des nouveaux médicaments antifongiques naturels. Parmi les domaines les plus intéressantes a exploité est l'aromathérapie.

L'aromathérapie s'est imposée pour le traitement de diverses complications et affections. L'étude de la littérature révèle que cette thérapie a gagné beaucoup d'attention à la fin du 20ème siècle et est très populaire au 21ème siècle aussi. L'aromathérapie utilise les huiles essentielles (HEs) comme principaux agents thérapeutiques, qui sont des substances hautement concentrées extraites d'herbes, de fleurs et d'autres parties de plantes aromatiques et médicinales (PAMs), et également distillées à partir de résines (Ali et al., 2015; Cooke et Ernst, 2000) . Les HEs ont été prouvé d'avoir des activités biologiques soit antifongiques (Goudjil et al., 2020; Schroder et al., 2017; Ksouri et al., 2017; Shin, 2003; Benjlali et al., 1984), antibactérienne (Nabti et al., 2020; Mith et al., 2014; Lambert et al., 2001; Dorman et Deans, 2000) , anti-inflammatoire (Hajhashemi et al., 2003), antivirale (Astani et al., 2011, 2010; García et al., 2003) et même anti-cancéreuse (Gautam et al., 2014; Adorjan et Buchbauer, 2010).

Afin d'élargir le spectre d'activité contre *Aspergillus* et de combattre les souches pathogènes multi-résistants épidémiques, les HEs peut être donc utile contre diverses maladies infectieuses (Swamy et al., 2016; Khosravi et al., 2011).

Selon le Dictionnaire encyclopédique des polymères (Gooch, 2011), les huiles essentielles sont des "huiles ou essences volatiles dérivées de la végétation et caractérisées

par des odeurs distinctives et une grande résistance à l'hydrolyse". Les HEs sont un mélange complexe de métabolites secondaires odoriférants et volatils produits naturellement par les PAMs pour se protéger des parasites et des micro-organismes, pour attirer les insectes pollinisateurs et pour des processus de signalisation (Miguel, 2010; Bakkali *et al.*, 2008). Elles sont obtenues à partir de différentes parties de plantes comme les fleurs, les bourgeons, les tiges, les feuilles, etc. et extraites par hydrodistillation ou distillation à la vapeur (Tariq *et al.*, 2019; Kalemba et Kunicka, 2003).

En général, la composition chimique des HEs est relativement complexe, et environ 20 à 60 composants bioactifs différents sont observés dans bon nombre des HEs. Habituellement, elles se caractérisent par 2 ou 3 composants principaux à une concentration assez élevée (20-70%) par rapport à d'autres composants présents à l'état de traces (Pandey *et al.*, 2014; Bakkali *et al.*, 2008). La plupart des HEs sont composées de terpènes, de terpénoïdes et d'autres constituants aromatiques et aliphatiques de faible poids moléculaire (Bakkali *et al.*, 2008). Les propriétés antimicrobiennes des HEs dépendent principalement de ces constituants chimiques et de la quantité des principaux composés individuels. Ces composés chimiques sont sécrétés par une série d'interactions moléculaires dans des conditions de stress biotique/abiotique spécifiques (Swamy *et al.*, 2016; Astani *et al.*, 2010).

Les mécanismes d'action des HEs ne sont pas entièrement compris. Cependant, plusieurs études ont conclu que, en tant qu'agents lipophiles, ils exécutent leur action au niveau de la membrane et des enzymes incorporées à la membrane (Mehdizadeh et Moghaddam, 2018). Les HEs déstabilisent principalement l'architecture cellulaire, entraînant la rupture de l'intégrité des membranes et une perméabilité accrue, ce qui perturbe de nombreuses activités cellulaires, notamment la production d'énergie (liée à la membrane), le transport membranaire et d'autres fonctions de régulation métabolique (Swamy *et al.*, 2016). En plus, la perturbation de la membrane cellulaire peut même faciliter l'action d'autres agents antifongiques synthétiques conventionnels.

Les HE peuvent aussi se révéler dangereuses dès lors qu'elles sont utilisées sans précautions (Couic-Marinier et Lobstein, 2013). La notion de dose et d'âge doit être prise en compte pour une utilisation sécurisée des HEs ainsi que certaines caractéristiques liées à la composition des HEs (Millet, 2010).

Les HEs peuvent donc offrir un grand potentiel et un grand espoir dans le domaine médical et vétérinaire. Par conséquent, les PAMs et ces HEs doivent être plus étudiées et

valorisées. Parmi les PAMs endémiques de la région de Guelma, l'*Origanum floribundum* Munby. et le *Thymus capitatus* L. bien que, l'activité antifongique de ces deux plantes dans notre pays, a été prouvée par plusieurs auteures (Goudjil et al., 2020; Ksouri et al., 2017; Kerbouche et al., 2015; Benjilali et al., 1984), les investigations sur ces deux plantes sont encore rares et le spectre des pathogènes contre lesquels ces HEs ont été testées est très limité. Pour cette raison, et dans le cadre du projet de fin d'étude, les deux espèces endémiques de l'est Algérien «*Origanum floribundum* Munby.» et «*Thymus capitatus* L.» ont été choisis pour évaluer leurs activité antifongique face aux quatre souches cliniques d'*Aspergillus fumigatus*.

# **ETUDE PRATIQUE**



Tableau 1: Matériel de laboratoire.

Multiusage	Usage unique	
	Matériel	Produits
<ul style="list-style-type: none"> <li>- Bain-marie (Memmert)</li> <li>- Agitateur</li> <li>- Vortex</li> <li>- Hotte</li> <li>- Poire</li> <li>- Etuve à 35°C</li> <li>- Autoclave</li> <li>- Bec bunsen</li> <li>- Microscope optique</li> <li>- Micropipettes de 10, 100 et 1000 µl</li> <li>- Pincés</li> <li>- pH mètre</li> <li>- Plaque chauffante</li> <li>- Eprouvette gradué</li> <li>- Balance</li> <li>- Becher</li> <li>- Flacons de 180 ml</li> <li>- Four</li> <li>- Cellule de Malassez</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Seringue stérile</li> <li>- Boîtes de Pétri de 90 mm</li> <li>- Microplaques stériles à 96 puits en U</li> <li>- Tubes conique en plastique stériles à 14 ml</li> <li>- Pipettes Pasteur</li> <li>- Embouts</li> <li>- Para-film</li> <li>- Papier buvard N° 5</li> <li>- Lame bistouri</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Eau physiologique stérile</li> <li>- Eau distillé</li> <li>- Tween 80</li> <li>- Bouillon de Sabouraud Gentamycine</li> <li>- Le milieu Sabouraud chloramphénicol</li> </ul>

### I.1.3. Matériel fongique

Pour déterminer les propriétés antifongiques des HEs étudiées, quatre isolats cliniques d'*Aspergillus fumigatus* (S1-S4) ont été utilisés (**Annexe 2**). Les quatre souches ont été isolées en 2020 lors d'une enquête réalisée dans la région de Guelma par Kouadria et al., (2020) sur l'aspergillose respiratoire aviaire. Cette espèce a été sélectionnée pour notre étude car peut d'études qui ont testées l'activité des HE de thym et d'origan vis-à-vis cette espèce. De plus, cette espèce de genre *Aspergillus*, considérée comme responsable des infections pulmonaires humaine et animale les plus dévastatrices en termes de morbidité et de mortalité (Latgé et Chamilos, 2019).

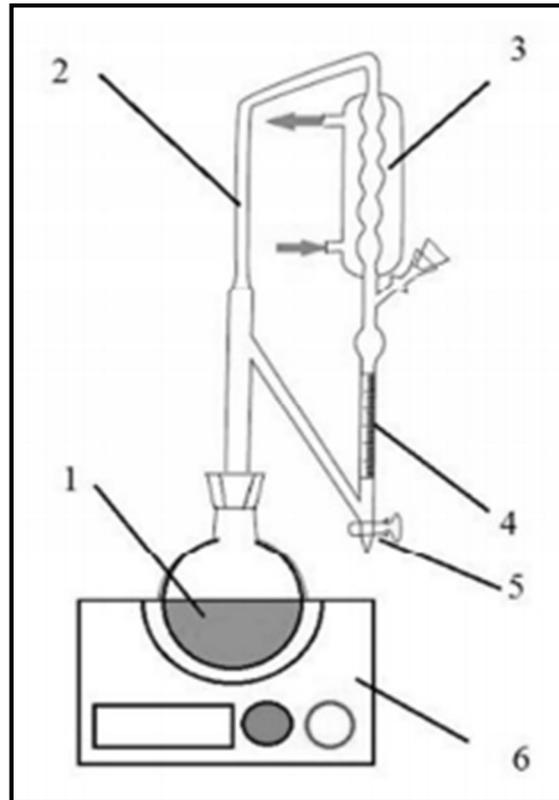
## **I.2. Méthodes**

### **I.2.1. Séchage des plantes aromatiques**

Nos échantillons de plantes aromatiques ont été séchés à l'ombre dans un endroit sec et aéré, à l'abri de la chaleur et de la lumière. Puis les feuilles et les sommités fleuries des deux plantes, ont été pesées et les stockées dans des sacs en papier.

### **I.2.2. Extraction des huiles essentielles (Annexe 1)**

L'obtention des HE ont été assurées par extraction à l'aide d'un appareil d'hydrodistillation de type Clevenger (**figure 2**) (Clevenger, 1928), la procédure commence en pesant 200 grammes de la matière végétale sèche et la placée dans un ballon en verre (2L), puis submergé les plantes avec de l'eau distillée, le tout est porté à l'ébullition à l'aide d'un chauffe-ballon, Le mélange de vapeur d'eau et d'HEs volatile produit dans le ballon passe ensuite par une colonne en verre reliée à un réfrigérant, où elle est condensée. Après condensation, l'huile est séparée de l'eau par décantation, mesurée et pesée pour déterminer le rendement en fonction de la matière végétale sèche. L'opération d'extraction dure de deux à trois heures à partir du début d'ébullition.



**Figure 2 : Représentation schématique de l'équipement d'hydrodistillation de type Clevenger**

1 : Flacon à fond rond, 2 : Tube de vapeur, 3 : Condenseur de vapeur, 4 : huile essentielle, 5 : Robinet d'arrêt, 6 : chauffe-ballon (András et *al.*, 2018)

### **I.2.3. Rendement des PAMs en HE**

Le rendement en pourcentage des huiles extraites de chaque échantillon est défini comme étant le rapport entre la masse de l'HE obtenue et la masse du matériel végétal sèche utilisé.

Le rendement en HEs de nos plantes a été calculé en utilisant la formule suivante (Selvakumar et *al.*, 2012) :

$$RHE\% = (Mh / Mv) \times 100$$

Où :

- RHE : rendement en huile essentielle en (%)
- Mh : masse d'huile essentielle récupérée en (g)
- Mv : masse de la matière végétale séchée en (g)

#### I.2.4. Techniques d'évaluation d'activité antifongique des huiles essentielles

Pour l'évaluation d'activité antifongique des HEs, deux techniques de base ont été utilisées :

- méthode de microdilution en bouillon
- méthode de microatmosphère

##### I.2.4.1. Méthode de microdilution en bouillon

Par la méthode de microdilution en bouillon, l'activité antifongique des HEs testées dans le présent travail a été évaluée en déterminant les concentrations minimales inhibitrices (CMI) et les concentrations minimales fongicides (CMF) contre les différents souches cliniques d'*Aspergillus* testées (S1-S4) comme ce qui a été décrit dans le document CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) de la technique de microdilution en bouillon M38-A des moisissures et expliqué par Espinel-Ingroff et Cantón, (2007), avec quelques modifications de la technique, le bouillon dextrose sabouraud a été utilisé comme milieu de base.

##### ➤ Préparation de la suspension sporale (milieu de culture inoculé)

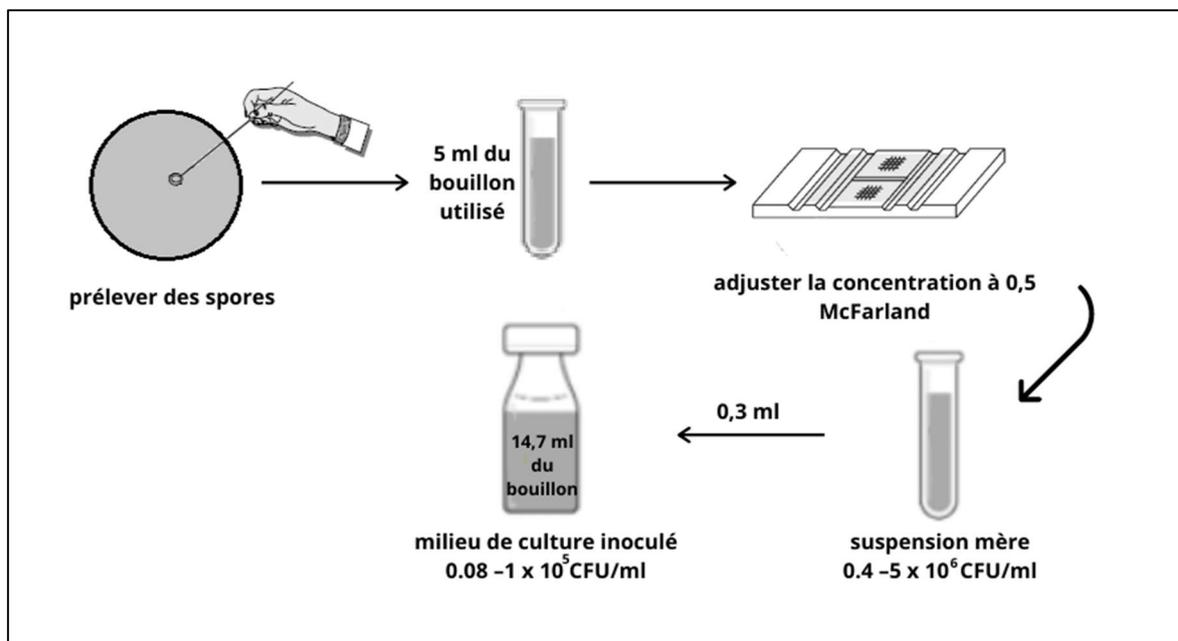
A partir de colonies de 7 jours d'*Aspergillus fumigatus* cultivées sur des géloses sabouraud chloramphénicol, une suspension mère d'inoculum ont été préparées (**Figure 3**) dans un bouillon de sabouraud gentamycine (0.1 g/L) à 2 % de Tween 80. La suspension de conidies a été vortexé vigoureusement pendant 15-20 s à l'aide d'un vortex. La concentration de la suspension d'inoculum a été déterminée en comptant le nombre de conidies à l'aide d'une cellule de Malassez (**Annexe 3**), la concentration de spores a été ajustée ensuite de

manière à obtenir une suspension mère de turbidité de 0.5 McFarland ( $0.4-5 \times 10^6$  spores par millilitre).

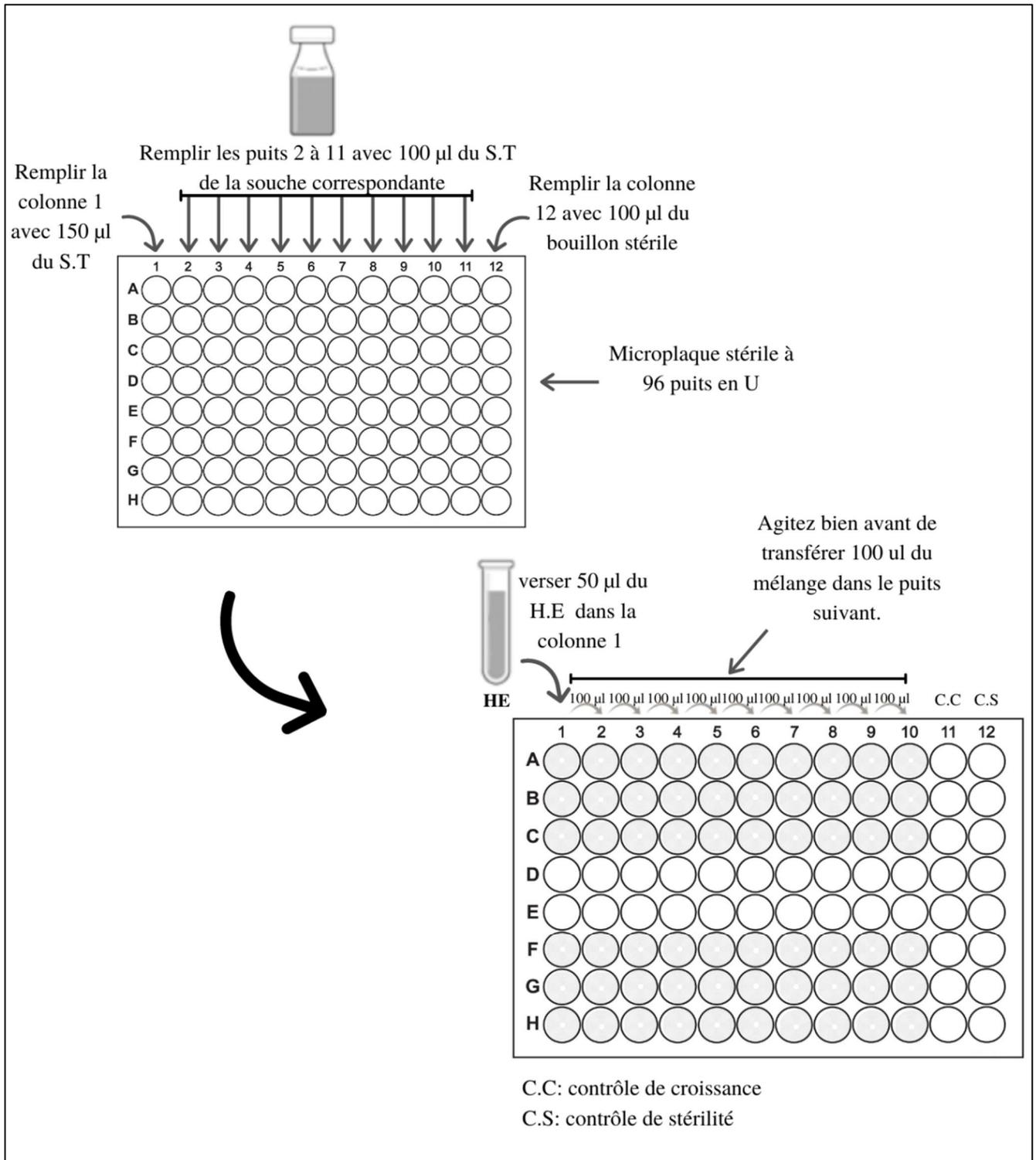
Une dilution au 50<sup>ème</sup> a été réalisée pour préparer une suspension de travail d'environ  $0.08-1 \times 10^5$  CFU/ml.

➤ **Evaluation d'activité antifongique**

A l'aide d'une micropipette, nous avons rempli chaque rangée de la microplaque (à 96 puits), des puits 2 à 10, avec 100  $\mu$ l de la suspension d'inoculum de travail et le puits 1 avec 150  $\mu$ l. Ensuite 100  $\mu$ l du milieu inoculé et de bouillon stérile ont été ajoutée aux colonnes 11 et 12 de la microplaque respectivement. Ces deux puits servent comme témoin négatif (contrôle de la croissance) et contrôle de la stérilité de bouillon de sabouraud. Enfin, à l'aide d'une micropipette, nous avons transféré 50  $\mu$ l d'HE a testée dans le puits 1, le tout est bien mélangé pour que l'HE se dissolve complètement et ensuite 100  $\mu$ l sont transférés dans le puits suivant (**Figure 4**). Cette procédure de dilution en demi se répète jusqu'au 10<sup>ème</sup> puits pour obtenir les concentrations en HE dans les puits de 1 à 10 comme suit : 250/125/62.5/31.25/15.625/7.813/3.906/1.953/0.977 et 0.488  $\mu$ l/ml.



**Figure 3: Préparation de l'inoculum d'*aspergillus* pour la méthode de microdilution**



**Figure 4: Illustration schématique de la technique de microdilution en bouillon**

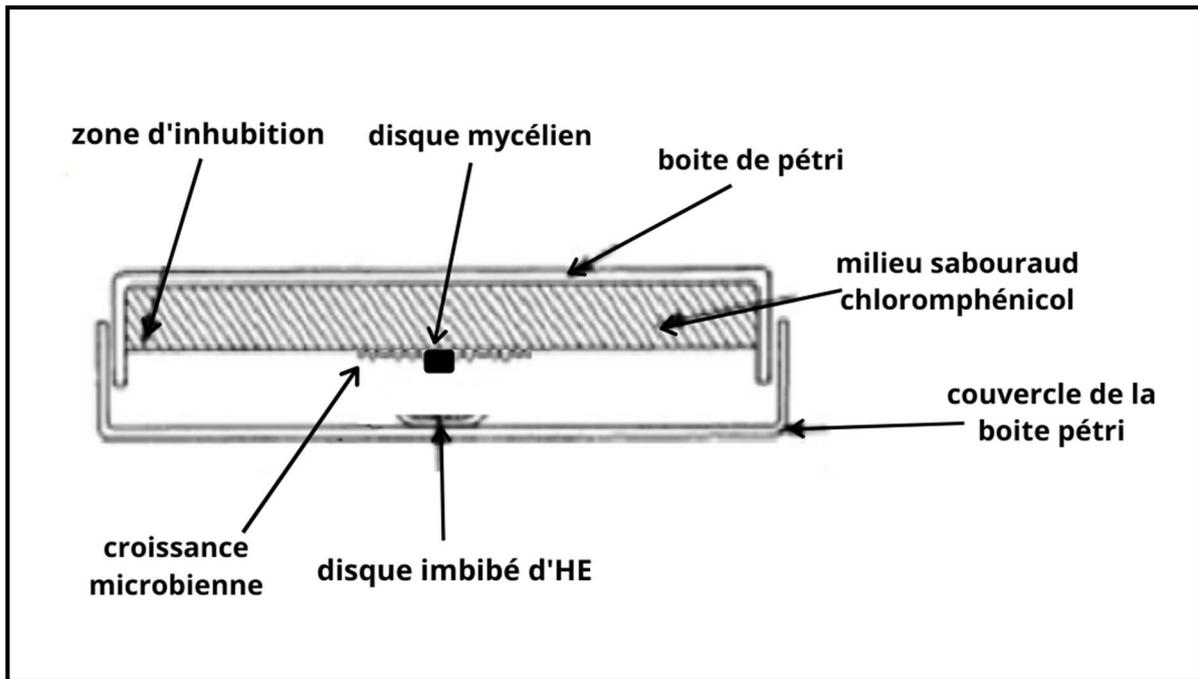
#### I.2.4.2. Méthode de microatmosphère

La méthode de la microatmosphère a été réalisée selon Benjilali et *al.*, (1984), et Landry et *al.*, (2021), afin d'évaluer la fraction volatile des HEs de *T. capitatus* L. et *O. fluribundum* Munby. contre nos isolats cliniques d'*Aspergillus fumigatus*.

Cette technique consiste à cultiver les micro-organismes dans des boîtes de Pétri sur un milieu gélosé, et à incuber ces boîtes en position inversée après avoir déposé l'HE sur un papier filtre au milieu du couvercle de la boîte. L'huile s'évapore dans l'atmosphère de la boîte et la phase volatile peut exercer son effet inhibiteur sur les micro-organismes inoculés comme le montre la **Figure 5**.

Cette méthode a été utilisée pour déterminer les concentrations minimales inhibitrices et fongicides de la phase volatile des HEs étudiées (CMI et CMF exprimées en  $\mu\text{l/ml}$  d'air) ainsi que les pourcentages d'inhibition.

Des boîtes de Pétri de diamètre 90 mm sont préparées immédiatement en les remplissant de 20 ml de milieu de Sabouraud chloramphénicol (20 ml de milieu de Sabouraud permettent d'obtenir 80 ml d'air dans chaque boîte). L'inoculation est effectuée en surface, sous forme de dépôts du disque mycélien (6 mm) de souches de moisissures préalablement cultivées sur le même milieu à 30°C pendant 7j, au centre de la boîte. Des papiers buvards de 6 mm de diamètre sont placés au fond du couvercle de chaque boîte de Pétri et imprégnés de différentes doses d'HE : 0 (témoin)/ 2.5/5/10/20 et 40  $\mu\text{l}/\text{disque}$ , équivalentes à des concentrations de 0/0.031/0.062/0.125/0.250 et 0.500  $\mu\text{l/ml}$  d'air, respectivement. Les boîtes sont immédiatement scellées avec du para-film pour éviter l'évaporation des HE, puis incubées à  $35 \pm 2$  ° C pendant 5 jours. Pour chaque bio-essais, deux répétitions ont été effectuées.



**Figure 5: Illustration de la méthode de microatmosphère (Amara et al., 2017)**

La croissance mycélienne a été suivie en mesurant la moyenne de deux diamètres perpendiculaires passant par le centre de chaque boîte. La fongitoxicité, exprimée en termes de pourcentage d'inhibition de la croissance du mycélium, a été calculée selon la formule suivante (Laghchimi et al., 2014) :

$$I\% = (Dt - Di) / Dt \times 100$$

Où :

- Dt est le diamètre de la culture de champignons (en mm) dans une boîte de pétri sans huile (témoin),
- Di est le diamètre de la culture de mêmes champignons dans un milieu en présence de l'HE.

Les concentrations minimales fongicides (CMF) ont été déterminées par transfert des disques mycéliens des boîtes de Pétri, où l'inhibition par les HE était complète, dans un nouveau milieu Sabouraud exempt d'HE. Une HE est fongistatique si la croissance du champignon reprend et fongicide ou létale s'il n'y a pas de croissance.

## II. Résultats

### II.1. Paramètres organoleptiques des HEs

Après extraction des HEs à partir de deux plantes aromatiques par hydrodistillation, une étude de quelques paramètres organoleptiques de celles-ci sont résumés dans le tableau 2.

**Tableau 2: Caractéristiques organoleptiques de l'HE d'*Origanum floribundum* Munby. et *Thymus capitatus* L..**

HE	Couleur	Odeur	Aspect
<i>Origanum floribundum</i> Munby.	Vert clair	Forte odeur	Liquide limpide
<i>Thymus capitatus</i> L.	Orangé foncé	Forte odeur	Liquide limpide

### II.2. Rendement des plantes en HE

Le tableau 3 récapitule les résultats de rendement moyen en HEs extraites à partir de 100 g de chaque plante aromatique.

**Tableau 3: Rendement des PAMs étudiées en HEs.**

PAMs	Quantité d'HE en gramme pour 100 g de matière végétale sèche	RHE (%)
<i>Origanum floribundum</i> Munby.	2.52 ± 0.16	2.52% ± 0.16
<i>Thymus capitatus</i> L.	1.89 ± 0.13	1.89% ± 0.13

Ces résultats prouvent que cette espèce d'origan donne un rendement en HE supérieur à celui du thym.

II.3. Résultats de l'évaluation de l'activité antifongique des HEs des deux Plantes aromatiques

II.3.1. Evaluation de l'activité antifongique des HEs par la méthode de microdilution en bouillon

Les résultats de la méthode de microdilution obtenue après 7 jours d'incubation sont montrés dans la Figure 6 et 7.

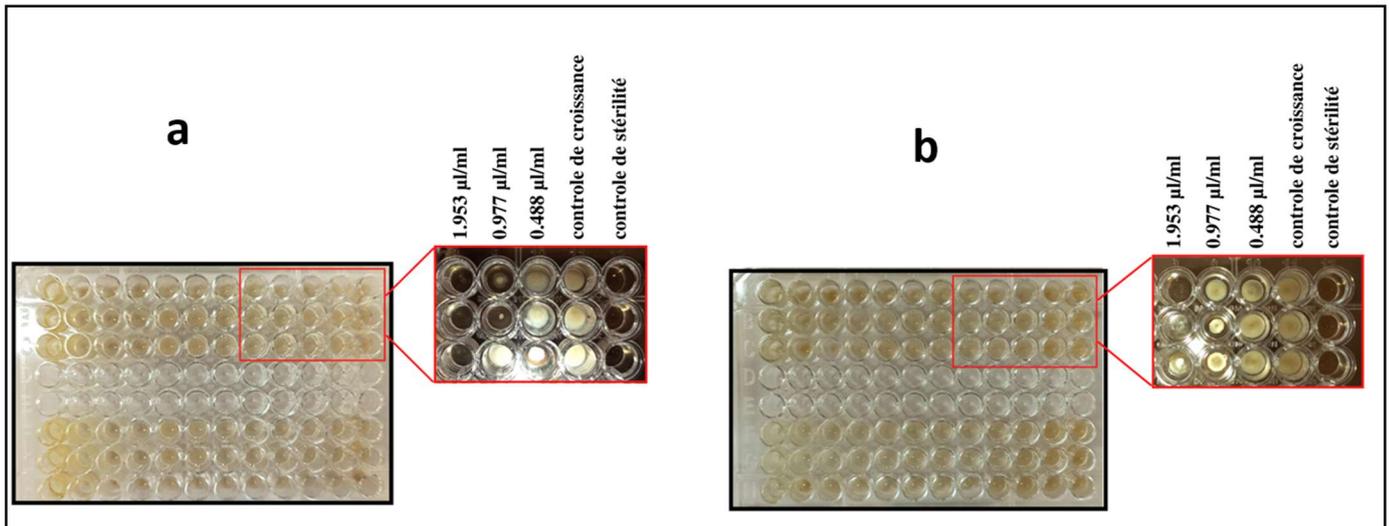


Figure 6: Résultats de test CMI par méthode de microdilution de *Thymus capitatus* L. (a) et *Origanum floribundum* Munby. (b)

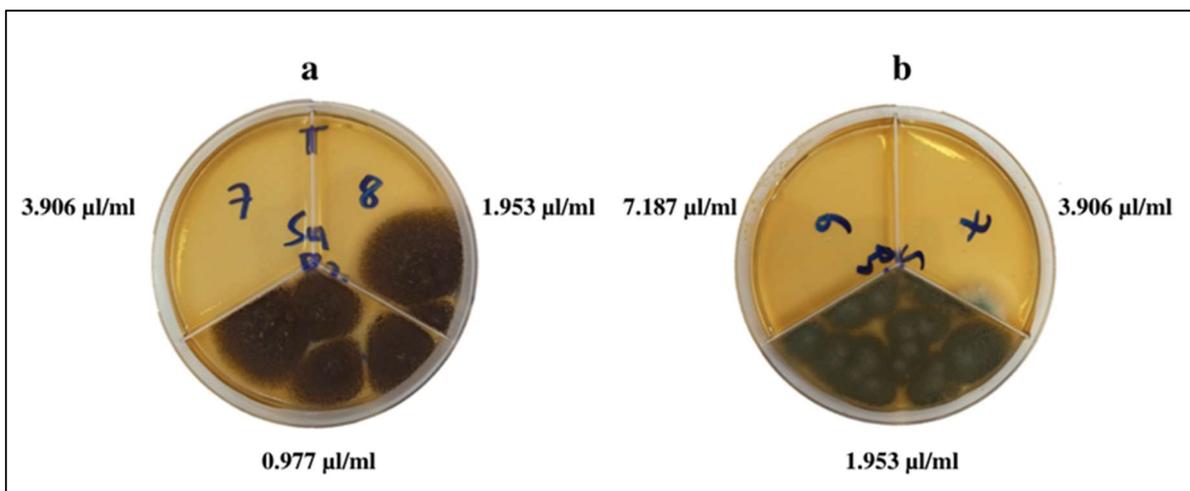


Figure 7: Résultats de test CMF pour les microplaques de *Thymus capitatus* L. (a) et d'*Origanum floribundum* Munby. (b)

Les valeurs des concentrations minimales inhibitrices (CMI) et concentrations minimales fongicides (CMF) des deux HEs testées aux cours de cette étude contre les quatre souches cliniques d'*Aspergillus fumigatus*. Sont collectés dans le tableau ci-dessous (Tableau 4) :

**Tableau 4: Concentration minimales inhibitrices (CMI) et concentration minimales fongicides (CMF) des HEs d'*Origanum floribundum* Munby. et *Thymus capitatus* L..**

souches	CMI (µl/ml)		CMF (µl/ml)	
	HE de TC	HE d'OF	HE de TC	HE d'OF
N°1	1.790 ±1.70	2.604 ±1.04	1.790 ±1.70	2.604 ±1.04
N°2	0.977 ±0.00	3.906 ±3.11	0.977 ±0.00	3.906 ±3.11
N°3	3.255 ±1.37	0.814 ±0.26	3.255 ±1.37	0.814 ±0.26
N°4	3.255 ±1.37	9.115 ±5.49	3.255 ±1.37	9.115 ±5.49

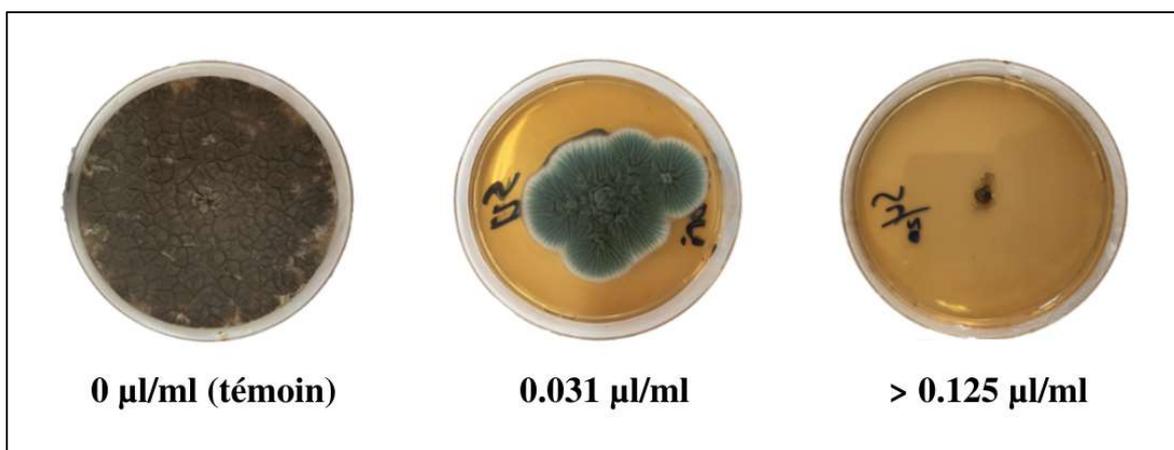
D'après les résultats obtenus par technique de microdilution en bouillon, l'HE de *Thymus capitatus* L. a enregistré des valeurs CMI et des valeurs CMF entre 0.977 et 3.255 µl/ml (soit 0.899 et 2.097 µg/ml).

Par ailleurs, l'HE d'*Origanum floribundum* Munby. a présenté des valeurs CMI et CMF comprise entre 0.814 et 9.115 µl/ml (soit 0.749 et 8.386 µg/ml). À la lumière de ces résultats, il paraît que les valeurs de CMI de l'HE d'*Origanum floribundum* Munby. sont supérieur à celui de *Thymus capitatus* L.

### II.3.2. Evaluation de l'activité antifongique des HEs par méthode de microatmosphère

#### II.3.2.1. Evaluation de la fongitoxicité de la phase volatile de l'HE de *Thymus capitatus* L.

Les résultats de la méthode de fumigation sont montrés dans la **Figure 8 et 9**.



**Figure 8: Résultats de test CMI par méthode de microatmosphère de l'HE d'*Origanum floribundum* Munby.**



**Figure 9: Résultats de test CMI par méthode de microatmosphère de l'HE de *Thymus capitatus* L.**

Les résultats de l'inhibition de croissance d'*A. fumigatus* de la phase volatile de l'HE de thym en pourcentage ont été représentés dans le tableau ci-dessous (**Tableau 5**).

**Tableau 5: Pourcentage d'inhibition de la croissance fongique des souches d'*Aspergillus fumigatus*, testées par fumigation d'HE de *Thymus capitatus* L..**

Doses (µl/ml d'air)	Inhibition de la croissance fongique (%)			
	N°1	N°2	N°3	N°4
<b>0.031</b>	76.11%	63.89%	100.00%	68.06%
<b>0.062</b>	100.00%	100.00%	100.00%	72.22%
<b>0.125</b>	100.00%	100.00%	100.00%	100.00%
<b>0.250</b>	100.00%	100.00%	100.00%	100.00%
<b>0.500</b>	100.00%	100.00%	100.00%	100.00%
<b>Témoin</b>	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%

Les doses comprises entre 0.125 et 0.500 µl/ml d'air (soit 0.115 et 0.460 µg/ml d'air) d'HE de cette plante sont des doses qui assurent une inhibition totale de la croissance fongique de toutes les souches testées.

En revanche, on observe une inhibition partielle aux doses comprises entre 0.031 et 0.062 µl/ml d'air (soit 0.029 et 0.058 µg/ml d'air).

### II.3.2.2. Evaluation de la fongitoxicité de la phase volatile de l'HE d'*Origanum floribundum* Munby.

Le **tableau 6** représente les résultats de l'activité antifongique de la fraction volatile de l'HE d'*Origanum floribundum* Munby.

**Tableau 6: Pourcentage d'inhibition de la croissance fongique des différentes souches d'*Aspergillus fumigatus*, testées par fumigation d'HE d'*Origanum floribundum* Munby..**

Doses (µl/ml d'air)	Inhibition de la croissance fongique (%)			
	N°1	N°2	N°3	N°4
<b>0.031</b>	62.50%	65.28%	66.66%	70.26%
<b>0.062</b>	77.50%	80.00%	84.17%	79.72%
<b>0.125</b>	100.00%	100.00%	100.00%	100.00%
<b>0.250</b>	100.00%	100.00%	100.00%	100.00%
<b>0.500</b>	100.00%	100.00%	100.00%	100.00%
<b>Témoin</b>	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%

Les résultats de la sensibilité de l'*Aspergillus fumigatus* vis-à-vis l'HE d'origan ont montré que :

- Les concentrations entre 0.125 et 0.500 µl/ml d'air (soit 0.115 et 0.460 µg/ml d'air) d'HE d'*Origanum floribundum* Munby. assurent une inhibition totale de la croissance fongique de toutes les souches testées.
- Par contre, les doses comprises entre 0.031 et 0.062 µl/ml d'air (soit 0.029 et 0.058 µg/ml d'air) assurent une inhibition partielle de croissance des quatre souches d'*Aspergillus fumigatus*.
- En général, les deux HEs ont assurées une inhibition de la croissance fongique avec les mêmes doses.

**II.3.2.3. Détermination des valeurs de CMI et CMF de la fraction volatiles des HEs testées par méthode de microatmosphère**

Les valeurs de CMI et de CMF de la phase volatiles des HEs testées contre les isolats cliniques d'*Aspergillus fumigatus* sont récapitulées dans le tableau suivant (Tableau 7) :

**Tableau 7: Valeurs de CMI et CMF de la fraction volatile des HEs d'*Origanum floribundum* Munby. et *Thymus capitatus* L..**

souches	CMI (µl/ml d'air)		CMF (µl/ml d'air)	
	HE de TC	HE d'OF	HE de TC	HE d'OF
N°1	0.062	0.125	0.500	0.250
N°2	0.062	0.125	0.500	0.500
N°3	0.031	0.125	0.125	0.250
N°4	0.125	0.125	0.500	0.500

Les résultats de technique de microatmosphère ont montrés que :

- Pour l'HE d'origan, la valeur CMI était de 0.125 µl/ml d'air (0.115 µg/ml d'air), par contre les valeurs de CMFs sont appariaient plus importantes variant entre 0.250 et 0.500 µl/ml d'air (entre 0.230 et 0.460 µg/ml d'air).

- Pour l'HE de thym, des valeurs très faibles ont été enregistrées des CMI<sub>s</sub> entre 0.031 et 0.125 µl/ml d'air (soit 0.029 à 0.115 µg/ml d'air). De même, des valeurs plus importantes de CMF<sub>s</sub> ont été enregistrées entre 0.125 et 0.500 µl/ml d'air (0.115 à 0.460 µg/ml d'air).
- En général, la phase volatile des deux HEs a montré une activité antifongique comparable, mais il semble que le pouvoir antifongique soit mieux avec le thym.

### III. Discussion

Dans ces dernières années, le dépistage des activités antifongiques des plantes médicinales et aromatiques est devenu important pour trouver de nouveaux composés potentiels à des fins médicinales. Dans de nombreux pays, certaines maladies infectieuses ont été traitées avec des remèdes à base de plantes (Verma et Singh, 2008). De plus, certains champignons pathogènes surtout les agents émergents, ont développés dans ces dernières décennies une résistance à de nombreux agents antifongiques (Patterson et *al.*, 2016; Bueid et *al.*, 2010). Il est donc très important de s'intéresser aux propriétés antifongiques des plantes médicinales, en particulier leurs essences, les HEs.

Dans la présente étude, les HEs ont été extraites par hydrodistillation à l'aide d'un appareil de type Clevenger, des parties aériennes d' "*Origanum floribundum* Munby." et de "*Thymus capitatus* L.", deux plantes endémique de la région de Guelma.

L'espèce *Origanum floribundum* Munby. nous a fourni un rendement moyen de 2.52% (w/w). Ce résultat est très proche de ce qui a été relevé par Djebir, (2020) dans son étude sur l'activité acaricide de cette espèce végétale échantillonnée en juin 2015 sur le même site d'échantillonnage avec 2.48% (w/w). Dans d'autres études faites en Algérie, qui ont montré des résultats différents, Hadjadj et Hazzit (2020) ont montré que le rendement moyen d'*O.floribundum* collecté en février 2017 sur deux sites différents de la région de Blida à Chréa et Hammam Melouane, se situait entre 2.9 et 3% (w/w) ce qui est légèrement supérieur à nos résultats, une autre étude faite par Kerbouche et *al.*, (2015). A également trouvé un rendement moyen plus élevé 3.04% (w/w). De même, les échantillons de cette plante qui ont été collectés en Juillet 2011 au stade de la floraison dans les régions de Boussaada et Lakhdaria. Daoudi-Merbah et *al.*, (2016) ont aussi montré une moyenne de rendement relativement élevée par rapport à nos résultats, les six spécimens d'*O.floribundum* qui ont été récoltés dans quatre localités différentes au Parc National de Chréa ont montré une moyenne de rendement allant de 4.23 à 5.34% (w/w), d'autre part, des résultats très bas ont été enregistrés par Baser et *al.*, (2000), où là encore le matériel végétal a été récolté dans le Parc National de Chréa en juin 1988, le rendement moyen en huile était de 0.66%.

Les échantillons de *Thymus capitatus* L. nous ont permis de déterminer le rendement moyen en HE, qui est de 1.89% (w/w). Ce qui, en comparaison avec d'autres études réalisées en Algérie, est considéré comme un rendement moyen élevé, les résultats les plus proches des nôtres étant ceux de Goudjil et *al.*, (2020). Les feuilles de *T.capitatus* récoltées en février 2019 dans la région de Tiaret (ouest de l'Algérie), ont montré un rendement moyen de 1.59%. Des résultats encore plus faibles ont été enregistrés par Tabti et *al.*, (2014) et Ben Miri et Djenane, (2019). La première étude a été faite sur des plantes de *T.capitatus* collectées dans les forêts de Beni-Snous près de Tlemcen, dans l'ouest de l'Algérie au cours du mois de mai 2011. Cette étude a montré un rendement en HE de 0.52% (w/w). La seconde, *Thymus capitatus* collectée à Mesghana, Tizi- Ouzou, Algérie, en juin 2015. A fourni un niveau de rendement de  $0.82\% \pm 0.12$  HE. Dans les autres pays du grand Maghreb, le rendement moyen enregistré varie d'une région à l'autre, dans le cas des études de Zaïri et *al.*, (2019), où les parties aériennes des échantillons de *T.capitatus* investigués ont été récoltées au stade de la floraison complète en février et mars 2016 à Kairouan, Tunisie. Le rendement en HE était plus faible que le nôtre, soit 0.82%. Au Maroc, El Ouariachi et *al.*, (2011) ont rapporté un rendement moyen très faible par rapport à nos résultats, de 0.5% (w/w), les résultats ont été obtenus à partir de *T.capitatus* collecté à Al Hoceima (trois échantillons), Maroc, en, février 2009. Une autre étude en Tunisie faite par Akrouit et *al.*, (2010) où le matériel végétal a été collecté en 2007 à partir de populations naturelles à Beni-Khedache (région montagneuse dans le sud de la Tunisie), ont montré un rendement moyen de 2.39% (w/w), ce qui est légèrement plus élevé que ce que nous avons enregistré dans notre étude. En Libye, une étude faite par Džamić et *al.*, (2015) a montré que des *T. capitatus* sauvages collectés en, mai 2010, pendant la phase de floraison, à Zintan, Libye. Ont un rendement moyen de 4.57% (w/w). Ce qui est le plus élevé que nous avons rencontré dans les études de la région du grand Maghreb.

Dans le reste du monde, des valeurs de rendement plus élevées que celles fournies par notre étude ont été enregistrées. Au Portugal, Faleiro et *al.*, (2005) ont montré un rendement moyen de 2.67% (w/w), obtenu à partir d'une population de *Thymus capitatus* L. Dans une autre étude italienne, Russo et *al.*, (2013) sur des populations sauvages de *Thymus capitatus* récoltées sur quatre sites différents dans la région de Calabria, au sud-ouest de l'Italie. Le rendement moyen est apparu à nouveau beaucoup plus élevé que le nôtre, allant de 3.02 à 3.44%.

Dans cette étude, deux techniques ont été utilisées pour estimer l'activité antifongique des HEs d'*Origanum floribundum* Munby. et de *Thymus capitatus* L. en déterminant les valeurs de la concentration minimale inhibitrice (CMI), et de la concentration minimale fongicide (CMF), à la fois en contact direct (test de microdilution) et en phase volatile (méthode de microatmosphère), contre quatre isolats cliniques d'*Aspergillus fumigatus*.

En ce qui concerne les résultats de la microdilution en bouillon, les deux HEs ont montré une importante activité inhibitrice et létale contre les quatre isolats d'*A.fumigatus*. Des CMIs et CMFs entre 0.899 et 2.097 µg/ml ont été enregistrées pour l'HE de *Thymus capitatus* L. D'autre part, les valeurs CMIs et CMFs enregistrées à partir de l'HE d'*Origanum floribundum* Munby. étaient entre 0.749 et 8.386 µg/ml. Dans la littérature, peu d'études ont été faites sur l'évaluation de l'activité antifongique des HEs de *Thymus capitatus* L. et d'*Origanum floribundum* Munby. contre *Aspergillus fumigatus*.

En dépit, Salgueiro et al., (2004) ont testé l'activité antimicrobienne du *Thymus capitatus* et de ses différents composants chimiques contre des souches de *candida*, *aspergillus* et dermatophytes, les valeurs CMIs obtenues variaient entre 0.15 et 0.29 µg/ml, et les valeurs CMFs entre 0.29 et 0.59 µg/ml, ces résultats montrent une meilleure activité antifongique que celle enregistrée dans notre étude, une autre enquête sur l'activité inhibitrice in vitro des HEs de *Thymus capitatus* L. contre des germes de la microflore cutanée, a été réalisé par Salah et al., (2006) où une activité d'inhibition vis-à-vis *Aspergillus fumigatus* a été notée à des concentrations comprises entre 200 et 300 µg/ml. Ces valeurs sont très supérieures à ce qui enregistrées dans la présente étude. Pour l'*Origanum floribundum* Munby. aucune étude n'a été trouvée dans la littérature.

Dans la bibliographie, d'autres investigations ont testé la sensibilité d'*Aspergillus fumigatus* à autre HEs avec des compositions chimiques proches de la nôtre.

Tullio et al., (2007) ont testé la sensibilité d'*Aspergillus fumigatus* et d'autres espèces microbiennes à l'HE de *Thymus vulgaris* L. Ces auteurs ont montré que l'HE de cette plante est doté d'une activité inhibitrice de la croissance d'*Aspergillus fumigatus* à une concentration de 0.23 µg/ml, très forte par rapport à notre espèce de thym.

De même, une autre étude de Sharifzadeh et al., (2016) sur *Aspergillus fumigatus* avec l'HE de *Thymus vulgaris*, ou ils ont enregistré une valeur CMI de 1000 µg/ml, et de

CMF de 1500 $\mu$ g/ml, ce qui apparait une faible activité anti-*Aspergillus* par rapport à notre plante *Thymus capitatus* L.

En outre, Ebani *et al.*, (2018) ont étudié l'activité antifongique des HEs de *Thymus vulgaris* et *Origanum vulgare* contre *Aspergillus fumigatus*, l'HE de la première plante a enregistré une valeur de CMI de 5.72  $\mu$ g/ml contre *Aspergillus fumigatus*, ce qui est plus élevé que la valeur de CMI enregistré dans notre travail. En revanche la deuxième plante, *Origanum vulgare* a enregistré une valeur de CMI égale à 0.19  $\mu$ g/ml, qui est donc plus faible que la nôtre. Dans une autre enquête réalisée par Vale-Silva *et al.*, (2012) sur la corrélation entre les composants chimiques de l'HE d'*Origanum vulgare* et son activité antifongique in vitro, les valeurs de CMIs contre *Aspergillus fumigatus* étant comprises entre 0.29 et 0.59  $\mu$ g/ml, et des CMFs entre 0.59 et 4.60  $\mu$ g/ml, ce qui reflète une activité antifongique plus élevée que celle de notre plante *Origanum floribundum* Munby..

En revenant à la deuxième technique utilisée dans cette étude, la méthode de microatmosphère, les résultats ont montré une excellente activité inhibitrice et létale des deux HEs en phase volatile. Les résultats de cette méthode ont révélé des valeurs de CMIs et de CMFs beaucoup plus faibles pour le *Thymus capitatus* L. (CMI : 0.029 à 0.115  $\mu$ g/ml d'air et CMF : 0.115 à 0.460  $\mu$ g/ml d'air). A propos *Origanum floribundum* Munby., nous avons enregistré une valeur de CMI de 0.115  $\mu$ g/ml d'air et une CFM allant de 0.230 à 0.460  $\mu$ g/ml d'air. Dans la bibliographie, nous n'avons pas trouvé de traces d'études sur le pouvoir antifongique de la fraction volatile des HEs d'*Origanum floribundum* Munby. et de *Thymus capitatus* L. vis-à-vis *Aspergillus fumigatus*, Une seule étude réalisé par Tullio *et al.*, (2007) a été trouvée, où le pouvoir anti-*aspergillus* de l'HE de *Thymus vulgaris* a était évalué, les résultats semblent proches de ceux de *Thymus capitatus* L. enregistrés dans le présent travail, la CMI était comprise entre 0.007 et 0.029  $\mu$ g/ml d'air et la CMF à 0.92  $\mu$ g/ml d'air.

Par comparaison de ces résultats de la phase mobile des HEs avec la première technique de contact direct il semblerait que l'évaluation de l'activité antifongique des HEs est influencée par la méthode de test utilisée, comme en témoignent les différences entre les CMIs obtenues par les méthodes de microdilution en bouillon et de microatmosphère (pour la méthode de microdilution les valeurs de CMI et CMF des deux HEs sont comprise entre 0.749 et 8.386  $\mu$ g/ml. Par contre, à la méthode de microatmosphère les valeurs de CMIs et CMFs ont été entre 0.029 à 0.460  $\mu$ g/ml d'air pour les deux HEs testées). Les résultats obtenus par la méthode de la microatmosphère ont montré des valeurs de CMIs et de CMFs

beaucoup plus faibles pour les deux HEs par rapport la méthode de contact direct. Donc il semblerait que les deux HEs peuvent avoir une activité inhibitrice beaucoup plus forte lorsqu'elles sont testées à l'état de vapeur qu'en phase liquide.

On pense que les volatiles lipophiles sont absorbés par le champignon de manière efficace via la phase gazeuse. L'absorption importante de ces huiles par les mycéliums fongiques par rapport au milieu sabouraud est lié à la nature hautement lipophile des mycéliums associée à une grande surface par rapport au volume d'un champignon filamenteux (Inouye et *al.*, 2000). En revanche, la dissolution des HEs dans le milieu de culture liquide (à propriété aqueuse) à l'aide d'un solvant n'est pas suffisante. Dans le présent travail par exemple, nous avons choisi Tween 80 à 2% comme solvant, qui apparait incapable de dissoudre l'HEs surtout dans les concentrations les plus élevées (surtout puits N°1 : 250 µg/ml et puits N°2 : 125 µg/ml) ce qui est expulsé les microgouttelettes des HEs insolubles dans l'eau en surface de bouillon de sabouraud. Donc, il est très clair que le fumigant des HEs est très pratique et rationnel comme forme galénique, en assurant un effet inhibiteur plus fort.

Ces observation sur la forte activité antifongique des vapeurs mise en évidence dans cette étude est en concordance avec les résultats de Suhr et Nielsen, (2003). Bien qu'une comparaison d'études avec des méthodologies différentes soit difficile, ces auteurs ont montré que les huiles de thym et de girofle étaient plus efficaces à l'état de vapeur contre *Aspergillus flavus*.

Enfin, nos résultats en général ont montré une activité antifongique importante contre les quatre souches d'*Aspergillus fumigatus*, les différences qui ont été trouvées entre nos résultats et ceux trouvés dans la littérature peuvent être expliquées principalement par une variété de facteurs qui affectent la composition chimique des HEs. Il s'agit notamment de la génétique, de la morphogenèse, de l'environnement (intensité/durée de la lumière et altitude) et des pratiques agricoles (Dorman, 1999).

Cette différence dans l'effet des HEs n'est pas observée uniquement entre les plantes, mais aussi de la même espèce végétale récoltées dans des sites différents. Ces différences ont été notées pour l'*Origanum* par Putievsky et *al.*, (1988) et pour *Thymus vulgaris* par Gouyon et *al.*, (1986). Selon (Ravid et Putievsky, 1984; Lincoln et Langenheim, 1978) la teneur et la composition des HEs sont liées à la position et à l'âge des feuilles aussi, plus les feuilles sont jeunes, plus la teneur et la quantité d'HE par unité de feuille sont élevées par

rapport aux feuilles plus âgées. Les conditions environnementales également peuvent avoir un effet significatif sur les huiles volatiles (Dorman, 1999). Une même variété de plante peut présenter de grandes variations dans ses principaux composants lorsqu'elle est cultivée dans des lieux différents. Les plus importantes de ces variables sont la température (Novák et *al.*, 2011), la durée du jour et l'intensité lumineuse (Dorman, 1999). Tous ces facteurs, qui modifient la composition chimique des HEs, ont une incidence considérable sur les activités biologiques des HEs. Sachant que le pouvoir antifongique des HEs des deux plantes qui ont été testées dans la présente étude est lié à leur composition chimique.

## IV. Conclusion

L'objectif de cette étude était de valoriser l'activité antifongique de deux plantes aromatiques, endémiques algériennes poussant spontanément dans la région de Guelma et qui sont très utilisées en médecine traditionnelle par la population locale : Zaater ou *Origanum floribundum* Munby. et Zaïtra ou *Thymus capitatus* L. Notre étude a porté sur l'estimation de l'activité antifongique des HEs de ces deux plantes en phase liquide et à l'état de vapeur, en déterminant les valeurs de la concentration minimale inhibitrice et de la concentration minimale fongicide.

L'étude de l'activité antifongique des HEs a révélé qu'elles ont une action inhibitrice et létale contre quatre souches d'*Aspergillus fumigatus* responsables de l'aspergillose respiratoire des poulets de chair.

L'extraction de l'HE par hydrodistillation des feuilles et des sommités fleuries de *Thymus capitatus* L. et d'*Origanum floribundum* Munby. a fourni des rendements non négligeables en HEs (1.89% et 2.52% respectivement).

Les résultats d'évaluation d'activité anti-aspergillaire ont été encourageants, les deux HEs ont un pouvoir antifongique significatif aussi bien à l'état liquide qu'à l'état de vapeur, les valeurs CMI et CMF pour *Origanum floribundum* Munby. se situaient entre 0.749 et 8.386 µg/ml lors du test de microdilution, tandis que pour le test de microatmosphère elles tombaient dans la fourchette de 0.115 à 0.460 µg/ml d'air. Comme pour *Thymus capitatus* L. où les valeurs CMI et CMF au premier test se situaient entre 0.899 et 2.097 µg/ml et à la phase vapeur entre 0.029 et 0.460 µg/ml d'air.

Selon les résultats obtenus, la plus grande activité a été enregistrée à partir de la phase vapeur des HEs, ou la CMI pour les deux HEs était comprise entre 0.029 et 0.115 µg/ml d'air, et la CMF entre 0.115 et 0.460 µg/ml d'air.

L'état liquide a également présenté d'excellents résultats, avec des valeurs de CMI et de CMF variant entre 0.749 et 8.386 µg/ml pour les deux HEs.

Enfin, au bout de notre étude, nous pouvons conclure que les HEs testées peuvent constituer une réelle alternative aux antifongiques synthétiques conventionnels et un moyen possible de renforcer l'utilisation des traitements biologiques dans le marché vétérinaire.

Afin de poursuivre et d'approfondir ce travail, il serait nécessaire :

- De déterminer la composition chimique des deux huiles essentielles testées.
- De réaliser des tests in vivo pour évaluer leur efficacité contre *Aspergillus fumigatus*, chez l'animal.
- De faire des synergies avec d'autres huiles de chymotype différent, voire avec d'autres antifongiques synthétique.

## REFERANCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Adorjan, B., Buchbauer, G., 2010. Biological properties of essential oils: an updated review. *Flavour Fragr. J.* 25, 407–426. <https://doi.org/10.1002/ffj.2024>
2. Akrouf, A., Jani, H.E., Amouri, S., Neffati, M., 2010. Screening of antiradical and antibacterial activities of essential oils of *Artemisia campestris* L., *artemisia Herba Alba asso*, & *Thymus capitatus* hoff. et link. growing wild in the southern of Tunisia 12.
3. Ali, B., Al-Wabel, N.A., Shams, S., Ahamad, A., Khan, S.A., Anwar, F., 2015. Essential oils used in aromatherapy: A systemic review. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine* 5, 601–611. <https://doi.org/10.1016/j.apjtb.2015.05.007>
4. Amara, N., Boukhatem, M.N., Ferhat, M.A., Kaibouche, N., Laissaoui, O., Boufridi, A., 2017. Applications potentielles de l'huile essentielle de Lavande papillon (*Lavandula stoechas* L.) comme conservateur alimentaire naturel. *Phytothérapie*. <https://doi.org/10.1007/s10298-017-1158-4>
5. András, C., Salamon, B., György, É., Mihok, E., Szép, A., 2018. Essential oil extraction from herbs and their use in the food industry. *Acta agrar. Debr.* 59–74. <https://doi.org/10.34101/actaagrar/150/1702>
6. Astani, A., Reichling, J., Schnitzler, P., 2011. Screening for Antiviral Activities of Isolated Compounds from Essential Oils. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* 2011, 1–8. <https://doi.org/10.1093/ecam/nep187>
7. Astani, A., Reichling, J., Schnitzler, P., 2010. Comparative study on the antiviral activity of selected monoterpenes derived from essential oils: antiviral activity of monoterpenes derived from essential oils. *Phytother. Res.* 24, 673–679. <https://doi.org/10.1002/ptr.2955>
8. Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D., Idaomar, M., 2008. Biological effects of essential oils – A review. *Food and Chemical Toxicology* 46, 446–475. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2007.09.106>
9. Balloy, V., Chignard, M., 2009. The innate immune response to *Aspergillus fumigatus*. *Microbes and Infection* 11, 919–927. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2009.07.002>
10. Baser, K.H.C., Kürkçüoğlu, M., Houmani, Z., Abed, L., 2000. Composition of the Essential Oil of *Origanum floribundum* Munby from Algeria. *Journal of Essential Oil Research* 12, 753–756. <https://doi.org/10.1080/10412905.2000.9712208>
11. Beernaert, L.A., Pasmans, F., Van Waeyenberghe, L., Haesebrouck, F., Martel, A., 2010. *Aspergillus* infections in birds: a review. *Avian Pathology* 39, 325–331. <https://doi.org/10.1080/03079457.2010.506210>
12. Ben Miri, Y., Djenane, D., 2019. Antifungal, Anti-aflatoxigenic, Antioxidant Activity and in vivo Efficacy of Essential Oil of the Aerial Parts of *Thymus capitatus* (L.) Hoffmanns & Link. *Phytothérapie* 17, 299–309. <https://doi.org/10.3166/phyto-2018-0032>
13. Benjilali, B., Tantaoui-Elaraki, A., Ayadi, A., Ihlal, M., 1984. Method to Study Antimicrobial Effects of Essential Oils: Application to the Antifungal Activity of Six Moroccan Essences. *Journal of Food Protection* 47, 748–752. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-47.10.748>
14. Bodey, G.P., Vartivarian, S., 1989. Aspergillosis. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 8, 413–437. <https://doi.org/10.1007/BF01964057>

15. Bueid, A., Howard, S.J., Moore, C.B., Richardson, M.D., Harrison, E., Bowyer, P., Denning, D.W., 2010. Azole antifungal resistance in *Aspergillus fumigatus*: 2008 and 2009. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 65, 2116–2118. <https://doi.org/10.1093/jac/dkq279>
16. Cano-Jiménez, E., Acuña, A., Botana, M.I., Hermida, T., González, M.G., Leiro, V., Martín, I., Paredes, S., Sanjuán, P., 2016. Farmer's Lung Disease. A Review. *Archivos de Bronconeumología (English Edition)* 52, 321–328. <https://doi.org/10.1016/j.arbr.2016.03.018>
17. Clevenger, J.F., 1928. Apparatus for the Determination of Volatile Oil\*. *The Journal of the American Pharmaceutical Association (1912)* 17, 345–349. <https://doi.org/10.1002/jps.3080170407>
18. Cooke, B., Ernst, E., 2000. Aromatherapy: a systematic review. *Br J Gen Pract* 50, 493–496.
19. Couic-Marinier, F., Lobstein, A., 2013. Mode d'utilisation des huiles essentielles. *Actualités Pharmaceutiques* 52, 26–30. <https://doi.org/10.1016/j.actpha.2013.02.007>
20. Dagenais, T.R.T., Keller, N.P., 2009. Pathogenesis of *Aspergillus fumigatus* in Invasive Aspergillosis. *Clin Microbiol Rev* 22, 447–465. <https://doi.org/10.1128/CMR.00055-08>
21. Daoudi-Merbah, F., Hazzit, M., Dahmani-Megrerouche, M., 2016. Influence of Morphological Variability and Habitat on the Chemical Composition of Essential Oils of an Algerian Endemic *Origanum* Species ( *Origanum floribundum* MUNBY ). *Chem. Biodiversity* 13, 1088–1094. <https://doi.org/10.1002/cbdv.201500509>
22. Denning, D.W., Venkateswarlu, K., Oakley, K.L., Anderson, M.J., Manning, N.J., Stevens, D.A., Warnock, D.W., Kelly, S.L., 1997. Itraconazole resistance in *Aspergillus fumigatus*. *Antimicrob Agents Chemother* 41, 1364–1368. <https://doi.org/10.1128/AAC.41.6.1364>
23. Djebir S., 2020. Inventaire des espèces des tiques parasites des bovins dans la région de Guelma et évaluation des propriétés acaricides des huiles essentielles de quelques espèces de Lamiaceae et de Myrtaceae sur les tiques. Thèse de doctorat, Université de Chadli Benjdid El-Tarf.
24. Dorman, H.J.D., 1999. Phytochemistry and Bioactive Properties of Plant Volatile Oils: Antibacterial, Antifungal and Antioxidant Activities 382.
25. Dorman, H.J.D., Deans, S.G., 2000. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. *J Appl Microbiol* 88, 308–316. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2000.00969.x>
26. Džamić, A.M., Nikolić, B.J., Giweli, A.A., Mitić-Ćulafić, D.S., Soković, M.D., Ristić, M.S., Knežević-Vukčević, J.B., Marin, P.D., 2015. Libyan *Thymus capitatus* essential oil: antioxidant, antimicrobial, cytotoxic and colon pathogen adhesion-inhibition properties. *J Appl Microbiol* 119, 389–399. <https://doi.org/10.1111/jam.12864>
27. Ebani, V., Nardoni, S., Bertelloni, F., Pistelli, L., Mancianti, F., 2018. Antimicrobial Activity of Five Essential Oils against Bacteria and Fungi Responsible for Urinary Tract Infections. *Molecules* 23, 1668. <https://doi.org/10.3390/molecules23071668>
28. El Ouariachi, E.M., Salghi, R., Majidi, L., Costa, J., Hammouti, B., 2011. Chemical composition and antioxidant activity of essential oils and solvent extracts of *Thymus capitatus* (L.) Hoffmanns and link from Morocco. *J. Med. Plants Res.* 6.
29. Espinel-Ingroff, A., Cantón, E., 2007. Antifungal Susceptibility Testing of Filamentous Fungi, in: *Antimicrobial Susceptibility Testing Protocols*. p. 33.

30. Faleiro, L., Miguel, G., Gomes, S., Costa, L., Venâncio, F., Teixeira, A., Figueiredo, A.C., Barroso, J.G., Pedro, L.G., 2005. Antibacterial and Antioxidant Activities of Essential Oils Isolated from *Thymbra capitata* L. (Cav.) and *Origanum vulgare* L. J. Agric. Food Chem. 53, 8162–8168. <https://doi.org/10.1021/jf0510079>
31. García, C.C., Talarico, L., Almeida, N., Colombres, S., Duschatzky, C., Damonte, E.B., 2003. Virucidal activity of essential oils from aromatic plants of San Luis, Argentina: virucidal activity of essential oils. Phytother. Res. 17, 1073–1075. <https://doi.org/10.1002/ptr.1305>
32. Gautam, N., Mantha, A.K., Mittal, S., 2014. Essential Oils and Their Constituents as Anticancer Agents: A Mechanistic View. BioMed Research International 2014, 1–23. <https://doi.org/10.1155/2014/154106>
33. Gavalda, J., Len, O., San Juan, R., Aguado, J.M., Fortun, J., Lumbreras, C., Moreno, A., Munoz, P., Blanes, M., Ramos, A., Rufi, G., Gurgui, M., Torre-Cisneros, J., Montejo, M., Cuenca-Estrella, M., Rodriguez-Tudela, J.L., Pahissa, A., resitra (Spanish Network for Research on Infection in Transplantation), 2005. Risk Factors for Invasive Aspergillosis in Solid-Organ Transplant Recipients: A Case-Control Study. Clinical Infectious Diseases 41, 52–59. <https://doi.org/10.1086/430602>
34. Gooch, J.W. (Ed.), 2011. Encyclopedic Dictionary of Polymers. Springer New York, New York, NY. <https://doi.org/10.1007/978-1-4419-6247-8>
35. Goodley, J.M., Clayton, Y.M., Hay, R.J., 1994. Environmental sampling for aspergilli during building construction on a hospital site. Journal of Hospital Infection 26, 27–35. [https://doi.org/10.1016/0195-6701\(94\)90076-0](https://doi.org/10.1016/0195-6701(94)90076-0)
36. Goudjil, M.B., Zighmi, S., Hamada, D., Mahcene, Z., Bencheikh, S.E., Ladjel, S., 2020. Biological activities of essential oils extracted from *Thymus capitatus* (Lamiaceae). South African Journal of Botany 128, 274–282. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2019.11.020>
37. Gouyon, P.H., Vernet, P., Guillermin, J.L., Valdeyron, G., 1986. Polymorphisms and environment: the adaptive value of the oil polymorphisms in *Thymus vulgaris* L. Heredity 57, 59–66. <https://doi.org/10.1038/hdy.1986.87>
38. Hadjadj, N., Hazzit, M., 2020. Analysis and Antioxidant Activity of Essential Oils and Methanol Extracts of *Origanum floribundum* Munby. Journal of Essential Oil Bearing Plants 23, 85–96. <https://doi.org/10.1080/0972060X.2020.1729867>
39. Hajhashemi, V., Ghannadi, A., Sharif, B., 2003. Anti-inflammatory and analgesic properties of the leaf extracts and essential oil of *Lavandula angustifolia* Mill. Journal of Ethnopharmacology 89, 67–71. [https://doi.org/10.1016/S0378-8741\(03\)00234-4](https://doi.org/10.1016/S0378-8741(03)00234-4)
40. Inouye, Tsuruoka, Watanabe, Takeo, Akao, Nishiyama, Yamaguchi, 2000. Inhibitory effect of essential oils on apical growth of *Aspergillus fumigatus* by vapour contact. Mycoses 43, 17–23. <https://doi.org/10.1046/j.1439-0507.2000.00538.x>
41. Institut Pasteur, 2015. Aspergillose. Institut Pasteur. URL <https://www.pasteur.fr/fr/centre-medical/fiches-maladies/aspergillose> (accessed 6.16.21).
42. Kalemba, D., Kunicka, A., 2003. Antibacterial and Antifungal Properties of Essential Oils. CMC 10, 813–829. <https://doi.org/10.2174/0929867033457719>
43. Kerbouche, L., Hazzit, M., Ferhat, M.-A., Baaliouamer, A., Miguel, M.G., 2015. Biological Activities of Essential Oils and Ethanol Extracts of *Teucrium polium* subsp. *capitatum* (L.) Briq. and *Origanum floribundum* Munby. Journal of Essential Oil Bearing Plants 18, 1197–1208. <https://doi.org/10.1080/0972060X.2014.935065>
44. Khosravi, A.R., Shokri, H., Kermani, S., Dakhili, M., Madani, M., Parsa, S., 2011. Antifungal properties of *Artemisia sieberi* and *Origanum vulgare* essential oils

- against *Candida glabrata* isolates obtained from patients with vulvovaginal candidiasis. *Journal de Mycologie Médicale* 21, 93–99. <https://doi.org/10.1016/j.mycmed.2011.01.006>
45. Khosravi, A.R., Shokri, H., Ziglari, T., Naeini, A.R., Mousavi, Z., Hashemi, H., 2008. Outbreak of severe disseminated aspergillosis in a flock of ostrich (*Struthio camelus*). *Mycoses* 51, 557–559. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0507.2008.01504.x>
  46. Knudtson, W.U., Kirkbride, C.A., 1992. Fungi Associated with Bovine Abortion in the Northern Plains States (USA). *J VET Diagn Invest* 4, 181–185. <https://doi.org/10.1177/104063879200400211>
  47. Ksouri, S., Djebir, S., Bentorki, A.A., Gouri, A., Hadeif, Y., Benakhla, A., 2017. Antifungal activity of essential oils extract from *Origanum floribundum* Munby, *Rosmarinus officinalis* L. and *Thymus ciliatus* Desf. against *Candida albicans* isolated from bovine clinical mastitis. *Journal de Mycologie Médicale* 27, 245–249. <https://doi.org/10.1016/j.mycmed.2017.03.004>
  48. Laghchimi, A., Znini, M., Majidi, L., Renucci, F., Harrak, A.E., Costa, J., 2014. Composition chimique et effet des phases liquide et vapeur de l'huile essentielle de *Lavandula multifida* sur la croissance mycélienne des moisissures responsables de la pourriture de la pomme (Chemical composition and effect of liquid and vapor phase of *Lavandula multifida* essential oil on mycelial growth of fungi responsible for the rot of apple) 12.
  49. Lambert, R.J.W., Skandamis, P.N., Coote, P.J., Nychas, G.-J.E., 2001. A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. *J Appl Microbiol* 91, 453–462. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2001.01428.x>
  50. Landry, K.G., Ascension, N.M., François-Xavier, E., 2021. microatmospher and microdilution methods to evaluate antifungal activity of six essential oils on *Aspergillus niger* and *Penicillium sp* isolated from the university of Yaounde I library 8, 8.
  51. Latgé, J.-P., 1999. *Aspergillus fumigatus* and Aspergillosis. *clin. microbiol. rev.* 12, 41.
  52. Latgé, J.-P., Chamilos, G., 2019. *Aspergillus fumigatus* and Aspergillosis in 2019. *Clin Microbiol Reviews* 33, e00140-18, /cmr/33/1/CMR.00140-18.atom. <https://doi.org/10.1128/CMR.00140-18>
  53. Lincoln, D.E., Langenheim, J.H., 1978. Effect of light and temperature on monoterpenoid yield and composition in *Satureja douglasii*. *Biochemical Systematics and Ecology* 6, 21–32. [https://doi.org/10.1016/0305-1978\(78\)90021-2](https://doi.org/10.1016/0305-1978(78)90021-2)
  54. Maschmeyer, G., Haas, A., Cornely, O.A., 2007. Invasive Aspergillosis: Epidemiology, Diagnosis and Management in Immunocompromised Patients. *Drugs* 67, 1567–1601. <https://doi.org/10.2165/00003495-200767110-00004>
  55. Mehdizadeh, L., Moghaddam, M., 2018. Essential Oils: Biological Activity and Therapeutic Potential, in: *Therapeutic, Probiotic, and Unconventional Foods*. Elsevier, pp. 167–179. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814625-5.00010-8>
  56. Meis, J.F., Chowdhary, A., Rhodes, J.L., Fisher, M.C., Verweij, P.E., 2016. Clinical implications of globally emerging azole resistance in *Aspergillus fumigatus*. *Phil. Trans. R. Soc. B* 371, 20150460. <https://doi.org/10.1098/rstb.2015.0460>
  57. Miguel, M.G., 2010. Antioxidant and Anti-Inflammatory Activities of Essential Oils: A Short Review. *Molecules* 15, 9252–9287. <https://doi.org/10.3390/molecules15129252>
  58. Millet, F., 2010. Les formes galéniques et les huiles essentielles. *Phytothérapie* 8, 33–36. <https://doi.org/10.1007/s10298-009-0523-3>

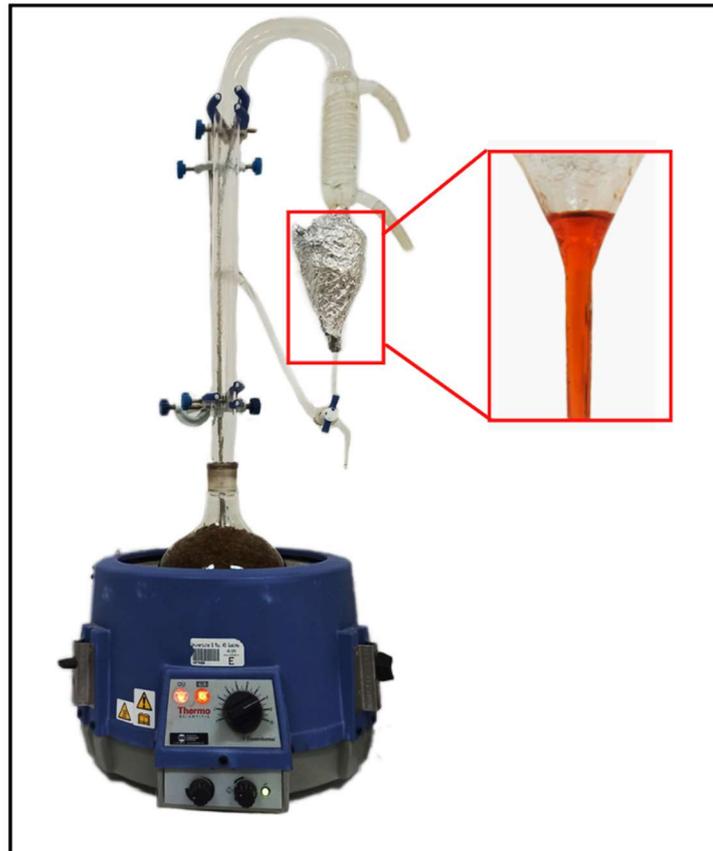
59. Mith, H., Duré, R., Delcenserie, V., Zhiri, A., Daube, G., Clinquart, A., 2014. Antimicrobial activities of commercial essential oils and their components against food-borne pathogens and food spoilage bacteria. *Food Sci Nutr* 2, 403–416. <https://doi.org/10.1002/fsn3.116>
60. Nabti, Z.L., Sahli, F., Laouar, H., Olowo-okere, A., Nkuimi Wandjou, J.G., Maggi, F., 2020. Chemical Composition and Antibacterial Activity of Essential Oils from the Algerian Endemic *Origanum glandulosum* Desf. against Multidrug-Resistant Uropathogenic *E. coli* Isolates. *Antibiotics* 9, 29. <https://doi.org/10.3390/antibiotics9010029>
61. Novák, I., Sipos, L., Kókai, Z., Szabó, K., Pluhár, Zs., Sárosi, Sz., 2011. Effect of the drying method on the composition of *Origanum vulgare* L. subsp. *hirtum* essential oil analysed by GC-MS and sensory profile method. *Acta Alimentaria* 40, 130–138. <https://doi.org/10.1556/AAlim.40.2011.Suppl.13>
62. Pandey, A.K., Singh, P., Tripathi, N.N., 2014. Chemistry and bioactivities of essential oils of some *Ocimum* species: an overview. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine* 4, 682–694. <https://doi.org/10.12980/APJTB.4.2014C77>
63. Patterson, T.F., Thompson, G.R., Denning, D.W., Fishman, J.A., Hadley, S., Herbrecht, R., Kontoyiannis, D.P., Marr, K.A., Morrison, V.A., Nguyen, M.H., Segal, B.H., Steinbach, W.J., Stevens, D.A., Walsh, T.J., Wingard, J.R., Young, J.-A.H., Bennett, J.E., 2016. Practice Guidelines for the Diagnosis and Management of Aspergillosis: 2016 Update by the Infectious Diseases Society of America. *Clinical Infectious Diseases* 63, e1–e60. <https://doi.org/10.1093/cid/ciw326>
64. Phalen, D.N., 2000. Respiratory Medicine of Cage and Aviary Birds. *Veterinary Clinics of North America: Exotic Animal Practice* 3, 423–452. [https://doi.org/10.1016/S1094-9194\(17\)30080-4](https://doi.org/10.1016/S1094-9194(17)30080-4)
65. Putievsky, E., Ravid, U., Dudai, N., 1988. Phenological and seasonal influences on essential oil of a cultivated clone of *Origanum vulgare* L. *J. Sci. Food Agric.* 43, 225–228. <https://doi.org/10.1002/jsfa.2740430304>
66. Ravid, U., Putievsky, E., 1984. The influence of harvest dates and leaf location on the essential oil content and major components of *Pelargonium graveolens* L. *Acta Hort.* 159–166. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.1984.144.20>
67. Reboux, G., Piarroux, R., Mauny, F., Madroszyk, A., Millon, L., Bardouet, K., Dalphin, J.-C., 2001. Role of Molds in Farmer's Lung Disease in Eastern France. *Am J Respir Crit Care Med* 163, 1534–1539. <https://doi.org/10.1164/ajrccm.163.7.2006077>
68. Regnard, J.-F., Icard, P., Nicolosi, M., Spaggiari, L., Magdeleinat, P., Jauffret, B., Levasseur, P., 2000. Aspergilloma: a series of 89 surgical cases. *The Annals of Thoracic Surgery* 69, 898–903. [https://doi.org/10.1016/S0003-4975\(99\)01334-X](https://doi.org/10.1016/S0003-4975(99)01334-X)
69. Rinaldi, M.G., 1983. Invasive Aspergillosis. *Clinical Infectious Diseases* 5, 1061–1077. <https://doi.org/10.1093/clinids/5.6.1061>
70. Rogers, T.R., 1995. Epidemiology and control of nosocomial fungal infections: Current Opinion in Infectious Diseases 8, 287–290. <https://doi.org/10.1097/00001432-199508000-00014>
71. Russo, M., Suraci, F., Postorino, S., Serra, D., Roccotelli, A., Agosteo, G.E., 2013. Essential oil chemical composition and antifungal effects on *Sclerotium cepivorum* of *Thymus capitatus* wild populations from Calabria, southern Italy. *Revista Brasileira de Farmacognosia* 23, 239–248. <https://doi.org/10.1590/S0102-695X2013005000017>
72. Salah, K.B.H., Chaumont, J.-P., Harzallah-Skhiri, F., Chraief, I., Michel, L., Millet-Clerc, J., Aouni, M., 2006. Activités inhibitrices *in vitro* d'huiles essentielles de

- Coridothymus capitatus* (L.) Rechb. f. vis-à-vis de germes représentatifs de microflores cutanées. *Acta Botanica Gallica* 153, 365–373. <https://doi.org/10.1080/12538078.2006.10515554>
73. Salgueiro, L.R., Pinto, E., Gonçalves, M.J., Pina-Vaz, C., Cavaleiro, C., Rodrigues, A.G., Palmeira, A., Tavares, C., Costa-de-Oliveira, S., Martinez-de-Oliveira, J., 2004. Chemical Composition and Antifungal Activity of the Essential Oil of *Thymbra capitata*. *Planta med* 70, 572–575. <https://doi.org/10.1055/s-2004-827162>
  74. Schroder, T., Gaskin, S., Ross, K., Whiley, H., 2017. Antifungal activity of essential oils against fungi isolated from air. *International Journal of Occupational and Environmental Health* 23, 181–186. <https://doi.org/10.1080/10773525.2018.1447320>
  75. Selvakumar, P., naveena, B.E., prakash, S.D., 2012. Studies on the antidandruff activity of the essential oil of *Coleus amboinicus* and *Eucalyptus globulus*. *Asian Pacific Journal of Tropical Disease* 2, S715–S719. [https://doi.org/10.1016/S2222-1808\(12\)60250-3](https://doi.org/10.1016/S2222-1808(12)60250-3)
  76. Sharifzadeh, A., Jebeli Javan, A., Shokri, H., Abbaszadeh, S., Keykhosravy, K., 2016. Evaluation of antioxidant and antifungal properties of the traditional plants against foodborne fungal pathogens. *Journal de Mycologie Médicale* 26, e11–e17. <https://doi.org/10.1016/j.mycmed.2015.11.002>
  77. Shin, S., 2003. Anti-*Aspergillus* activities of plant essential oils and their combination effects with ketoconazole or amphotericin b. *Arch Pharm Res* 26, 389–393. <https://doi.org/10.1007/BF02976696>
  78. Soubani, A.O., Chandrasekar, P.H., 2002. The Clinical Spectrum of Pulmonary Aspergillosis. *Chest* 121, 1988–1999. <https://doi.org/10.1378/chest.121.6.1988>
  79. Suhr, K.I., Nielsen, P.V., 2003. Antifungal activity of essential oils evaluated by two different application techniques against rye bread spoilage fungi. *J Appl Microbiol* 94, 665–674. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2003.01896.x>
  80. Swamy, M.K., Akhtar, M.S., Sinniah, U.R., 2016. Antimicrobial Properties of Plant Essential Oils against Human Pathogens and Their Mode of Action: An Updated Review. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* 2016, 1–21. <https://doi.org/10.1155/2016/3012462>
  81. Tabti, L., Dib, M.E.A., Gaouar, N., Samira, B., Tabti, B., 2014. Antioxidant and Antifungal Activity of Extracts of the Aerial Parts of *Thymus capitatus* (L.) Hoffmanns Against Four Phytopathogenic Fungi of *Citrus sinensis*. *Jundishapur J Nat Pharm Prod* 9, 49–54. <https://doi.org/10.17795/jjnpp-13972>
  82. Tariq, S., Wani, S., Rasool, W., Shafi, K., Bhat, M.A., Prabhakar, A., Shalla, A.H., Rather, M.A., 2019. A comprehensive review of the antibacterial, antifungal and antiviral potential of essential oils and their chemical constituents against drug-resistant microbial pathogens. *Microbial Pathogenesis* 134, 103580. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2019.103580>
  83. Tell, L.A., 2005. Aspergillosis in mammals and birds: impact on veterinary medicine. *Med Mycol* 43, 71–73. <https://doi.org/10.1080/13693780400020089>
  84. Tullio, V., Nostro, A., Mandras, N., Dugo, P., Banche, G., Cannatelli, M.A., Cuffini, A.M., Alonzo, V., Carlone, N.A., 2007. Antifungal activity of essential oils against filamentous fungi determined by broth microdilution and vapour contact methods. *J Appl Microbiol* 102, 1544–1550. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2006.03191.x>
  85. Vale-Silva, L., Silva, M.-J., Oliveira, D., Gonçalves, M.-J., Cavaleiro, C., Salgueiro, L., Pinto, E., 2012. Correlation of the chemical composition of essential oils from *Origanum vulgare* subsp. *virens* with their in vitro activity against pathogenic yeasts

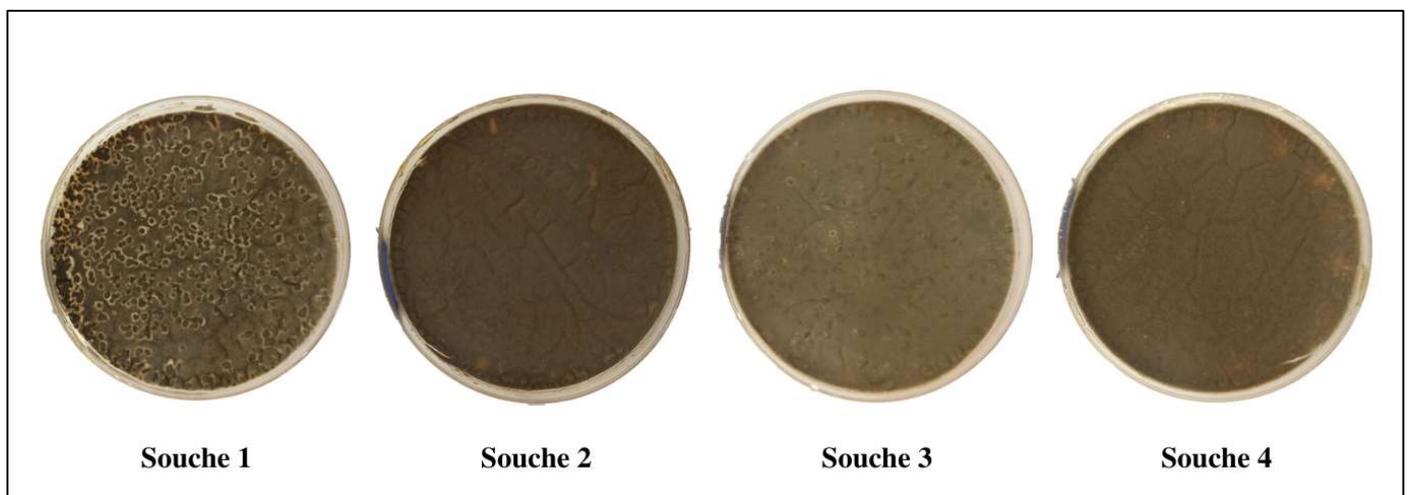
- and filamentous fungi. *Journal of Medical Microbiology* 61, 252–260. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.036988-0>
86. Van de Veerdonk, F.L., Gresnigt, M.S., Romani, L., Netea, M.G., Latgé, J.-P., 2017. *Aspergillus fumigatus* morphology and dynamic host interactions. *Nat Rev Microbiol* 15, 661–674. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2017.90>
87. Van der Linden, J.W.M., Arendrup, M.C., Warris, A., Lagrou, K., Pelloux, H., Hauser, P.M., Chryssanthou, E., Mellado, E., Kidd, S.E., Tortorano, A.M., Dannaoui, E., Gaustad, P., Baddley, J.W., Uekötter, A., Lass-Flörl, C., Klimko, N., Moore, C.B., Denning, D.W., Pasqualotto, A.C., Kibbler, C., Arikian-Akdagli, S., Andes, D., Meletiadis, J., Naumiuk, L., Nucci, M., Melchers, W.J.G., Verweij, P.E., 2015. Prospective Multicenter International Surveillance of Azole Resistance in *Aspergillus fumigatus*. *Emerg. Infect. Dis.* 21, 1041–1044. <https://doi.org/10.3201/eid2106.140717>
88. Verma, S., Singh, S., 2008. Current and future status of herbal medicines. *Vet. World* 2, 347. <https://doi.org/10.5455/vetworld.2008.347-350>
89. Vermeulen, E., Lagrou, K., Verweij, P.E., 2013. Azole resistance in *Aspergillus fumigatus*: a growing public health concern. *Current Opinion in Infectious Diseases* 26, 493–500. <https://doi.org/10.1097/QCO.0000000000000005>
90. Zaïri, A., Nouir, S., Zarrouk, A., Haddad, H., Khélifa, A., Achour, L., Tangy, F., Chaouachi, M., Trabelsi, M., 2019. Chemical composition, Fatty acids profile and Biological properties of *Thymus capitatus* (L.) Hoffmanns, essential Oil. *Sci Rep* 9, 20134. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-56580-y>

# ***ANNEXES***

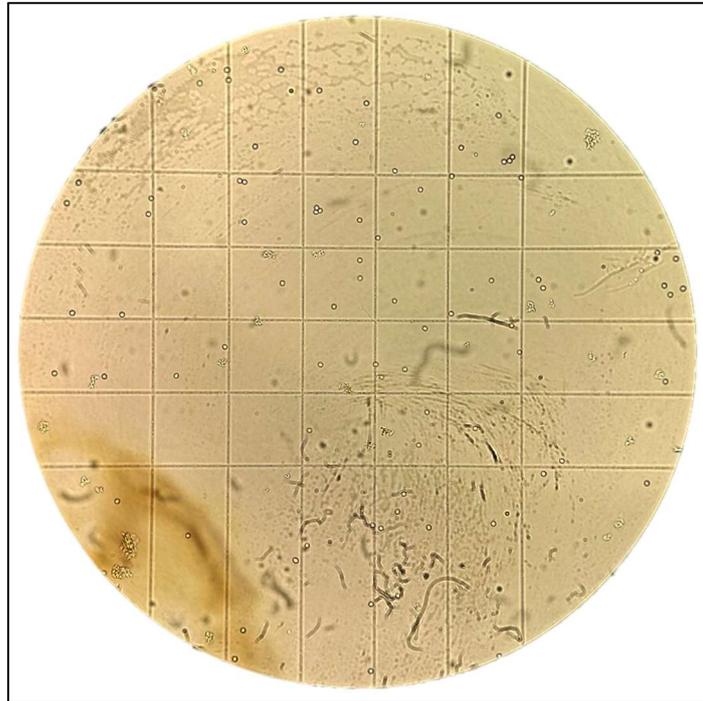
**Annexe 1 : L'obtention des extraits par l'appareil de  
Clevenger**



**Annexe 2 : Les quatre isolats cliniques d'*Aspergillus fumigatus*  
utilisées dans ce travail**



**Annexe 3 : Comptage des spores d'*Aspergillus fumigatus* à l'aide  
d'une cellule Malassez (objectif x40)**



**Annexe 4 : Quelques matériaux utilisés lors de notre travail**



**Des micropipettes de différentes capacités**



**Matériel de laboratoire**



**Quelques produits utilisés dans notre étude**



**Matériel nécessaire pour le comptage des spores**

### **Annexe 5 : Conditions d'incubation**





## المخلص

في هذه الدراسة، قمنا بتقييم النشاط المضاد للفطريات في المختبر للزيوت الأساسية " *Thymus capitatus* " و " *L. Origanum floribundum* Munby."، نباتان متوطنان عفويان في منطقة قالمة ضد أربع سلالات سريرية من *Aspergillus fumigatus*. في العمل الحالي، تم استخدام تقنيتين، طريقة M38-A أو اختبار microdilution en bouillon الموصوف بواسطة CLSI وطريقة microatmosphère. تم الحصول على الزيوت الأساسية بطريقة التقطير المائي في جهاز من نوع Clevenger من الأوراق والقمم المزهرة وقدمت محصولاً مهماً بنسبة 2.52% للأوريغانو و 1.89% للزعتر.. بالنسبة للنتائج التي تم الحصول عليها بطريقة microdilution، أظهر الزيت العطري للأوريغانو قيم CMI و CMF بين 0.749 و 8.386 ميكروغرام / مل. بالإضافة إلى ذلك، أظهر زيت الزعتر الأساسي قيم MIC و CMF تتراوح بين 0.899 و 2.097 ميكروغرام / مل. أظهر تقييم النشاط المضاد للفطريات في المرحلة المتطايرة لهذه الزيوت العطرية أن الزيوت العطرية من الزعتر والأوريغانو أكثر نشاطاً في طور البخار منها عند التلامس المباشر، مع قيم CMI (0.115 ميكروغرام / مل من الهواء للأوريغانو. ومن 0.029 إلى 0.115 ميكروغرام / مل من الهواء للزعتر) وقيم CMF (0.230 إلى 0.460 ميكروغرام / مل من الهواء للأوريغانو و 0.115 إلى 0.460 ميكروغرام / مل من الهواء للزعتر). هناك أدلة على أن زيت الزعتر الأساسي هو أكثر تثبيطاً للفطريات ومبيد للفطريات من زيت الأوريغانو الأساسي. على أساس هذه النتائج، فإن الزيتين الأساسيين اللذين تم اختبارهما لهما نشاط مضاد للفطريات جيداً ضد السلالات السريرية الأربعة من *Aspergillus fumigatus* ويمكن أن يقدم حلاً حقيقياً ضد داء الرشاشيات خاصة في شكل البخار ، لكن يتطلب دراسات دوائية وسمية إضافية.

**الكلمات المفتاحية:** داء الرشاشيات، الزيت العطري، العلاج بالروائح، M38-A.

## Abstract

In this study, we evaluated the in vitro antifungal activity of essential oils of "*Thymus capitatus* L." and "*Origanum floribundum* Munby", two spontaneous plants endemic to the Guelma region, against four clinical strains of *Aspergillus fumigatus*. In the present work, two techniques were used, the M38-A method or broth microdilution test described by CLSI and the microatmosphere method. The essential oils were obtained by the hydrodistillation method in a Clevenger type apparatus from the leaves and flowering tops, and provided a significant average yield of 2.52% for oregano and 1.89% for thyme. For the results obtained by the microdilution method, the essential oil of oregano presented MIC and MFC values between 0.749 and 8.386 µg/ml. In addition, thyme essential oil showed MIC and MFC values between 0.899 and 2.097 µg/ml. The evaluation of the antifungal activity of the volatile phase of these essential oils, showed that the essential oils of oregano and thyme are more active in the vapour phase than in direct contact, with MIC values (0.115 µg/ml of air for oregano and 0.029 to 0.115 µg/ml of air for thyme) and CMF values (0.230 to 0.460 µg/ml of air for oregano and 0.115 to 0.460 µg/ml of air for thyme). It is evident that thyme essential oil is more fungistatic and fungicidal than oregano essential oil. Based on these results, the two essential oils tested have a very good antifungal activity against the four clinical strains of *Aspergillus fumigatus* and could present a real solution against aspergillosis especially in the fumigant form, but requires further pharmacological and toxicological studies.

**Key words:** *Aspergillus fumigatus*, aspergillosis, essential oil, *Origanum floribundum*, *Thymus capitatus*, fumigant, M38-A.

## Résumé

Dans cette étude, nous avons évalué l'activité antifongique in vitro des huiles essentielles de « *Thymus capitatus* L. » et « *Origanum floribundum* Munby. », deux plantes spontanées et endémiques de la région de Guelma, vis-à-vis quatre souches cliniques d'*Aspergillus fumigatus*. Dans le présent travail, deux techniques ont été utilisées, la méthode M38-A ou le test de microdilution en bouillon décrit par CLSI et la méthode de microatmosphère. Les huiles essentielles ont été obtenues par la méthode d'hydrodistillation dans un appareil de type Clevenger des feuilles et des sommités fleurées, et ont fournies un rendement moyen non négligeable de 2.52 % pour l'origan et 1.89 % pour le thym. Pour les résultats obtenus par la méthode de microdilution, l'huile essentielle d'origan a présenté des valeurs CMI et CMF comprises entre 0.749 et 8.386 µg/ml. De plus, l'huile essentielle de thym a présenté des valeurs CMI et CMF comprises entre 0.899 et 2.097 µg/ml. L'évaluation de l'activité antifongique de la phase volatile de ces huiles essentielles, a montré que les huiles essentielles d'origan et de thym sont plus actives en phase vapeur qu'en contact direct, avec des valeurs de CMI (0.115 µg/ml d'air pour l'origan et de 0.029 à 0.115 µg/ml d'air pour le thym) et des valeurs de CMF (0.230 à 0.460 µg/ml d'air pour l'origan et 0.115 à 0.460 µg/ml d'air pour le thym). Il est évident que l'huile essentielle de thym est plus fongistatique et plus fongicide que l'huile essentielle d'origan. Sur la base de ces résultats, les deux huiles essentielles testées ont une très bonne activité antifongique contre les quatre souches cliniques d'*Aspergillus fumigatus* et pourraient présenter une réelle solution contre l'aspergillose surtout sous la forme fumigène, mais nécessite des études pharmacologiques et toxicologiques supplémentaires.

**Mots clés :** *Aspergillus fumigatus*, aspergillose, huile essentielle, *Origanum floribundum*, *Thymus capitatus*, fumigant, M38-A.