

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
République Algérienne Démocratique et Populaire
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
جامعة 8 ماي 1945 قالمة
Université 8 Mai 1945 Guelma
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Sciences de la Terre et de l'Univers



Mémoire En Vue de l'Obtention du Diplôme de Master

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie
Filière : Sciences Agronomiques
Spécialité /Option : Phytopathologie et Phytopharmacie
Département : Ecologie et Génie de l'Environnement

Etude de l'activité antifongique de quelques huiles essentielles sur des champignons phytopathogènes

Présenté par : - Hadjadji Assia
- Chemlel Maroua

Président : Mme khenaka K	(MAA)	Université de Guelma
Examineur : Mr Benaada M	(MAA)	Université de Guelma
Encadreur : Mme Alloui N.	(MCB)	Université de Guelma
Co-promoteur : Mme ksouri Djebir S	(MAA)	Université de Guelma

Juin 2018

REMERCIEMENTS

Avant tout nous remercions Dieu "Allah" tout puissant qui nous a donné la force, le courage, la volonté, la patience et les moyens afin de pouvoir accomplir ce travail

*Nous tenons à remercier vivement notre promoteur Madame **Allioui N.** la proposition du thème et pour le suivi de ce travail, pour ses conseils durant la période de la réalisation de ce travail. Nous sommes très honorées par son accompagnement et son aide. Nous lui exprimons notre gratitude pour nous avoir donné l'occasion de bénéficier de son immense expérience et ses fructueux conseils, tout au long de la réalisation de ce mémoire.*

*Nos remerciements s'adressent également à notre co-promoteur, **Mr. Ksouri S.**, pour son aide très précieuse dans la réalisation de ce travail, pour sa gentillesse, ses précieux conseils, et sa présence permanente à nos côtés durant toute la réalisation de notre travail, qu'il trouve dans ces pages, l'expression de notre grand respect et notre gratitude.*

*Nos remerciements s'adressent à Madame **Khenakha K.** Pour avoir accepté de présider le jury et juger notre travail et à Monsieur **Benada M.** qui nous fait l'honneur de faire partie du jury, et pour avoir accepté d'examiner notre travail.*

*Nous remercions également monsieur **Boudjahem W. H.** étudiant en master I Phytopharmacie et protection des végétaux, pour la fourniture des fongicides.*

*Nos remerciements vont également à l'ensemble du personnel technique des laboratoires de notre faculté, dans lesquels ce travail a été réalisé pour la sympathie qu'ils nous ont accordé durant toute notre période de réalisation du travail, et plus particulièrement Mme **Louiza** .*

Un grand merci pour nos amis, Aicha, Amina, Assia, pour leurs encouragements.

Enfin, une profonde reconnaissance à tous ceux qui ont participé de près ou de loin à la réalisation de ce travail et qui ne sont pas cités ici, nous les remercions tous, très chaleureusement.

Sommaire

<i>Titre</i>	<i>Page</i>
Liste des abréviations.....	<i>i</i>
Liste des tableaux.....	<i>ii</i>
Liste des figures.....	<i>iii</i>
Introduction	1
Chapitre 01 : Revue Bibliographique sur les huiles essentielles	
1.1. Définition des huiles essentielles.....	3
1.2. Origine et localisation des huiles essentielles.....	3
1.3. Synthèse et formation des huiles essentielles au niveau des plantes.....	4
1.4. Propriétés physiques des huiles essentielles.....	4
1.5. Composition chimiques des huiles essentielles.....	5
1.5.1. Les terpènes	6
1.5.2. Les composants aromatiques (Les phénylpropanes).....	7
1.6. Facteurs de variabilité de la composition des huiles essentielles.....	8
1.6.1 Les facteurs intrinsèques.....	8
1.6.2 Les facteurs extrinsèque.....	9
1.7. Les techniques d'extractions des huiles essentielles	9
1.7.1. La distillation.....	9
1.7.1.1. Extraction par Hydrodistillation.....	10
1.7.1.2. L'entraînement à la vapeur d'eau	10
1.7.1.3. Hydrodiffusion ou percolation	11
1.8. Propriétés biologiques des huiles essentielles	11
1.8.1. Activité antifongique	12
1.8.2. Activité antibactérienne.....	12
1.8.3. Activité antivirale	12
1.8.4. Activité antiseptique.....	12
1.8.5. Activité intioxydante	13

1.8.6. Activité insecticide.....	13
1.9. Domaines d'application des huiles essentielles	13
1.9.1. En agriculture	13
1.9.2. En cosmétologie.....	13
1.9.3. En agroalimentaire.....	13
1.9.4. En médecine et pharmacie.....	14
1.10. Conservation des huiles essentielles	14
1.11. Exemples de quelques huiles essentielles, leurs origines et leurs propriétés	14
Chapitre 02 : Matériel et méthodes	
2.1. Objectif de l'étude	17
2.2. Matériel végétal.....	17
2.2.1. Présentation des espèces végétales utilisées.....	17
2.2.2. Origine des espèces végétales utilisées	18
2.2.3. Situation géographique et caractéristiques pédoclimatiques des zones de collecte du matériel végétal.....	19
2.2.4. Traitement des échantillons.....	19
2.2.5. Extraction des huiles essentielles	19
2.2.6. Détermination du rendement en huiles essentielles.....	21
2.2.7 Analyse de la composition des huiles essentielles des plantes utilisées	21
2.3. Matériel fongique utilisé.....	22
2.3.1. Présentation des espèces fongiques utilisées.....	22
2.3.2. Origine des souches	22
2.3.3. Culture et conservation des souches	23
2.4. Evaluation de l'activité antifongique des huiles essentielles testées.....	23
2.4.1. Activité des huiles testées sur la croissance mycélienne des souches fongiques étudiées	23
2.4.1.1. Verrerie, réactifs, instruments et matériel utilisé.....	23
2.4.1.2. Techniques de confrontation et concentrations des huiles essentielles utilisées.....	24
2.4.2. Activité des huiles testées sur la germination des spores et la longueur des tubes germinatifs, des souches fongiques étudiées.....	27
2.4.3. Etude de la nature de la fongitoxicité des huiles essentielles testées à l'égard des souches fongiques étudiées.....	27
2.4.4. Tests relatifs aux témoins positifs.....	29
2.4.4.1. Fongicides utilisés.....	29

2.4.4.2. Tests réalisés.....	29
Chapitre 03 : Résultats et discussions	
3.1. Rendement en huiles essentielles des plantes utilisées.....	32
3.2. Composition chimique des huiles essentielles testées.....	33
3.3. Evaluation de l'activité antifongique des huiles essentielles testées.....	37
3.3.1 Activité des huiles testées sur la croissance mycélienne des souches fongiques étudiées.....	37
3.3.1.1. Résultats obtenus pour la technique de contact direct à travers des puits.....	37
3.3.1.2. Résultats obtenus pour la technique de micro-atmosphère 01 (Fumigation 01)....	43
3.3.1.3. Résultats obtenus pour la technique de micro-atmosphère 02 (Fumigation 02)....	49
3.3.2. Activité des huiles testées sur la germination des spores et la longueur des tubes germinatifs, des souches fongiques étudiées.....	50
3.4. Etude de la nature de la fongitoxicité des huiles essentielles testées à l'égard des souches fongiques étudiées.....	51
Conclusion.....	53
Résumés	
Références bibliographique	
Annexe	

Liste des abréviations

CPG : Chromatographie en phase gazeux

CCM: Chromatographie sur couche mince

CMI : Concentration minimale inhibitrice

CMF: Concentration minimale fongicide

FAO : Organisation mondiale de l'Alimentation et de l'agriculture

HE : Huile Essentielle

PDA : Potato dextrose agar

Rdt : Rendement

μL : Microlitre.

μg : Microgramme.

Liste des tableaux

N°	Titre	Pages
01	Exemples de quelques huiles essentielles, leurs origines et leurs propriétés	15
02	Origine des espèces végétales utilisées	18
03	Caractéristiques des fongicides utilisés pour les tests de témoins positifs	29
04	Concentrations en matière (s) active (s) utilisées pour le test de témoin positif dans les boîtes de Pétri	30
05	Concentrations en matière active utilisées pour le test de témoin positif dans les microplaques pour le Fosétyl-Aluminium	30
06	Concentrations en matières actives utilisées pour le test de témoin positif dans les microplaques pour le Tubéconazole + Prothioconazole	30
07	Composition des huiles essentielles extraites des parties aériennes des différentes espèces végétales étudiées	34
08	CMI de <i>Zymoseptoria tritici</i> , confronté aux différentes huiles testées	44
09	CMI de <i>Fusarium roseum</i> , confronté aux différentes huiles testées	46
10	CMI de <i>Botrytis cinerea</i> , confronté aux différentes huiles testées	48
11	CMI de <i>Botrytis cinerea</i> , confronté à l'huile de romarin	50
12	Concentrations minimales inhibitrices (CMI) et concentrations minimales fongicides (létales) (CMF) des HEs testées, et des fongicides, à l'égard des champignons étudiés	52

Liste des figures

N°	Titre	Pages
01	Structure chimique de quelques monoterpènes extraits des huiles essentielles	07
02	Structure chimique de quelques composés aromatiques des huiles essentielles	08
03	Appareillage utilisé pour l'hydrodistillation de l'huile	10
04	Dispositif de l'extraction de l'huile essentielle par entraînement à la vapeur d'eau	11
05	Aspect botanique du romarin (<i>Rosmarinus officinalis</i>)	17
06	Aspect botanique de l'Origan (<i>Origanum floribundum Munby</i>)	17
07	Aspect botanique de l'Eucalyptus (<i>Eucalyptus camaldulensis</i>)	18
08	Photographie du montage de type <i>Clevenger</i> utilisé pour l'extraction des huiles essentielles (Photo personnelle)	20
09	Microplaques utilisées pour la technique de micro-dilution	28
10	Rendement en huiles essentielles des plantes utilisées	32
11	Résultats du test de confrontation par contact direct des puits de <i>Botrytis cinerea</i> x Huiles essentielles testées	38
12	Résultats du test de confrontation par contact direct à travers des puits de <i>Zymoseptoria tritici</i> x Huiles essentielles testées	40
13	Résultats du test de confrontation par contact direct des puits de <i>Fusarium roseum</i> x Huile essentielles testées	41
14	Résultats du test de confrontation par la méthode de fumigation 01 de <i>Zymoseptoria tritici</i> x Huiles essentielles testées	43
15	Résultats du test de confrontation par la méthode de fumigation 01 de <i>Fusarium roseum</i> x Huiles essentielles testées	45
16	Résultats du test de confrontation par la méthode de fumigation 01 de <i>Botrytis cinerea</i> x Huiles essentielles testées (Diamètre Interne)	47
17	Résultats du test de confrontation par la méthode de fumigation 01 de <i>Botrytis cinerea</i> x Huiles essentielles testées (Diamètre Externe)	48
18	Résultats du test de confrontation par la méthode de fumigation 02 de <i>Botrytis cinerea</i> x Huile essentielle de romarin	49
19	Résultats du test de l'activité des huiles essentielles sur la germination des spores de <i>Botrytis cinerea</i>	50

Introduction

Les maladies des plantes constituent un véritable fléau pour les cultures, et les dégâts engendrés par les maladies et les ravageurs deviennent de plus en plus graves du fait de l'extension des cultures intensives. Selon la FAO (1999), les maladies parasitaires réduisent de 12 à 14% la production agricole mondiale, et 70% des dommages sont d'origine fongique. Ces maladies sont probablement la plus grande contrainte qui entrave la production et le rendement globale des récoltes, et représentent, l'un des facteurs majeurs qui limite et altère leur qualité (Morcia *et al.*, 2015).

Les champignons affectent diverses cultures, certains sont polyphages (*Botrytis cinerea*), d'autres ont un spectre d'hôtes plus ou moins limité (*Zymoseptoria tritici* et *Fusarium roseum*). *Zymoseptoria tritici*, est l'agent causal de la tache septorienne des feuilles chez le blé, l'une des maladies les plus répandues et les plus dévastatrices sur le blé. Les pertes occasionnées peuvent dépasser 40 % (Allioui, 2015). *Botrytis cinerea*, est responsable de pourritures sur un grand nombre de plantes hôtes d'importance économique en agriculture et en horticulture (Viret *et al.*, 2010 ; Walker, 2013) ; les dégâts occasionnés par ce champignon sont considérables et les pertes peuvent atteindre 20% des récoltes mondiales des cultures (Alem-Etsouri *et al.*, 2016). *Fusarium roseum*, responsable de la fusariose du blé, peut engendrer des dégâts allant de 30 à 70 % de pertes (Syngenta, 2018).

La lutte contre les champignons phytopathogènes, repose plus particulièrement sur l'utilisation des produits chimiques. Cependant, beaucoup d'effets non intentionnels ont été associés à l'emploi intensif et non raisonné de ces produits, suite à une contamination de la biosphère ou même de la chaîne alimentaire. Pour résoudre ce problème, une recherche sérieuse est nécessaire pour identifier des méthodes alternatives pour la protection des végétaux, qui sont moins dépendantes des produits chimiques et plus respectueuses à l'environnement (Prapagdee *et al.*, 2008).

La lutte biologique par l'utilisation de substances naturelles antifongiques peut constituer une alternative aux produits chimiques. Parmi ces substances naturelles figurent les huiles essentielles extraites des plantes aromatiques. L'Algérie, par sa situation géographique, offre une végétation riche et diverse. Un grand nombre de plantes aromatiques y pousse spontanément (Laib, 2013).

Notre étude est une contribution à la recherche de molécules biologiques actives, à pouvoir inhibiteur élevé à l'égard de microorganismes phytopathogènes ; et dans le but de valoriser notre patrimoine national de plantes aromatiques, notre travail a porté sur trois espèces végétales locales collectées dans leur habitat naturel : *Rosmarinus officinalis*, *Eucalyptus camaldulensis* et *origanum floribundum*, et vise à tester l'activité antifongique de leurs huiles essentielles à l'égard de trois champignons phytopathogènes : *Zymoseptoria tritici*, *Botrytis cinerea* et *Fusarium roseum*.

Le document est structuré en trois chapitres ; un premier chapitre qui donne des généralités sur les huiles essentielles. Le deuxième explique le matériel et les méthodes utilisées, le dernier chapitre expose les résultats obtenus et discutés, et enfin une conclusion.

Chapitre 01 :
Revue bibliographique sur
les huiles essentielles

Chapitre 01 : Revue bibliographique sur les huiles essentielles

1.1. Définition des huiles essentielles

Les huiles essentielles sont des substances odoriférantes volatiles complexes fabriquées par les plantes (Ben Soultane et Bahri, 2017). Une huile essentielle est en général un mélange de substances naturelles volatiles obtenues par codistillation avec la vapeur d'eau à partir de la biomasse végétale (Metali et Kerras, 2016).

Selon Bouamer *et al.* (2004), le terme «huile» provient du fait que les substances volatiles contenus dans le végétal sont visqueux et hydrophobes, elles ont des propriétés de solubiliser dans les huiles végétales et minérales, les graisses, les alcools et l'éther. La dénomination «essentiels» reflète le caractère principal des plantes qui dégagent des odeurs.

Chiasson *et al.* (2007), signalent que, les huiles essentielles sont des métabolites secondaires, produits par les plantes comme moyen de défense contre les ravageurs phytophages. Ces extraits contiennent en moyenne 20 à 60 composés qui sont pour la plupart des molécules peu complexes.

1.2. Origine et localisation des huiles essentielles

Aouis (2015), rapporte que, les huiles essentielles ou essences végétales sont largement distribuées dans le règne végétal, et n'existent que chez les végétaux supérieurs. En effet elles se trouvent en quantité appréciable chez environ 2000 espèces réparties en 60 familles botaniques comme par exemple chez les Lamiacées (lavande, basilic, menthe, ...), les Myrtacées (eucalyptus, ...), les Lauracées (cannelle et sassafras....) et les Apiacées (fenouil, cumin, coriandre, persil,...).

Les huiles essentielles sont des sécrétions naturelles élaborées par le végétal et contenues dans les cellules de la plante, soit dans les fleurs (rosier), dans les sommités fleuries (lavande), dans les feuilles (citronnelle, eucalyptus), dans l'écorce (cannelier), dans les racines, dans les fruits, les graines (muscade) ou encore autre part dans la plante (El Laib, 2011).

Le même auteur ajoute que, les huiles essentielles sont produites dans des cellules glandulaires spécialisées recouvertes d'une cuticule. Elles sont stockées dans des cellules à huiles essentielles (Lauraceae ou Zingiberaceae), dans des poils sécréteurs (Lamiaceae), dans des poches sécrétrices (Myrtaceae ou Rutaceae) ou dans des canaux sécréteurs (Apiaceae ou Asteraceae). Elles peuvent aussi être transportées

dans l'espace intracellulaire lorsque les poches à essences sont localisées dans les tissus internes. Sur le site de stockage, les gouttelettes d'huile essentielle sont entourées de membranes spéciales constituées d'esters d'acides gras hydroxylés hautement polymérisés, associés à des groupements peroxydes. En raison de leur caractère lipophile et donc de leur perméabilité extrêmement réduite vis-à-vis des gaz, ces membranes limitent fortement l'évaporation des huiles essentielles ainsi que leur oxydation à l'air.

1.3. Synthèse et formation des huiles essentielles au niveau des plantes

Sous l'influence du rayonnement solaire, les plantes synthétisent au sein de cellules très spécifiques des composés aromatiques : les huiles essentielles. Ces substances se forment de trois façons (Metali et Kerras, 2016) :

- *La première formation est dite "en surface glandulaire épidermique"* : Les essences sont formées au niveau de la périphérie de la plante par des glandes spécialisées : les poils sécréteurs fabriquant les essences. Les essences formées sont stockées dans des poches à essence (cas de la Lavande vraie, la Sauge officinale, la Verveine citronnée...).

- *La deuxième formation est dite "schizogène"* : C'est à dire qu'elle se fait dans l'épaisseur de la plante : au niveau de la feuille. On la retrouve notamment dans le Millepertuis, le Géranium, L'eucalyptus, ...

- *La troisième formation est dite "par canaux" ou "schizolysigène"* : Elle se produit en profondeur de la plante : Cette formation est dominante dans le bois des arbres (Bois de Rose, de Pin, de Santal).

1.4. Propriétés physiques des huiles essentielles

Les huiles essentielles se différencient des huiles grasses, par leurs propriétés physiques et leur composition, et elles se caractérisent par leurs propriétés organoleptiques (odeur, couleur et goût). Elles possèdent en commun un certain nombre de propriétés physiques (Bekhechi *et al.*, 2010 ; Aouis, 2015) :

- Elles sont peu solubles dans l'eau et solubles dans les solvants organiques tels que, l'alcool, l'éther, le chloroforme, les émulsifiants, ...
- Leur point d'ébullition varie de 160° à 240° C.
- Leur densité est en général inférieur à celle de l'eau, elle varie de 0.75 à 0.99 (les huiles essentielles de girofle ou de cannelle constituent des exceptions).
- Elles ont un indice de réfraction élevé.
- Elles sont rarement inactives sur la lumière polarisée.
- Elles dissolvent les graisses, l'iode, le soufre, le phosphore, et réduisent certains sels.
- Ce sont des parfums, et sont de conservation limitée.
- Sont très altérables et sensibles à l'oxydation (mais ne rancissent pas).
- Ce sont des substances de consistance huileuse, plus ou moins fluides, très odorantes et volatiles.
- A la température ambiante elles sont généralement liquides, incolores ou jaune pâle, sauf quelques exceptions, comme les huiles essentielles de la cannelle (orange), de l'absinthe (vert), et de la camomille (bleu).

1.5. Composition chimiques des huiles essentielles

Les huiles essentielles sont des mélanges naturels très complexes, caractérisées par deux ou trois majeurs composants à des concentrations assez élevées (20 -70%) par rapport aux autres composants présents sous forme de traces (Hamdani, 2016).

Laïb (2011) rapporte que, les huiles essentielles sont des mélanges complexes et variables de constituants qui appartiennent, de façon quasi exclusive, à deux groupes :

- le groupe de terpénoïdes .
- le groupe des composés aromatiques dérivés du phénylpropane.

La structure des composés des huiles essentielles est constituée d'un squelette hydrocarboné, constituant une chaîne plus ou moins longue. Sur ce squelette de base est souvent présent un ou plusieurs sites fonctionnels semblables ou différents. La

majorité des sites fonctionnels sont des sites oxygénés avec un ou plusieurs atomes d'oxygène, pour quelques groupes fonctionnels azotés ou soufrés. Cette structure varie en fonction de plusieurs critères (EL Laib, 2011) :

- ❖ Du nombre d'atomes de carbone qui les constituent :
 - Les monoterpènes
 - Les sesquiterpènes
 - Rarement les diterpènes.
- ❖ Du caractère saturé ou insaturé des liaisons
- ❖ De leur agencement : linéaire ou cyclique
- ❖ De la configuration spatiale (forme de chaise, de bateau, de trièdre...)
- ❖ De la nature des groupes fonctionnels à savoir :
 - Terpènes : $R_1-HC=CH-R_2$;
 - Alcools terpéniques : $R-OH$;
 - Cétones : R_1-CO-R_2 ;
 - Phénols : C_6H_6-OH ;
 - Aldéhydes : $R-CHO$;
 - Esters : $R_1-COO-R_2$;
 - Ethers : R_1-O-R_2 .

1.5.1. Les terpènes :

Selon Bottin (2006) cité par Benabdelkrim (2013), les terpènes sont classés selon le nombre des unités d'isoprène. Hamdani (2016) , rapporte que, les principaux terpènes sont les hemiterpènes (C5), les monoterpènes (C10), les sesquiterpènes (C15), les diterpènes (C20), les triterpènes (C30) et les tétraterpènes (C40), les plus importants sont :

- **Les monoterpènes** : ils sont les plus simples constituants des terpènes dont la majorité est rencontrée dans les huiles essentielles (90%). Ils comportent deux unités isoprène (C_5H_8), selon le mode de couplage « tête-queue », ils peuvent être acycliques, monocycliques ou bicycliques (Fig. 01). A ces terpènes se rattachent un certain nombre de produits naturels à fonctions chimiques spéciales (El Haib, 2011).

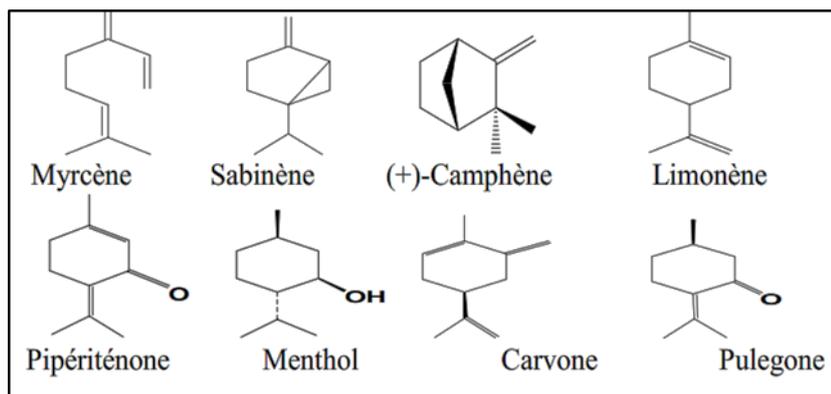


Figure 01 : Structure chimique de quelques monoterpènes extraits des huiles essentielles (Modzelewska *et al.*, 2005 ; Kaloustian *et al.*, 2012)

- **Les sesquiterpènes** : il s'agit de la classe la plus diversifiée des terpènes. Elle contient plus de 3000 molécules comme par exemple : β -caryophyllène, β -bisabolène, α -humulène, α -bisabolol, farnesol (Bruneton (1999) cité par Labiod et Aouadi, (2016).

1.5.2. Les composants aromatiques (Les phénylpropanes)

Les dérivés du phénylpropane (C_6-C_3) sont beaucoup moins fréquents que les terpènes. Ce sont très souvent des allyl- et propénylphénols, parfois des aldéhydes, caractéristiques de certaines huiles essentielles d'Apiaceae, mais aussi de celles du girofle, de la muscade, de l'estragon, du basilic,...etc. (eugénol, safrole, asarones, cinnamaldéhyde, etc.). On peut également rencontrer dans les huiles essentielles des composés en C_6-C_1 comme la vanilline (assez fréquente) ou comme l'antranilate de méthyle. Les lactones dérivées des acides cinnamiques (c'est-à-dire les coumarines) étant, au moins pour les plus simples d'entre elles, entraînaient par la vapeur d'eau, elles seront également présentes dans certaines huiles essentielles (Bruneton (2009). La figure 02 présente la structure de quelques composés aromatiques.

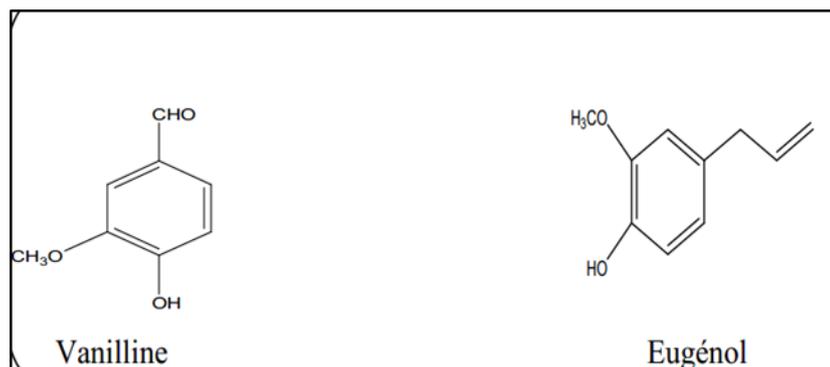


Figure 02 : Structure chimique de quelques composés aromatiques des huiles essentielles (Scimeca, 2007 ; Bruneton, 2009)

Plusieurs travaux ont montré que la composition chimique des huiles essentielles peut varier selon l'organe, les facteurs climatiques, la nature du sol, les pratiques culturales, et le mode d'extraction.

1.6. Facteurs de variabilité de la composition des huiles essentielles

Etant formées de mélanges généralement complexes, les huiles essentielles présentent une très grande variabilité, tant au niveau de leur composition, qu'au plan du rendement des plantes d'origine. Cette variabilité peut s'expliquer par différents facteurs, qui peuvent être regroupés en deux catégories (Laib, 2011) :

- Facteurs intrinsèques, liés à l'espèce, au type de clone, à l'organe concerné, à l'interaction avec l'environnement (type de sol ou climat, ...) et au degré de maturité du végétal concerné, voire au moment de la récolte au cours de la journée ;
- Facteurs extrinsèques, en lien avec ou la méthode d'extraction.

1.6.1. Les facteurs intrinsèques

Les cellules productrices d'huile essentielle pouvant se situer dans différents organes, il est possible d'obtenir différentes huiles selon les parties sélectionnées d'une même plante. Ainsi les huiles essentielles extraites à partir des baies et des feuilles de piment ne sont pas identiques. Des différences de composition des huiles essentielles en raison d'organes différents (feuilles et fleurs) et de sous-espèces différentes, ont été également observées. Le stade végétatif au moment de la récolte

est un facteur déterminant pour le rendement et la composition de l'huile essentielle des plantes de *Lavandula* obtenus par clonage (Laib, 2011).

Bouterfas *et al.* (2016) ont montré que la localité d'échantillonnage influe considérablement sur la composition et l'activité antifongique des flavonoïdes extraits des feuilles de *Marrubium vulgare* L. vis-à-vis de deux souches fongiques ; *Aspergillus niger* ATCC 16404 et *Candida albicans* ATCC 10231.

1.6.2. Les facteurs extrinsèques

Huang *et al.* (1995) et Lemberkovics *et al.* (2003) ont montré l'influence des méthodes d'extraction sur la composition des huiles essentielles. Le stockage des matières premières avant distillation peut également influencer la composition et le rendement des huiles essentielles. Fantino (1990) a noté des pertes considérables d'huile essentielle lors d'un stockage prolongé au congélateur, mais peu d'évolution de la composition. Par ailleurs le temps de stockage des huiles essentielles après extraction tend aussi à modifier la composition de ces huiles. Selon Carette (2000), les huiles essentielles se conservent entre 12 et 18 mois après leur obtention, car, avec le temps, leurs propriétés tendent à décroître.

1.7. Les techniques d'extractions des huiles essentielles

1.7.1. La distillation

La technique d'extraction des huiles essentielles utilisant l'entraînement des substances aromatiques grâce à la vapeur d'eau est la plus utilisée à l'heure actuelle. La méthode est basée sur l'existence d'un azéotrope de température d'ébullition inférieure aux points d'ébullition des deux composés, l'huile essentielle et l'eau, pris séparément. Ainsi, les composés volatils et l'eau distillent simultanément à une température inférieure à 100 °C sous pression atmosphérique normale. En conséquence, les produits aromatiques sont entraînés par sa vapeur d'eau sans subir d'altérations majeures (Marianne, 2008). Il existe précisément trois différents procédés utilisant ce principe : l'hydrodistillation, l'entraînement à la vapeur d'eau et l'hydrodiffusion :

1.7.1.1. Extraction par Hydrodistillation

Cette méthode consiste en une distillation classique réalisée avec un dispositif de *Clevenger* (Fig. 03), dans laquelle la matière végétale est plongée dans de l'eau, et l'ensemble est porté à ébullition. La vapeur d'eau chargée de substances volatiles se condense à l'intérieur d'un réfrigérant. Les essences, moins denses que l'eau, sont recueillies par simple décantation à la surface de celle-ci (Camara *et al.*, 2010). Cette méthode est généralement utilisée en cas des huiles essentielles dont les constituants chimiques sont thermorésistants (Nedjai, 2017).

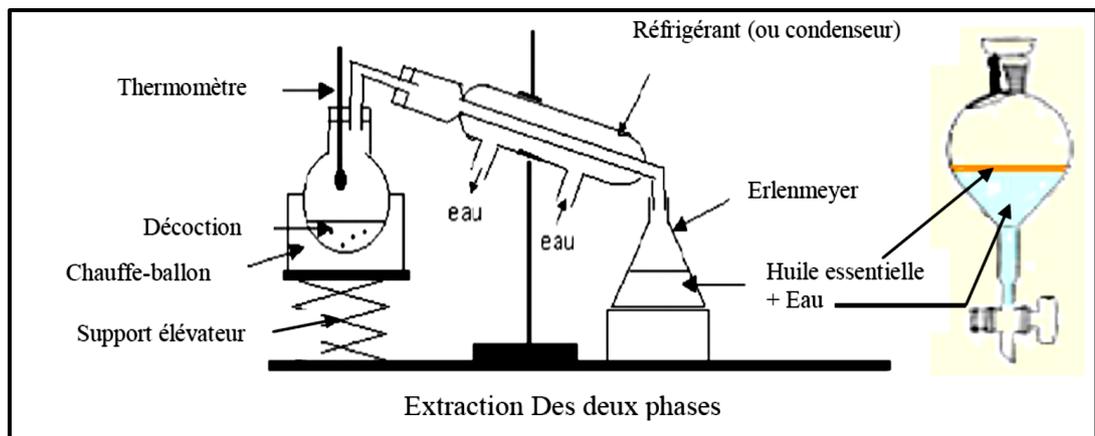


Figure 03 : Appareillage utilisé pour l'hydrodistillation de l'huile
(Nedjai, 2017)

1.7.1.2. L'entraînement à la vapeur d'eau

A la différence de l'hydrodistillation, cette technique (Fig. 04), ne met pas en contact directe l'eau et la matière végétale à traiter ; durant le passage de la vapeur à travers le matériel, les cellules éclatent et libèrent l'huile essentielle qui est vaporisée sous l'action de la chaleur pour former un mélange « eau + huile essentielle ». La vapeur d'eau, qui a volatilisé et entraîné l'huile essentielle, se condense ensuite dans le serpentin du réfrigérant, à la sortie de ce dernier, le mélange est récupéré ensuite séparé (Meghazi, 2012).

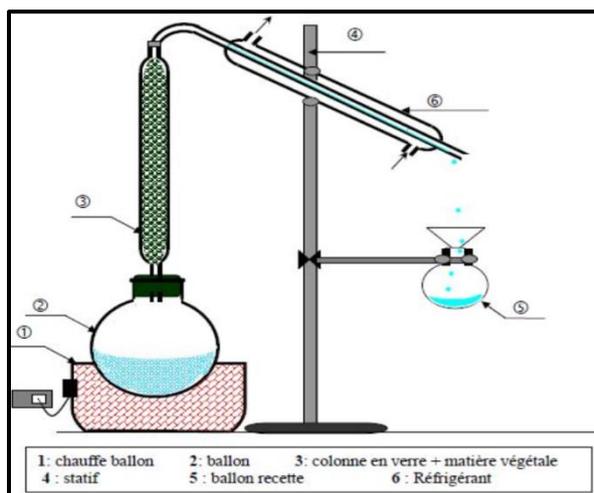


Figure 04 : Dispositif de l'extraction de l'huile essentielle par entrainement à la vapeur d'eau (Nedjai, 2017)

1.7.1.3. Hydrodiffusion ou Percolation

La percolation est une méthode consistant à envoyer la vapeur d'eau, de haut en bas, et non de bas en haut comme pour la distillation. Cette méthode a l'avantage d'être plus rapide et donc moins préjudiciable à la qualité des substances aromatiques. Cependant, la percolation possède l'inconvénient de charger les huiles essentielles en substances non volatiles. Il en résulte des « essences de percolation » et non des huiles essentielles à proprement parler (Attou, 2017).

1.8. Propriétés biologiques des huiles essentielles.

Les huiles essentielles, par la diversité des constituants qui les composent, sont des substances très actives (Hilan *et al.*, 2006). Leur activité biologique dépend des caractéristiques qualitatives et quantitatives de leurs composants qui sont à leur tour influencés par le génotype de la plante, le chémotype de l'huile essentielle ainsi que l'organe et la méthode d'extraction, la saison, l'origine géographique de la plante et ses conditions bioclimatiques et agronomiques (Shirzad *et al.*, 2011).

Les huiles essentielles ont un spectre d'action très large puisqu'elles inhibent aussi bien la croissance des bactéries que celles des moisissures et des levures. Leur activité antimicrobienne est principalement fonction de leur composition chimique, et en particulier de la nature de leurs composés volatils majeurs :

1.8.1. Activité antifongique

Les huiles essentielles agissent sur la biomasse et la production des pseudomycélium et inhibent la germination des spores, l'élongation du mycélium, la sporulation et la production de toxines chez les moisissures (Oussalah, 2007). Un grand nombre de composés volatils ont été testés contre une large gamme de champignons et de levures : *Candida* (*C. albicans*), *Aspergillus* (*A. niger*, *A. flavus*, *A. fumigatus*), *Penicillium chrysogenum* (Ghfir et Dargent, 1995 ; Kalemba et Kunicka, 2003 ; El Ajjouri *et al.*, 2008).

1.8.2. Activité antibactérienne

Les huiles essentielles agissent en empêchant la multiplication des bactéries, leur sporulation et la synthèse de leurs toxines. Les phénols (carvacrol, thymol) possèdent le coefficient antibactérien le plus élevé, suivi des monoterpénols (géraniol, menthol, terpinéol), aldéhydes (néral, géranial) (Charchari *et al.*, 1996 ; De Billerbeck, 2007 ; Satrani *et al.*, 2007 ; Amarti *et al.*, 2010).

1.8.3. Activité antivirale

Les virus donnent lieu à des pathologies très variées dont certaines posent de sérieux problèmes de nos jours. Plusieurs travaux ont montré que les huiles essentielles constituent un moyen adéquat pour traiter ces fléaux infectieux, les virus sont très sensibles aux molécules aromatiques (Shukla *et al.*, 1989 ; Tkachenko, 2006 ; Salah-Fatnassi *et al.*, 2010).

1.8.4. Activité antiseptique

Plusieurs composés sont cités comme responsables des propriétés antiseptiques des huiles essentielles : le thymol, le carvacrol, le cinnamaldéhyde et l'eugénol (Richard, 2008). L'effet des composants antimicrobiens contenus dans les huiles essentielles dépendent du pH de l'aliment, le type et le nombre des microorganismes contaminants ainsi que le type et la concentration du composant antimicrobien (Negi, 2012). Les aldéhydes et les terpènes sont réputés pour leurs propriétés désinfectantes et antiseptiques et s'opposent à la prolifération des germes pathogènes (Lacoste *et al.*, 1996 ; Caillard, 2003). Le groupe des phénols possède une action puissante contre les parasites (Tchoumboungang *et al.*, 2009).

1.8.5. Activité antioxydante

Depuis une quinzaine d'années, la recherche d'antioxydants naturels ou d'extraits à pouvoir antioxydant a suscité beaucoup d'intérêt. Par conséquent, d'excellentes capacités à inhiber les réactions oxydatives ont été mises en évidence pour les huiles essentielles. De nombreux composés responsables du pouvoir antioxydant ont été identifiés, ce sont surtout des phénols et polyphénols. Ces composés phénoliques, comme le thymol, la carvacrol et l'eugénol font partie des molécules des huiles essentielles présentant les plus fortes activités antioxydantes ainsi que d'autres composés qui contribuent à cette activité tels que les monoterpènes alcools, cétones, aldéhydes, hydrocarbures et éthers (Richard, 2008 ; Gabriel *et al.*, 2013).

1.8.6. Activité insecticide

En effet les plantes constituent une source de substances naturelles (huiles essentielles et autres substances), qui présentent un grand potentiel d'application contre les insectes et d'autres parasites des plantes, et du monde animal (Bouzouita *et al.*, 2008).

1.9. Domaines d'application des huiles essentielles

1.9.1. En agriculture

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

1.9.2. En cosmétologie

Les huiles essentielles peuvent être incorporées dans les préparations des produits cosmétiques (Hadji *et al.*, 2012).

1.9.3. En agroalimentaire

Les huiles essentielles sont utilisées comme rehausseurs de goût et pour améliorer la saveur des produits alimentaires élaborés. Actuellement, les industriels souhaitent l'utilisation des huiles essentielles comme conservateurs, au détriment des

molécules de synthèse classiques couramment utilisées, telles que les parabènes. (Kaloustian *et al.*, 2012).

1.9.4. En médecine et pharmacie

A nos jours, les utilisations empiriques des huiles essentielles ont cédé la place à des recherches modernes, approfondies, fondées sur des bases scientifiques. Grâce à leurs propriétés antiseptiques, les huiles essentielles sont très utilisées dans le traitement de nombreuses maladies infectieuses (Aissani, 2015).

1.10. Conservation des huiles essentielles

La plupart des molécules constitutives des huiles essentielles sont insaturées, ce qui les rend instables et sensibles à l'altération. Selon les conditions de conservation, les essences naturelles peuvent être sujettes à des réactions secondaires telles que : le réarrangement moléculaire, la polymérisation, l'oxydation, la fermentation, l'hydrolyse, etc. Les huiles essentielles pures, se conservent officiellement 5 ans. Il est possible de limiter ces dégradations en prenant certaines précautions (Bruneton, 1993) :

- L'utilisation des flacons de faible volume en aluminium, en acier inoxydable ou en verre brun, entièrement remplis et fermés de façon étanche ;
- Le stockage à basse température ;
- La conservation sous atmosphère d'azote.

1.11. Exemples de quelques huiles essentielles, leurs origines et leurs propriétés

Le tableau 01 présente quelques exemples des huiles essentielles, leurs origines et leurs propriétés (Janicke *et al.*, 2006) :

Tableau 01 : Exemples de quelques huiles essentielles, leurs origines et leurs propriétés (Janicke *et al.*, 2006).

Nom commun de la plante d'origine	Nom latin de la plante d'origine	Parties utilisées	Famille botanique de la plante d'origine	Composés principaux de l'huile essentielle	Propriétés de l'huile essentielle
Basilic	<i>Ocimum basilicum</i>	Feuilles	Lamiacées	.- Éthers 50 à 75% - Monoterpénols 8 à 30% .- Sesquiterpènes ≤3%	Antivirales ++, Antalgique ++, Antibactérienne +, Antifongique +, Anti-inflammatoire ++, Anti-nauséuse ++, Antiseptique + Antispasmodique ++++
Origan	<i>Origanum vulgare</i>	Sommité fleurie	Lamiacées	.Phénols (Carvacrol, Thymol) 60 à 70% . Monoterpènes (Terpinène) 25 à 30% . Monoterpénols (Linalol) 5 à 10%	Antibactérienne, Anti-infectieuse à très large spectre, Antiparasitaire Antivirale, Fongicide.
Romarin	<i>Rosmarinus officinalis</i>	Parties aériennes	Lamiacées	.Monoterpènes cycliques (Camphre, Cinéol ou Alpha-Pinène) 15 à 30% .Monoterpènes (Bornéol) 15 à 20%	.Anticatharrale, .Bactéricide, Expectorante, .Fongicide, .Mucolytique
Menthe	<i>Mentha spicata</i>	Plante fleurie	Lamiacées	.Cétones 40 à 80% .Monoterpènes 18 à 25% .Esters, .Oxydes, .Monoterpénols, .Sesquiterpénols, .Sesquiterpènes	.Anticatarrhale, .Anti-inflammatoire, .Calmante nerveuse, .Cicatrisante cutanée .Expectorante, .Mucolytique, .Tonique digestive
Gingembre	<i>Zingiber officinale</i>	Rhizome	Zingibéracées	.Sesquiterpènes 55 à 60% Monoterpènes 15 à 20% .Monoterpénols 2 à 3% .Sesquiterpénols (Linalol) 2 à 5%	Antalgique, Anti-inflammatoire, Antispasmodique, Stimulante du système digestif
Persil	<i>Petroselinum sativum apioliferum</i>	Apiacées	Semence	.Éthers 65 à 68% .Monoterpènes 35%	Antirhumatismale, Antispasmodique Régulatrice des règles, Tonique musculaire Tonique utérine

Tableau 01 : Exemples de quelques huiles essentielles, leurs origines et leurs propriétés (suite)
(Janicke *et al.*, 2006)

Nom commun de la plante d'origine	Nom latin de la plante d'origine	Parties utilisées	Famille botanique de la plante d'origine	Composés principaux de l'huile essentielle	Propriétés de l'huile essentielle
Lavande	<i>Lavandula angustifolia</i> , <i>Lavandula vera</i> (sauvage), <i>Lavandula officinalis</i> (cultivée)	Sommité fleurie	Lamiacées	.Esters (Acétate de linalyle) 30 à 50% .Monoterpénols (Linalol) 30 à 45% .Monoterpènes (Terpinène) 5 à 12%	Apaisante du système nerveux +++ Antidouleur musculaire ++ Anti-inflammatoire ++, Antispasmodique +++ Cicatrisante cutanée +++ Décontractante musculaire ++ Régénératrice cutanée +++ Répulsif anti-poux ++ Antiseptique +++
Laurier	<i>Laurus nobilis</i>	Feuille	Lauracées	.Oxydes (Cinéol) 35 à 70% .Monoterpénols .Monoterpènes 0 à 15% .Esters 5 à 20%, .Monoterpénols .Aldéhydes, .Lactones 3 %, .Phénols 3 à 10 %	Antidouleur, Antalgique puissante ++++ Antiputride ++, Antispasmodique puissante ++++, Expectorante ++++ Fluidifiante sanguine ++, Mucolytique + Neurorégulatrice +, Neurotonique + Régulatrice lymphatique + Stimulante du système immunitaire ++
Eucalyptus	<i>Eucalyptus globulus</i>	Feuille	Myrtacées	.Oxydes terpéniques 75 à 85% .Monoterpènes 10 à 20% .Sesquiterpénols 6% .Esters 0 à 6%	Anticatarrhale, Anti-infectieuse Anti-inflammatoire, Antifongique, Antiseptique aérienne, Expectorante, Mucolytique
Thym	<i>Thymus vulgaris</i>	sommités fleuries	Labiacées	.Phénols (Thymol) 98 à 99% .Phénols (Carvacrol) traces	Anti-infectieuse (antibactérienne et antivirale) ++++ Antiseptique ++++

Chapitre 02 :
Matériel et méthodes

Chapitre 02 : Matériel et méthodes

2.1. Objectif de l'étude

Avant de présenter le matériel et les méthodes utilisées, nous tenons à rappeler que l'objectif de notre travail est de tester *in vitro* l'activité antifongique de quelques huiles essentielles à l'égard de quelques champignons phytopathogènes.

2.2. Matériel végétal

2.2.1. Présentation des espèces végétales utilisées

Le matériel végétal utilisé dans cette étude est constitué de feuilles et de sommités fleuries de trois espèces végétales (Figs. 05, 06 et 07) : Le romarin (*Rosmarinus officinalis* L.), l'eucalyptus (*Eucalyptus camaldulensis*) et l'origan (*Origanum floribundum* Munby).



Figure 05 : Aspect botanique du romarin (*Rosmarinus officinalis*) [1]



Figure 06 : Aspect botanique de l'Origan (*Origanum floribundum* Munby) [2]



Figure 07 : Aspect botanique de l'Eucalyptus (*Eucalyptus camaldulensis*) [3]

2.2.2. Origine des espèces végétales utilisées

Eucalyptus camaldulensis et *Origanum floribundum* ont été fournies par Docteur KSOURI Samir, et Docteur KSOURI-DJEBIR Soumia, enseignants chercheurs à la faculté des sciences de la nature et de la vie et sciences de la terre et de l'univers de l'université 8 Mai 1945 de Guelma.

Quant aux feuilles et sommités fleuries de *Rosmarinus officinalis*, elles ont été récoltées le mois de Mars 2018 de la région d'Ouenza (Chaîne de Gora) wilaya de Tébessa, par Melle DJAIBET Chaima, étudiante en deuxième année master, option parasitologie au sein de notre faculté. Le tableau 02 indique l'origine et la date de collecte des différentes espèces.

Tableau 02 : Origine des espèces végétales utilisées

Espèce végétale	Famille botanique	Origine	Date de collecte	Partie utilisée
<i>Rosmarinus officinalis</i>	Lamiaceae	Ouenza (Chaîne de Gora) wilaya de (Tébessa)	Mars 2018	Feuilles et sommités fleuries
<i>Eucalyptus camaldulensis</i>	Myrtaceae	Djebel Beni Salah (Guelma)	Mai - Juillet 2015	Feuilles et sommités fleuries
<i>Origanum floribundum Munby</i>	Lamiaceae	Djebel Haouara (Guelma)	Mai - Juillet 2015	Feuilles et sommités fleuries

2.2.3. Situation géographique et caractéristiques pédoclimatiques des zones de collecte du matériel végétal

❖ Ouenza, origine du romarin utilisé dans cette étude, est une commune de la wilaya de Tébessa, située dans l'extrême Est du pays, près de la frontière tunisienne, et à 70 km du chef lieu de la wilaya. Son altitude moyenne est de 608 m, elle se caractérise par un climat semi-aride, sec et froid l'hiver, chaud l'été. Ses coordonnées géographiques sont : 35° 55' 00" Nord, et 8° 04' 60" Est. Le sol de la région de Tébessa est de type argileux [4]

❖ Guelma, origine d'eucalyptus et d'origan, se situe dans le nord-Est de l'Algérie, à une latitude de 36°27'43" Nord et une longitude de 7°25'33" Est. L'altitude par rapport au niveau de la mer est de 305 m. Elle se caractérise par un climat méditerranéen sub-humide, et un sol de type argileux. La région de Djebel Haouara, lieu de collecte de l'origan, se localise à une latitude de 36°53'28" Nord et une longitude de 7°59'98". Est, et la région de Djebel Beni Salah, lieu de collecte d'eucalyptus, se localise à une latitude de 36°47'43" Nord et une longitude de 7°83'89" Est [5].

2.2.4. Traitement des échantillons

La matière végétale, recueillie, a été séchée à l'air libre, à l'ombre jusqu'à la stabilisation de son poids (07 jours), puis conservée dans les conditions ambiantes du laboratoire, jusqu'à l'utilisation.

2.2.5. Extraction des huiles essentielles

Les huiles essentielles des plantes utilisées dans cette étude ont été extraites par hydro-distillation. Le travail a été réalisé au sein des laboratoires de la faculté des sciences de la nature et de la vie et sciences de la terre et de l'univers de l'université de Guelma.

L'opération s'accomplit grâce à un appareil de type *Clevenger* (Fig. 08). La méthode consiste à immerger directement 200 g de matériel végétal séché dans un litre d'eau distillée, dans un ballon en verre de deux litres, surmonté d'une colonne de 60 Cm de longueur, reliée à un réfrigérant. L'eau distillée est portée à l'ébullition durant trois heures de temps. Au fur et à mesure que le temps de distillation passe, on remarque que deux phases franches caractérisent le distillat, l'une est organique (huile essentielle) chargée de constituants volatils contenus dans la plante et l'autre est aqueuse (ou l'hydrolat) ayant une densité plus élevée, à la fin de la distillation, et après quelques minutes de repos, le volume de l'huile essentielle obtenu est

récupéré et stocké à une température de - 20 °C à l'abri de la lumière dans un flacon en verre, sombre jusqu'au moment de son usage.

Cette méthode est parmi les procédés d'extraction ou de séparation de certaines substances organiques, les plus anciens, apportés par les Arabes au IX^{ème} siècle (Sutour, 2011). Laghchimi *et al.* (2014), signale que cette méthode est décrite par la pharmacopée européenne.



Figure 08 : Photographie du montage de type *Clevenger* utilisé pour l'extraction des huiles essentielles (Photo personnelle)

2.2.6. Détermination du rendement en huiles essentielles

Le rendement en huile essentielle (volume en mL) a été déterminé par rapport à 100 g de la matière sèche, et exprimé en pourcentage, à partir de 03 échantillons, pour les trois espèces végétales utilisées, selon la formule ci-dessous décrite par Laib (2012) et Adjou et Soumanou (2013).

$$RHE (\%) = (mh / mv) \times 100.$$

Où : **RHE** : Rendement en huile essentielle (%).

mh : Masse de l'huile essentielle (g).

mv : Masse de la matière végétale sèche (g)

2.2.7 Analyse de la composition des huiles essentielles des plantes utilisées

La composition chimique des huiles essentielles utilisées dans cette étude a été déterminé par Dr. KSOURI Samir, par la méthode de chromatographie en phase gazeuse (CPG).

L'analyse des HEs a été effectuée par GC-MS HP modèle 6980 MSD inerte (Agilent Technologies, USA), équipées de colonne HP-105 5MS (30 mx 0,25 mm de diamètre et 0,25 m d'épaisseur de film). La température de l'injecteur a été maintenue à 280 ° C. La température du four a été réglée à 60 ° C pendant 1 minute, augmentée à 280 ° C à 5 ° C / min et ensuite maintenue constante à cette température pendant 8 minutes. Le débit du gaz porteur d'hélium était de 1 ml / min et un mode divisé 1/100 était utilisé. L'identification des différents composants dans les HEs a été faite par comparaison de leur indice Kovats et de la fragmentation de la masse GC avec ceux des données Wiley Mass Spectral (Agilent Technologies 7ème édition, Inc.) et des données de la bibliothèque NIST 05 MS. Chaque analyse a été exécutée doublement. (Ksouri, 2015)

2.3. Matériel fongique utilisé

2.3.1. Présentation des espèces fongiques utilisées

Trois souches fongiques ont fait l'objet de cette étude ; le choix des souches a été effectué en fonction de leur importance en phytiatrie et de leur risque fort de résistance aux fongicides :

- *Zymoseptoria tritici* (téléomorphe *Mycosphaerella graminicola*) : champignon Ascomycète, agent causal de la tache septorienne des feuilles chez le blé, l'une des maladies les plus répandues et les plus dévastatrices sur le blé. Les pertes occasionnées peuvent dépasser 40 % (Allioui, 2015).

- *Botrytis cinerea* (téléomorphe *Botryotinia fuckeliana*) : champignon Ascomycète polyphage, responsable de pourritures sur un grand nombre de plantes hôtes d'importance économique en agriculture et en horticulture (Viret *et al.*, 2010 ; Walker, 2013), les dégâts occasionnés par ce champignon sont considérables et peuvent atteindre 20% des récoltes mondiales des cultures (Alem-Etsouri *et al.*, 2016).

- *Fusarium roseum* : champignon Deutéromycète, responsable de la fusariose du blé et qui peut engendrer des dégâts allant de 30 à 70 % de pertes (Syngenta, 2018).

2.3.2. Origine des souches

Les souches fongiques utilisées dans cette étude ont été isolées de plantes infectées :

- *Zymoseptoria tritici* : isolée à partir de feuilles de blé tendre collectées pendant la campagne 2016/2017 et conservées à + 4 °C.

- *Botrytis cinerea* : isolée à partir de plants de tomate montrant les symptômes de la pourriture grise.

- *Fusarium roseum* : fournie par Dr. BENADA M'hamed, enseignant chercheur à la faculté des sciences de la nature et de la vie et sciences de la terre et de l'univers de l'université 8 Mai 1945 de Guelma.

2.3.3. Culture et conservation des souches

Les souches fongiques ont été cultivées sur le milieu nutritif PDA (Potato Dextrose Agar), incubées pendant 07 jours à l'étuve à une température de 25° C, puis conservées à + 4° C jusqu'à leur usage, et ce conformément à la méthode décrite par Sasidharan *et al.* (2012), qui signalent que le milieu PDA est le milieu adéquat pour tester les activités des extraits de plantes à l'égard des champignons.

2.4. Evaluation de l'activité antifongique des huiles essentielles testées

2.4.1. Activité des huiles testées sur la croissance mycélienne des souches fongiques étudiées

L'activité antifongique des trois huiles essentielles testées à l'égard des souches fongiques citées ci-dessus a été réalisée *in vitro* par différentes méthodes et par applications de différentes concentrations des huiles essentielles :

2.4.1.1. Verrerie, réactifs, instruments et matériel utilisé

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

- Bain-marie (Mettler),
- Balance de précision,
- Agitateur + plaque chauffante,
- Hotte microbiologique
- Etuve,
- Autoclave,
- Vortex,
- Flacons de 250 mL,
- Bec bunsen,
- Boîtes de Pétri de 50 mm et de 90 mm de diamètre,
- Pipettes Pasteur,
- Tubes coniques en plastique stérile,
- Micro pipette (2 µL , 10 µL, 100 µL et 1000 µL),
- Microplaques de 96 puits
- Milieu PDA,
- Milieu Sabouraud,
- Huiles essentielles à tester.

2.4.1.2. Techniques de confrontation et concentrations des huiles essentielles utilisées

Trois techniques de confrontation ont été adoptées pour l'évaluation de l'activité antifongique des huiles essentielles testées à l'égard des souches fongiques étudiées :

❖ Technique de contact direct à travers des puits

Cette technique a concerné les trois huiles essentielles testées et les trois souches fongiques étudiées. Elle consiste à une diffusion des huiles dans le milieu de culture inoculé par les champignons étudiés à travers des puits.

Dans chaque boîte de Pétri de 90 mm de diamètre, préalablement ensemencée aseptiquement par écouvillonnage par le champignon, en utilisant une suspension sporale (1 mL / boîte d'une suspension de spores, préparée le jour même du test), après séchage de quelques minutes à proximité de la flamme, et refroidissement pendant une nuit à + 4° C, quatre puits sont creusés, dans le milieu à l'aide d'un emporte-pièce stérile, puis chargés des différentes concentrations des huiles testées : 0, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 et 100 µL d'huile. La concentration 0 µL d'huile essentielle (chargé d'eau physiologique) est prise comme témoin négatif. Les boîtes sont ensuite incubées à une température de 25° C pendant cinq jours, et la lecture des résultats se fait par examen et mensuration du diamètre de la zone d'inhibition de la croissance de la souche fongique au voisinage des puits chargés par les différentes concentrations des huiles testées. Les tests réalisés sont effectués en trois répétitions pour chaque souche et chaque huile testée.

Plusieurs auteurs ont utilisé cette technique pour tester l'activité antimicrobienne des extraits de plantes, et des huiles essentielles (Chemloul, 2014 ; Lakhdar, 2015).

Le choix des différentes concentrations a été effectué sur la base de données bibliographiques portant sur le même axe.

- Préparation des suspensions sporales :

Les suspensions sporales ont été préparées à partir de cultures âgées de sept jours, les spores ont été récoltées par grattage dans des tubes coniques en plastique stériles contenant une solution de l'eau physiologique à 0.9%, stérile, Après agitation au vortex, les concentrations sont ajustées aux concentrations spécifiques pour les différents agents pathogènes étudiés, en utilisant la cellule de Malassez :

- Pour *Zymoseptoria tritici* : une concentration sporale de $3 \cdot 10^6$ spores / mL a été utilisée (Perelló *et al.*, 2013).
- Pour *Botrytis cinerea* : une concentration sporale de 10^4 spores / mL a été utilisée (Soylu *et al.*, 2010).
- Pour *Fusarium roseum* : une concentration sporale de 10^5 spores / mL a été utilisée (Remmal *et al.*, 1993).

❖ **Technique de micro-atmosphère 01 (Fumigation 01)**

La méthode de micro-atmosphère repose sur l'évaluation de l'activité inhibitrice de la fraction volatile des huiles essentielles à une température d'incubation donnée, sur la croissance mycélienne des champignons étudiés (Vivek *et al.*, 2009 ; Gbogbo *et al.*, 2013 ; Laghchimi *et al.*, 2014 ; Balouiri *et al.*, 2016).

Pour cette méthode, qui a également concerné toutes les souches étudiées et tous les huiles testées, des disques mycéliens fongiques de 6 mm de diamètre, des souches fongiques testées, prélevés de cultures âgées de sept jours, ont été inoculés aseptiquement au centre des boîtes de Pétri sur un milieu PDA (20 mL de milieu / boîte, ce qui offre une atmosphère de 80 % volume air). Des disques de 6 mm de diamètre sont ensuite préparés, à l'aide de papier filtre puis stérilisés par autoclavage à 120°C pendant 20 minutes ; ces derniers sont ensuite imprégnés par les différentes concentrations des huiles à tester.

Dans chacune des boîtes inoculées, un disque est déposé à la face interne du couvercle de la boîte de Pétri puis imbibé par une concentration définie de l'huile essentielle à tester. Les concentrations des huiles testées sont les mêmes concentrations que celles utilisées pour la technique de contact direct : 0, 5, 10, 20, 30, 40, 50 et 60 μ L, La concentration 0 μ L d'huile essentielle (disque chargé d'eau physiologique) est prise comme témoin négatif. Les boîtes sont ensuite immédiatement, scellées à l'aide de parafilm pour éviter l'évaporation de l'huile

essentielle, et laissées pendant 15 minutes à la température ambiante avant d'être mises à incuber dans une étuve à 25° C pendant sept jours. Trois répétitions sont effectuées pour chaque concentration de l'huile testée. Ce qui permet d'avoir huit (08) boîtes /souche / huile testée / répétition.

La croissance mycélienne a été suivie en mesurant la moyenne des deux diamètres perpendiculaires passant par le centre de chaque boîte. La fongitoxicité, exprimée en terme de pourcentage d'inhibition de la croissance du mycélium (I%), a été calculée selon la formule de Pandey *et al.* (1982), décrite par Laghchimi *et al.* (2014), pour *Zymoseptoria tritici* et *Fusarium roseum* :

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

Où : **Dt** est le diamètre de la culture du champignon (en mm) dans un milieu sans huile (témoin),

Di est le diamètre de la culture du même champignon dans un milieu en présence de l'huile.

Pour *Botrytis cinerea*, les tests effectués ont montré que la souche utilisée a réagi à la confrontation aux huiles essentielles testées par la formation de deux cercles concentriques, représentant deux zones d'inhibition : Une zone interne caractérisée par l'inhibition complète de la croissance mycélienne, et une zone externe à la première, caractérisée par une inhibition partielle de la croissance, au niveau de laquelle, nous avons noté la formation d'un mycélium rasé (blanc), sans fructifications. La notation de l'activité antifongique a été effectuée par la mensuration des diamètres des deux zones d'inhibition.

❖ **Technique de micro-atmosphère 02 (Fumigation 02)**

Cette méthode a concerné uniquement la souche *Botrytis cinerea* et a porté sur l'huile essentielle de : *Rosmarinus officinalis*

Le principe de cette méthode est le même que celui de la technique de fumigation 01 décrite ci-dessus, sauf que le champignon est préalablement ensemencé aseptiquement par écouvillonnage sur le milieu PDA. Les concentrations des huiles testées sont : 0, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 125, 150, 175 et 200 µL, La

concentration 0 μL d'huile essentielle (disque chargé d'eau physiologique) est prise comme témoin négatif. Parmi les auteurs qui ont utilisé cette technique, nous citons : El kalamouni (2010) et Toure (2015). La lecture des boîtes et la notation de l'activité antifongique a été effectuée de la même manière que pour la méthode de fumigation 01, utilisée pour la notation de *Botrytis cinerea*.

2.4.2. Activité des huiles testées sur la germination des spores et la longueur des tubes germinatifs, des souches fongiques étudiées

Ce test a été réalisé dans des boîtes de Pétri de 50 mm de diamètre, selon la technique de Soyly *et al.* (2010) décrite par Adebayo *et al.* (2013) et a concerné le *Botrytis cinerea* seulement, qui a été confronté à deux huiles essentielles (huile d'eucalyptus, et huile d'origan). Trois concentrations d'huile essentielle ont été utilisées pour chaque huile testée (25 ; 50 et 75 μL d'huile/mL de solvant : Ethanol à 0.5 % et Tween 80 à 0.1 %).

Dans chaque boîte de Pétri, et sur un milieu PDA amendé par les différentes concentrations d'huile, 25 μL d'une suspension sporale de 10^4 spores/mL sont étalés par écouvillonnage sur le milieu, les boîtes sont scellées avec du parafilm puis incubées à 25 °C pendant 12h. Deux boîtes témoins ont été utilisées, l'une contenant du milieu PDA amendé avec de l'eau physiologique, l'autre contenant le milieu PDA amendé avec l'eau distillée dans le solvant (Ethanol à 0.5 % et Tween 80 à 0.1 %). La lecture des boîtes se fait par détermination du pourcentage de germination des spores et l'observation de la morphologie des structures fongiques aux différentes concentrations des huiles testées. L'essai a été réalisé en trois répétitions.

2.4.3. Etude de la nature de la fongitoxicité des huiles essentielles testées à l'égard des souches fongiques étudiées

L'étude de la nature de l'inhibition des huiles essentielles a été réalisée pour déterminer la concentration minimale inhibitrice (CMI), la concentration minimale fongistatique (CMF) et la concentration minimale fongicide ou létale (CML). La CMI est définie comme la plus faible concentration de l'huile essentielle qui va inhiber la croissance visible d'un microorganisme, après la durée d'incubation (Laghchimi *et al.*, 2014 ; Mahboubi

et Kazempour, 2015). Cette dernière a été déterminée par la méthode de micro-dilutions, selon la technique décrite par Mahboubi et Kazempour (2015) :

- Des microplaques de 96 puits (Fig. 09) ont été utilisées pour la réalisation de ce test ;
- Le milieu de culture utilisé étant le milieu Sabouraud liquide + Gentamicine ;
- Pour chaque souche fongique et par huile testée, 12 puits sont préparés : 10 puits comportant les différentes concentrations (dilutions) de l'huile, le puit 11 comporte le témoin négatif (suspension sporale dans le milieu sans huile), et le puit 12 comportant le milieu de culture non inoculé, et sans ajout d'huile pour vérifier l'état du milieu utilisé. Les tests ont été réalisés en trois répétitions pour chaque souche et pour chaque huile testée. Les concentrations des huiles utilisées sont : 25 ; 12.5 ; 6.25 ; 3.12 ; 1.56 ; 0.78 ; 0.39 ; 0.19 ; 0.09 et 0.04 μL d'huile / 200 μL du milieu de culture inoculé. Les plaques ont été incubées à 25 °C pendant 05 jours pour *Botrytis cinerea* et *Fusarium roseum* et 10 jours pour *Zymoseptoria tritici*.



Figure 09 : Microplaques utilisées pour la technique de micro-dilution

La lecture des plaques est effectuée par visualisation des puits à la lumière blanche, et niveau de turbidité du milieu, signale la présence ou l'absence de croissance de la souche fongique en présence des différentes concentrations d'huiles.

La distinction entre la concentration minimale fongistatique (CMF) et la concentration minimale fongicide ou létale (CML) est déterminée par le transfert et l'étalement (par écouvillonnage) de quelques microlitres des suspensions sporales amendées

par les concentrations d'huiles, et où aucune croissance n'a été observée, dans des boîtes de Pétri, sur un nouveau milieu PDA dépourvu de cette huile. La concentration est fongistatique si la croissance du champignon reprend à nouveau, et fongicide ou létale s'il n'y a pas de croissance (Laghchimi *et al.*, 2014).

2.4.4. Tests relatifs aux témoins positifs

2.4.4.1. Fongicides utilisés

Des fongicides de synthèse ont été utilisés comme témoins positifs. Ces fongicides ont été préparés en fonction de la dose recommandée pour lutter contre les différentes souches fongiques phytopathogènes, en se référant aux fiches techniques des différents produits. Le tableau 03 présente les différents produits utilisés et leurs caractéristiques.

Tableau 03 : Caractéristiques des fongicides utilisés pour les tests de témoins positifs

N°	Formulation du fongicide	Matière (s) active (s)	Famille (s) chimique (s)	Champignon Cible	Dose recommandée
01	Poudre mouillable	Fosétyl-Aluminium à 80 %	Phosphonate	<i>Botrytis cinerea</i>	250-300 g/hL
02	Concentré émulsionnable	Tubéconazole à 12.7% Prothioconazole à 12.7%	Triazole Triazolinthione	<i>Zymoseptoria tritici</i> , <i>Fusarium roseum</i>	1 L / ha

2.4.4.2. Tests réalisés

▪ Test de micro-atmosphère (réalisé dans les boîtes de Pétri)

Pour ce test nous avons retenu trois doses seulement de la matière active pour chaque fongicide : la dose recommandée, la moitié, et le double de la dose recommandée (Tab. 04). La technique adoptée est la technique de fumigation 01 (en utilisant des disques

Tableau 04 : Concentrations en matière (s) active (s) utilisées pour le test de témoin positif dans les boîtes de Pétri.

N°	Matière active	Quantité de produit	Concentration De la matière	Quantité d'eau	Quantité /disque (µL)
----	----------------	---------------------	-----------------------------	----------------	-----------------------

			active	distillée	
01	Fosétyl-Aluminium à 80 %	1.5 mg/mL 3 mg/mL 6 mg/mL	1.2 mg 2.4 mg 4.8 mg	1 mL	15 µL
02	Tubéconazole à 12.7% Prothioconazole à 12.7%	0.00125mL/mL 0.0025 mL/mL 0.005 mL/mL	0.317 mL 0.635 mL 1.27 mL	1 mL	15 µL

▪ **Test de microplaques**

Ce test a été effectué par la technique de micro-dilution de la même manière que celle décrite ci-dessus pour la détermination de la CMI, dans des microplaques de 96 puits. Différentes concentrations ont été préparées, sur la base de la dose recommandée pour le champignon ciblé (Tabs. 05 et 06) :

Tableau 05 : Concentrations en matière active utilisées pour le test de témoin positif dans les microplaques pour le Fosétyl-Aluminium

puits	01	02	03	04	05	06	07	08	09	10
Produit mg/mL	48	24	12	6	3	1.5	0.75	0.375	0.187	0.09
Matière active (mg/mL)	38.4	19.2	9.6	4.8	2.4	1.2	0.6	0.3	0.15	0.075

Tableau 06 : Concentrations en matières actives utilisées pour le test de témoin positif dans les microplaques pour le Tubéconazole + Prothioconazole

Puits	01	02	03	04	05	06	07	08	09	10
Produit (µL/mL)	40	20	10	5	2.5	1	0.6	0.3	0.15	0.07
Matière active (mg/mL)	10.16	5.08	2.54	1.27	0.635	0.317	0.158	0.079	0.039	0.019

Chapitre 03 :
Résultats et discussion

Chapitre 03 : Résultats et discussion

3.1. Rendement en huiles essentielles des plantes utilisées

Les huiles essentielles des trois plantes utilisées dans cette étude (Romarin, Eucalyptus et Origan), extraites par la méthode d'hydrodistillation à partir des feuilles et des sommités fleuries ont montré des colorations variables allant du jaune claire pour l'huile du romarin (*Rosmarinus officinalis* et d'eucalyptus (*Eucalyptus camaldulensis*), au rouge foncé pour l'huile de l'origan (*Origanum floribundum*), avec de fortes et persistantes odeurs. Les rendements moyens obtenus, sont représentés dans la figure 10.

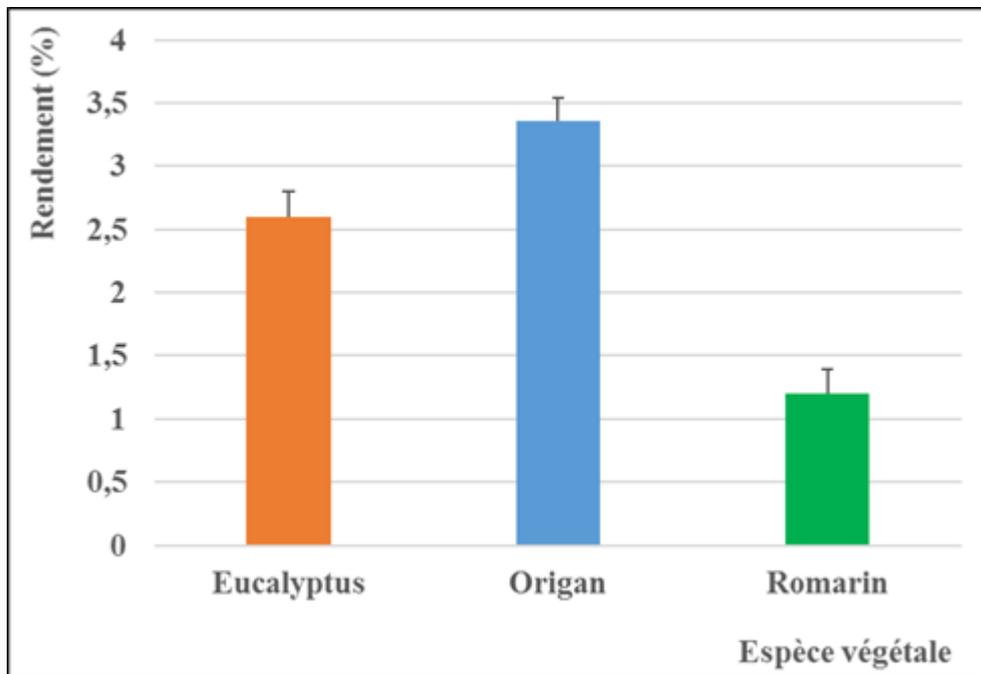


Figure 10 : Rendement en huiles essentielles des plantes utilisées

Le rendement en huiles essentielles des plantes étudiées (*Rosmarinus officinalis*, *Eucalyptus camaldulensis*, et *Origanum floribundum*), est exprimé en pourcentage par rapport à la masse utilisée de la matière sèche du végétal (g/100g). La figure 10 montre que le rendement en huile essentielle d'*O. floribundum*, est élevé par rapport aux autres espèces ; les valeurs enregistrées sont de l'ordre de $3.36 \pm 0,18$ % pour *O. floribundum*, $2.6 \pm 0,2$ % pour *E. camaldulensis*, et $1.2 \pm 0,19$ % seulement pour *R. officinalis*.

En comparant les rendements en huiles essentielles obtenus dans cette étude, avec ceux rapportés dans la littérature, des variations ont été effectivement révélés :

Le rendement en huiles essentielles pour *E. camaldulensis* obtenu dans cette étude ($2.6 \pm 0,2$ %), est supérieur à celui obtenu par Hmiri *et al.* (2011) pour la même espèce, récoltée dans la région Nord du Maroc, à Sidi Yahia (Maamora), en mai 2008, qui ont signalé que la teneur huile essentielle, enregistrée pour cette espèce n'a pas dépassé le 1,40 %. Concernant le *R. officinalis* le rendement obtenu dans cette étude ($1.2 \pm 0,19$ %), est inférieur à celui trouvé par Lanseur (2017), dans des plantes récoltées en mois de mars 2017 du nord d'Algérie dans la région de Boukhelifa située à 45Km à l'Est de Bejaia, où la valeur obtenue est de $1,49 \pm 0,19$ %. Alors que pour *O. floribundum*, peu de travaux sont réalisés sur ce genre, et plus spécifiquement sur des espèces autres que l'espèce *floribundum* utilisée dans cette étude. Ksouri (2015) a trouvé un rendement en huile de cette espèce de l'ordre de 1.68 %, pour des échantillons récoltés de Djebel houara (Guelma) en juin 2010.

Les variations de teneurs en huiles essentielles notées pour *R. officinalis* et *E. camaldulensis* peuvent être attribuées à plusieurs facteurs notamment le degré de maturité des plantes, l'interaction avec l'environnement (type de climat, sol), le moment de la récolte et la méthode d'extraction (Laib, 2013).

3.2. Composition chimique des huiles essentielles testées

Les résultats relatifs à la composition des huiles essentielles extraites des parties aériennes des plantes étudiées, obtenus à travers l'analyse chromatographique sur phase gazeuse (CPG), réalisée par Dr. KSOURI Samir, sont consignés dans le tableau 07.

L'examen de ces résultats montre qu'au total 41 constituants, ont été repérés dans l'huile essentielle d'eucalyptus (*E. camaldulensis*), 37 constituants dans l'huile essentielle du romarin (*R. officinalis*), et 26 constituants dans l'huile essentielle de l'Origan (*O. floribundum*).

Pour l'huile du romarin, la fraction des monoterpènes forme la majorité des constituants, le composant essentiel est le 1,8-Cineole, qui représente 26, 90 % de la composition de l'huile, suivi du L-Camphor, qui représente 19 % de la composition de l'huile, et de l'Alpha.-Pinene, qui représente 12, 06 % de la composition de l'huile (Tab. 07).

Tableau 07 : Composition des huiles essentielles extraites des parties aériennes des différentes espèces végétales étudiées (Ksouri, Données personnelles).

N°	<i>Rosmarinus officinalis</i>		<i>Eucalyptus camaldulensis</i>		<i>Origanum floribundum</i>	
	Composant	Teneur (%)	Composant	Teneur (%)	Composant	Teneur (%)
01	Tricyclene	0.15	Alpha.-Pinene,	4.41	Alpha.-Thujene	0.51
02	Alpha.-Pinene	12.06	Sabinene	0.74	Alpha.-Pinene	1.93
03	Camphene	6.39	Beta.-Myrcene	0.76	Camphene	0.39
04	2.-Beta.-Pinene	3.61	L-Phellandrene	4.04	2.-Beta.-Pinene	0.22
05	Beta.-Myrcene	2.23	P-Cymene	17.45	Beta.-Myrcene	3.57
06	Gamma.-Terpinene	0.51	Sabinen	1.69	Alpha.-Terpinene	1.37
07	1,8-Cineole	26.90	(E)-Ocimene	0.08	Cymol, Cymene, Thymene	10.09
08	Beta. Ocimene	0.14	Gamma.-Terpinene	0.84	P-Cymene	6.96
09	Gamma.-Terpinene	0.86	Cis-Sabinenehydrate	0.01	O-Cymene, O-Cymol	2.03
10	Trans-Sabinene Hydrate	0.03	Alpha.-Terpinolene	0.76	Trans.Beta.-Ocimene	0.07
11	Alpha.-Terpinolene	0.57	Linalool L	0.64	Gamma.-Terpinene	11.32
12	Linalool L	0.41	Trans-Carveol 1	0.16	Alpha.-Terpinolene	0.32
13	L-Camphor	19.00	Cuminic Aldehyde	4.29	Linalool L	0.5
14	Borneol L	11.76	Piperitone	0.57	Carvacrol Methyl Ether	0.96
15	Alpha. Terpeneol	5.77	P-Cymen-7-Ol	1.56	M-Thymol	2.04
16	Beta.-Citronellol	0.09	Carvacrol	1.59	Carvacrol	46.82
17	Pulegone	0.26	Gamma-Pyronene	0.92	Piperitenone	1.18
18	L-Bornyl Acetate	3.00	Copaene	0.05	Trans-Caryophyllene	2.00
19	Thymol	0.10	Beta. Elemene	0.17	Alpha.-Humulene	0.21
20	Carvacrol	0.36	Alpha.-Gurjunene	0.06	Alpha.-Curcumen	0.15
21	Carvone	0.09	Trans-Caryophyllene	0.03	Zingiberene	0.15
22	Piperitenone	0.16	Delta.-Selinene	0.04	Beta.-Bisabolene	0.41
23	Eugenol	0.05	(+)-Aromadendrene	0.21	Alpha.-Amorphene	0.06
24	Ylangene	0.05	Trans.-Beta.-Farnesene	0.69	Beta.-Sesquiphellandrene	1.34

25	Alpha.-Copaene	0.09	Allo-Aromadend	0.99	Cis.-Alpha.-Bisabolene	0.04
26	Methyleugenol	0.14	Beta.-Selinene	0.24	Caryophyllene Oxide	0.54
27	Trans-Caryophyllene	2.30	Germacrene-D	0.07		
28	(+) - Aromadendrene	0.02	Bicyclogermacrene	1.28		
29	Alpha.-Humulene	0.41	Alpha.-Amorphene	0.05		
30	Alpha.-Amorphene	0.19	Delta.-Cadinene	0.20		
31	Beta.-Selinene	0.02	Aromadendrene	0.87		
32	Beta.-Patchoulene	0.04	Spathulenol	13.45		
33	Alpha.-Muurolene	0.03	Isospathulenol	1.57		
34	Beta.-Bisabolene	0.03	Ledol	0.66		
35	Delta.-Cadinene	0.16	(-)-Allospathulenol	0.89		
36	Caryophyllene Oxide	0.49	T-Muurolol	1.03		
37	Caryophyllenol-I	0.36	(Z,Z)-Farnesal	0.72		
38			Trans-Farnesol	5.37		
39			Farnesal	1.08		
40			(-)-Lepidozenal	0.70		
41			Farnesyl Acetate 3	0.43		
	Fraction identifiée (%)	92.24	/	71.36	/	95.18
	Fraction non identifiée (%)	7.5	/	28.64	/	4.82

Les comparaisons de nos résultats avec des études réalisées sur la même espèce, montrent qu'il y a des véritables intervalles en ce qui concerne les pourcentages des constituants : le 1,8-Cineole obtenu dans notre étude était très élevé (26.90 %), comparativement à celui cité par Giordani (2008) avec un pourcentage qui ne dépasse pas le 7, 93 %, ce constituant était absent dans les résultats de l'étude de Tigrine *et al.* (2011). Le taux du L-Camphor est également plus élevé dans notre étude (19.00 %), que celui obtenu par Giordani (2008) et Tigrine *et al.* (2011) qui ont noté des pourcentages de 12,56 et 9.14% successivement.

Pour l'huile d'eucalyptus, le constituant principal étant un monoterpène, le P-Cymene, qui représente 17,45 % de la composition de l'huile, suivi du Spathulenol (13,45 %), le Trans-Farnesol (5,37 %) et l'Alpha.-Pinene (4, 41 %).

Gakuubi *et al.* (2017), et dans une huile essentielle d'*E. camaldulensis* collectée en 2015 de Kenya, entre octobre et novembre ont trouvé comme constituants principaux : le 1,8-cineole (16.2%), le α -pinene (15.6%), et le α -phellandrene (10%). Le taux du α -pinene trouvée dans notre étude est environ 3 fois moins que celui trouvée dans cette étude sur la même espèce.

Pour l'huile d'Origan, le constituant principal est un composé phénolique, le Carvacrol, qui représente un taux très élevé, de l'ordre de 46,82 % de la composition de l'huile, suivi du Gamma.-Terpinene (11,32 %), le groupe Cymol, Cymene, Thymene (10,09 %), le P-Cymene (6,96 %).

Des études rapportées dans la littérature, réalisées sur cette espèce végétale, ont montré que les huiles essentielles d'*Origanum floribundum Munby*, contiennent principalement du carvacrol (Benjilali *et al.*, 1986 ; Houmani *et Abed* , 1999).

Baser *et al.* (2000), révèlent que les principaux composés dans l'huile essentielle d'*Origanum floribundum Munby* récolté de Chrea (Blida), sont essentiellement représentés par le carvacrol (40 %), le linalool (16.1 %), le p-cymène (12.4 %) et γ -terpinène (12.2 %).

En Italie, Tomaino *et al.* (2004), cité in Ksouri (2015), ont enregistré comme constituants majeurs d'*Origanum floribundum Munby*, le carvacrol (48.9 %), le p-cymene (11.7 %) et le thymol (5.03 %).

En comparant nos résultats à ceux de ces travaux, on note que l'huile essentielle d'origan testée dans notre étude, originaire de Guelma, est plus riche en Carvacrol (46.82 %) que celle originaire de Blida (40 %), mais légèrement moins riche en ce composé que celle originaire de l'Italie (48.9 %). Notre huile contient des teneurs inférieures en P-Cymene (6,96 %), par rapport aux huiles originaires de Blida (12.4 %) et celles originaires de l'Italie (11.7 %), utilisées dans les travaux cités ci-dessus.

Le Carvacrol est un constituant qui a été également détecté dans l'huile de *Rosmarinus officinalis*, mais à une teneur faible, de l'ordre de 0,36 %, et dans l'huile d'eucalyptus, à une teneur de 1, 59 %. Djeddi *et al.* (2007), ont signalé que la teneur en Carvacrol dans des échantillons de romarin collectés du parc nationale d'El Hamma (région sub-humide du Nord algérien), était de l'ordre de 0.02 %.

Laghchimi *et al.*, (2014), signalent que le Carvacrol est également le constituant principal (57,9 %) de l'huile des fleurs sèches la lavande (*Lavandula officinalis*), qui a montré une activité antifongique importante contre *Alternaria* sp., *Penicillium expansum* et *Rizopus stolonifer*.

Ces variations rencontrées dans la composition chimique des huiles essentielles, du point de vue qualitatif et quantitatif, peuvent être dues à certains facteurs écologiques, à la partie de la plante utilisée, à l'âge de la plante et à la période du cycle végétatif, ou même à des facteurs génétiques (Laghchimi *et al.*, 2014).

Selon Bouterfas *et al.* (2016), la composition et l'effet antifongique des huiles essentielles sont très influencés par la localité d'échantillonnage.

3.3. Evaluation de l'activité antifongique des huiles essentielles testées

3.3.1 Activité des huiles testées sur la croissance mycélienne des souches fongiques étudiées

3.3.1.1. Résultats obtenus pour la technique de contact direct à travers des puits

Les résultats du test de confrontation par contact direct à travers des puits des huiles essentielles de *Rosmarinus officinalis*, *Eucalyptus camaldulensis* et *Origanum floribundum* sur la croissance mycélienne de *Botrytis cinerea*, *Zymoseptoria tritici* et *Fusarium roseum* sont représentés dans les figures 11, 12 et 13, respectivement :

➤ Effets des huiles testées sur *Botrytis cinerea*

Les résultats obtenus pour le test *in vitro* de l'activité des huiles étudiées sur la croissance mycélienne de *Botrytis cinerea* (Fig : 11), montrent que l'effet des huiles testées sur la croissance mycélienne du champignon, varie considérablement en fonction du type et des concentrations de l'huile testée.

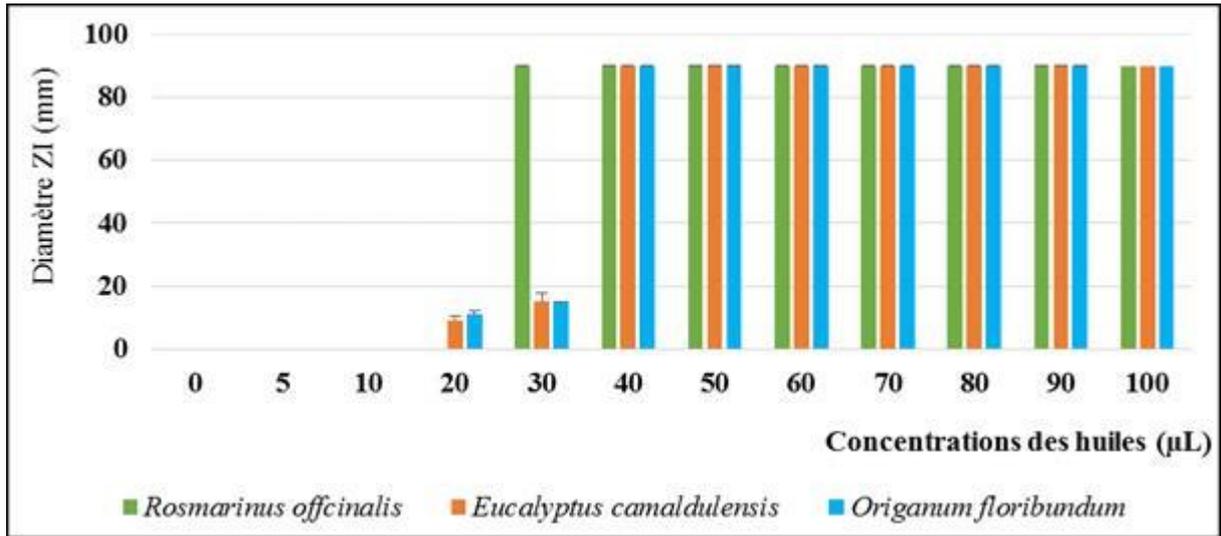


Figure 11 : Résultats du test de confrontation par contact direct des puits de *Botrytis cinerea* x Huiles essentielles testées

L'examen des résultats obtenus après 5 jours de culture du champignon phytopathogène, confronté aux huiles testées, a permis de soulever les constatations suivantes :

- Aucune zone d'inhibition de la croissance mycélienne du *Botrytis cinerea* n'a été observée pour les concentrations 5 et 10 µL/puit, et ce pour les trois huiles testées, la croissance du champignon a eu lieu de façon similaire à celle du témoin (0 µL/puit d'huile).
- A une concentration de 20 µL/puit, des zones d'inhibition ayant des diamètres inférieurs à 20 mm ont été observées dans les boîtes contenant l'huile essentielle d'eucalyptus et d'origan, alors que pour les boîtes contenant l'huile essentielle du romarin, aucune inhibition de la croissance n'a été observée.
- A une concentration de 30 µL/puit, des zones d'inhibition, de grandeurs très proches de celles notées à la concentration de 20 µL/puit (inférieurs à 20 mm), ont été notées pour les huiles essentielles d'eucalyptus et d'origan, alors que pour l'huile de romarin une inhibition complète de la croissance a été notée pour cette concentration.
- A des concentrations supérieures ou égales à 40 µL/puit, la croissance de *Botrytis cinerea* est inhibée par les trois huiles testées (Fig. 11).

Ces résultats montrent que les huiles essentielles testées ont une activité antifongique importante sur *Botrytis cinerea*, et l'huile d'*Origanum floribundum*, semble être une huile à activité forte, car elle a enregistré un diamètre de la zone d'inhibition plus élevé que ceux

enregistrés pour les autres huiles à la plus faible concentration, montrant une activité antifongique positive sur le champignon (20 µL/puit).

Cette activité est peut-être due au Carvacrol qui est un composé majoritaire de l'huile de l'origan (46.82%), et n'est pas uniquement le composé majoritaire des HE qui sont responsables de cette activité, mais il peut y avoir aussi d'autres composés minoritaires qui peuvent interagir d'une façon synergique ou antagoniste pour créer un système efficace vis-à-vis des radicaux libres. La présence de carvacrol même à faible concentration dans l'huile essentielle de *Rosmarinus officinalis* peut expliquer l'activité antifongique (Laib, 2012).

Hmiri *et al.* (2011), révèlent que le *Botrytis cinerea*, champignon responsable de pourritures, ainsi que d'autres espèces fongiques (*Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger*, *Fusarium culmorum*, *Fusarium oxysporum* et *Trichoderma* sp.) sont tous sensibles à l'huile essentielle de la menthe pouliot.

Camele *et al.* (2012), ont montré que la croissance du mycélium de *Botrytis cinerea*, en présence de certaines molécules actives composantes des huiles essentielles d'origine végétale, était totalement inhibée par le citral et le Carvacrol, à une concentration de 250 ppm, et par le thymol, à 150 et 250 ppm.

➤ ***Effets des huiles testées sur Zymoseptoria tritici***

Les résultats relatifs au test *in vitro* de l'activité des huiles étudiées sur la croissance mycélienne de *Zymoseptoria tritici* sont représentés dans la figure 12.

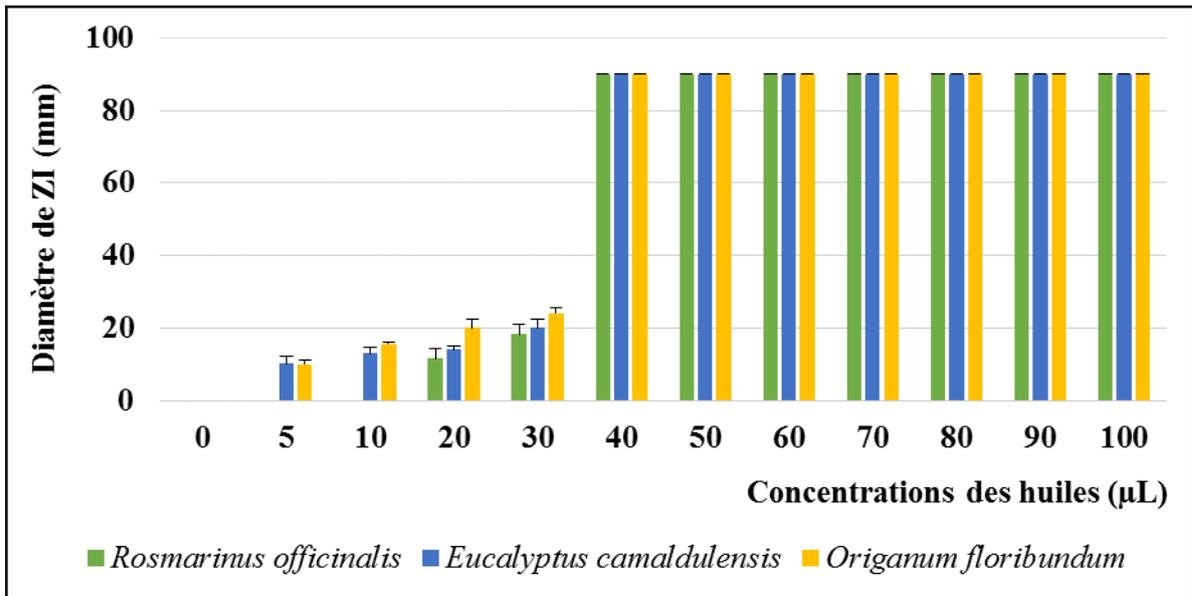


Figure 12 : Résultats du test de confrontation par contact direct à travers des puits de *Zymoseptoria tritici* x Huiles essentielles testées

L'examen des résultats obtenus, a fait ressortir les données suivantes :

- Les huiles d'eucalyptus et d'origan, ont montré une activité antifongique même à des doses faibles (5 µL/puit et 10 µL/puit), et ont induits la formation de zones d'inhibition ayant des diamètres inférieures à 20 mm ; alors que pour l'huile de romarin, l'activité antifongique n'a été détectée qu'à des concentrations supérieures ou égales à 20 µL/puit.

- A des concentrations inférieures ou égales à 30 µL/puit, les huiles ayant montré une activité positive, le diamètre de la zone d'inhibition est inférieur à 40 mm, mais ces diamètres sont très importants de point de vue activité antifongique des huiles.

- A des concentrations supérieures ou égales à 40 µL /puit, une inhibition complète de la croissance mycélienne de ce champignon a été observée et ce pour les trois huiles testées.

- Les huiles d'eucalyptus et d'origan, semblent avoir une activité antifongique plus élevée par rapport a l'huile de romarin.

➤ *Effets des huiles testées sur Fusarium roseum*

Les effets de différentes concentrations des huiles essentielles testées sur la croissance mycélienne de *Fusarium roseum* sont affichés dans la figure 13.

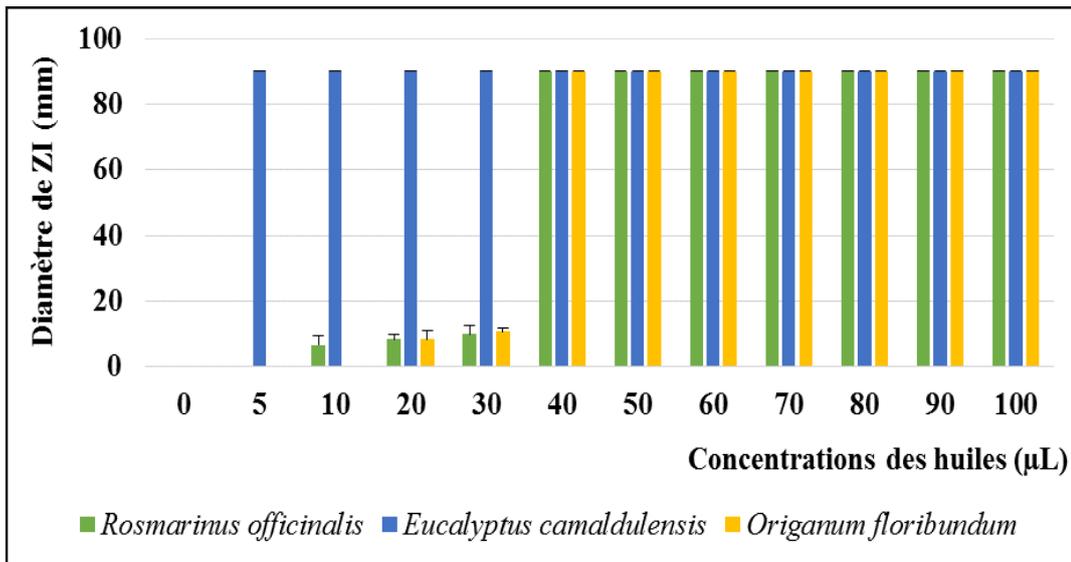


Figure 13 : Résultats du test de confrontation par contact direct des puits de *Fusarium roseum* x Huile essentielle testées

Les résultats obtenus, ont permis de noter les effets suivants :

- A la concentration de 5 µL /puit, seul l'huile essentielle d'eucalyptus, a montré une activité antifongique sur le champignon étudié, et une inhibition complète de la croissance mycélienne du champignon a été notée à cette concentration, ce qui laisse supposer que cette huile a une très forte activité contre *Fusarium roseum*, et agit même à de faibles doses.

- A la concentration de 10 µL /puit, une activité antifongique plus ou moins modérée a été notée pour l'huile de romarin, et une zone d'inhibition d'un diamètre inférieur à 10 mm a été observée.

- A 20 µL /puit, une activité antifongique a été notée pour les trois huiles y compris l'huile d'origan, mais les valeurs enregistrées pour l'huile de romarin et d'origan sont plus ou moins faibles, les diamètres notés sont respectivement, 6, 6 mm et 10 mm.

- A 30 µL /puit, toutes les huiles testées ont montré une activité antifongique : une inhibition complète de la croissance est notée pour l'huile d'eucalyptus, et des diamètres de la zone d'inhibition de l'ordre de 8.3 mm et 10.6 mm ont été enregistrés, respectivement pour l'huile de romarin et d'origan

- A des concentrations supérieures ou égales à 40 µL /puit, une inhibition totale de la croissance de *Fusarium roseum* a été notée pour les trois huiles testées.

Ces résultats laissent supposer que *Fusarium roseum* est très sensible à l'huile d'eucalyptus, et sa croissance est inhibée même à de faibles concentrations. L'huile d'origan semble avoir une activité plus intense que celle de l'huile du romarin contre ce pathogène.

Cette différence du pouvoir antifongique des huiles essentielles, peut être attribuée à leurs compositions chimiques ; en effet, la composition d'huile d'eucalyptus est dominée par le P-Cymène (17.45%) et le Spathulenol (13.45 %), qui semblent être très actifs sur ce pathogène.

Hmiri *et al.* (2011), rapportent que des travaux réalisés par des huiles essentielles d'*E. camaldulensis*, originaire de Taiwan ont mis en évidence le pouvoir antifongique de ces huiles vis-à-vis de des espèces fongiques. Cependant, l'huile essentielle d'*Eucalyptus* sp. originaire de la Chine a été inactive vis-à-vis d'*A. alternata* ; cette inactivité peut être attribuée à la composition chimique de cette huile.

Les mêmes auteurs, révèlent que, l'activité antifongique des huiles essentielles d'*E. camaldulensis* riches en 1,8-cinéole serait due au moins partiellement à l'action de ce monoterpène ; et que les mécanismes d'action des monoterpènes sur l'inhibition de la croissance des cellules fongiques et végétale restent encore obscurs malgré les nombreux travaux sur les effets inhibiteurs des monoterpènes sur les plantes. Cependant, de tous les effets possibles des monoterpènes sur les membranes biologiques, les effets délétères sur les membranes mitochondriales devraient provoquer une inhibition du métabolisme énergétique mitochondrial, ce qui entraîne des perturbations dans un large éventail des processus physiologiques et biochimiques dans la cellule. Certains travaux ont montré que la pulégone et le 1,8-cinéole purs provoquent une inhibition de la croissance mycélienne, mais à des concentrations plus élevées que les huiles essentielles dans leur totalité ; ainsi l'activité de l'huile essentielle est le résultat de ses composés majoritaires et aussi de l'effet synergique des composés minoritaires (Farah *et al.*, 2001 ; Hmiri *et al.*, 2011).

3.3.1.2. Résultats obtenus pour la technique de micro-atmosphère 01 (Fumigation 01)

➤ *Effets des huiles testées sur Zymoseptoria tritici*

Les résultats présentés dans la figure 14, exprimant le pourcentage d'inhibition de la croissance mycélienne, montrent que par cette technique, qui indique l'effet antifongique des huiles essentielles à travers leurs molécules volatiles, l'activité antifongique des trois huiles testées semble être plus élevée par rapport à leurs effets par contact direct.

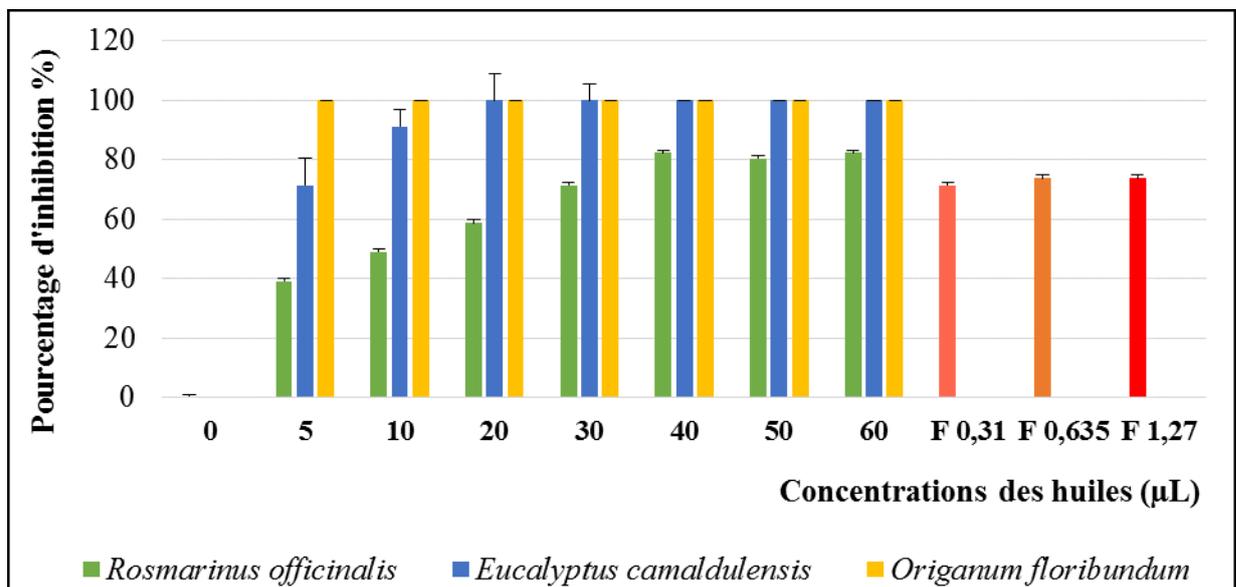


Figure 14 : Résultats du test de confrontation par la méthode de fumigation 01 de *Zymoseptoria tritici* x Huiles essentielles testées

Les constatations suivantes ont été notées :

- Toutes les huiles testées ont montré une activité antifongique contre *Zymoseptoria tritici*, un taux d'inhibition a été obtenu même à une concentration de 5 µL / disque. L'huile d'origan, caractérisée par son odeur forte a montré un taux d'inhibition de 100 % à cette concentration (5 µL / disque), suivi de l'huile d'eucalyptus, pour lequel nous avons noté un taux d'inhibition au voisinage de 70 % pour cette concentration. L'huile romarin semble être moins efficace par rapport aux deux autres huiles et a enregistré un taux d'inhibition de l'ordre de 40 %, à cette même concentration.

- Plus la concentration des huiles s'élève, plus l'effet antifongique devient plus remarquable, et ce pour les trois huiles testées. Une inhibition de l'ordre de 100 % a été notée pour l'huile d'origan à partir de la concentration de 5 µL/disque, et à partir de la concentration de 20 µL/disque, pour l'huile d'eucalyptus, cependant l'huile de romarin semble être moins efficace et a enregistré une inhibition de l'ordre de 80 % aux concentrations supérieures ou égales à 40 µL/disque.

- Le fongicide testé et utilisé comme témoin positif (Tubéconazole à 12.7% + Prothioconazole à 12.7%), a enregistré un taux d'inhibition au voisinage de 80 % (Fig. 14), et ce pour les trois doses des matières actives de fongicides testées (0.31, 0.635 et 1.27 µg/mL. Ceci permet de déduire qu'à des concentrations supérieures à 40 µL/disque, les huiles essentielles testées ont montré une activité antifongique supérieure à celle du fongicide testé, utilisé pour lutter contre la tache septorienne des feuilles du blé.

Les valeurs obtenues du test de détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) pour *Zymoseptoria tritici*, en confrontation avec les huiles testées sont affichées dans le tableau 08.

Tableau 08 : CMI de *Zymoseptoria tritici*, confronté aux différentes huiles testées

Huiles essentielles	Doses (µl/ml d'air)	Inhibition de croissance en (%)	CMI (µL/disque)
<i>Rosmarinus officinalis</i>	0,75	> 93.24	> 60
<i>Eucalyptus camaldulensis</i>	0,25	100	20
<i>Origanum floribundum</i>	0,062	100	5

➤ *Effets des huiles testées sur Fusarium roseum*

Les résultats de confrontation de *Fusarium roseum* aux trois huiles essentielles testées sont représentés dans la figure 15.

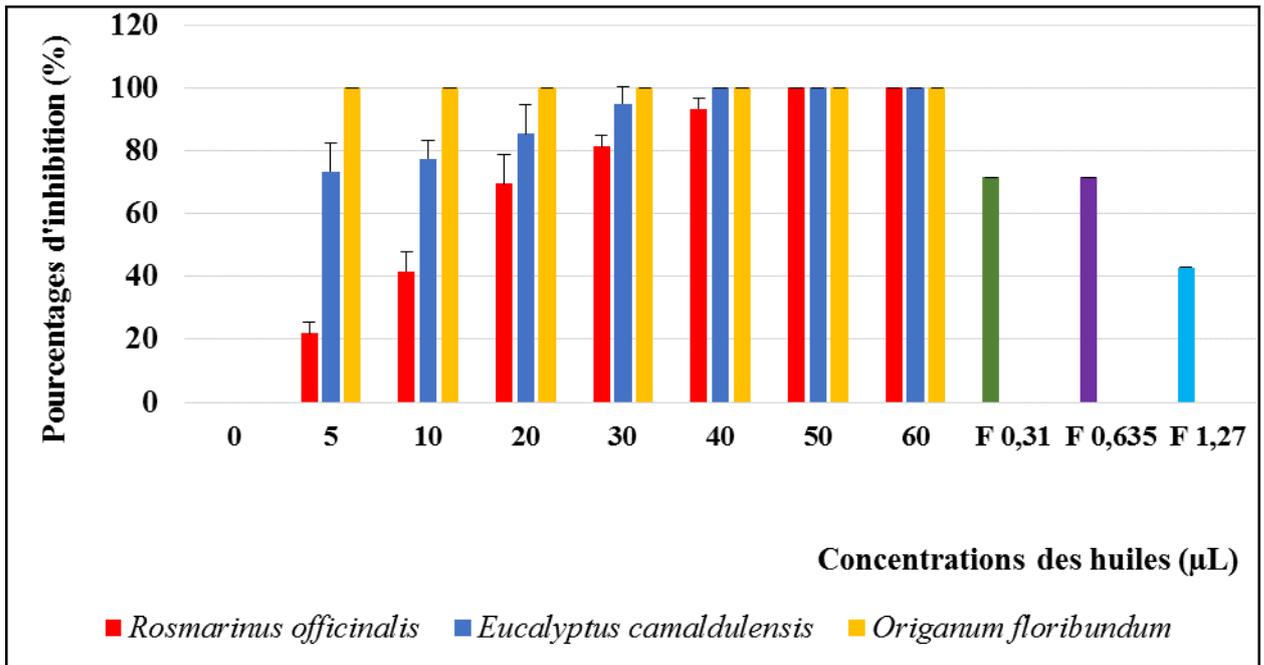


Figure 15 : Résultats du test de confrontation par la méthode de fumigation 01 de *Fusarium roseum* x Huiles essentielles testées

L'examen des résultats obtenu pour *Fusarium roseum* ont permis de noter les observations suivantes :

- A la concentration de 5μL/disque, toutes les huiles testées ont montré une activité antifongique à l'égard de ce champignon, l'huile de l'origan a montré une inhibition complète de la croissance du champignon à cette dose, l'huile d'eucalyptus a enregistré un taux d'inhibition supérieur à 60 % et l'huile de romarin a enregistré un taux d'inhibition plus ou moins faible, au voisinage de 20 %.

- Au fur et à mesure que la concentration en huile augmente, le taux d'inhibition de la croissance de ce champignon, s'élève, l'inhibition complète est obtenue à la concentration de 5μL/disque, pour l'huile d'origan, à la concentration de 40 μL/disque, pour l'huile d'eucalyptus, et à la concentration de 50 μL/disque, pour l'huile de romarin.

En comparant l'effet antifongique des trois huiles essentielles testées, à l'effet du fongicide utilisé comme témoin positif (Tubéconazole à 12.7% + Prothioconazole à 12.7%), nous remarquons que les huiles essentielles testées ont enregistré une activité supérieure à celle enregistrée pour la dose recommandée du fongicide (0.635 μL/mL), pour des concentrations d'huile supérieures ou égales à 30 μL/disque, pour toutes les huiles, et pour

des concentrations supérieures ou égales à 10 µL/disque, pour les huiles d'eucalyptus et de romarin (Fig. 15).

Les valeurs obtenues du test de détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) pour *Fusarium roseum*, en confrontation avec les huiles testées sont affichées dans le tableau 09.

Tableau 09 : CMI de *Fusarium roseum*, confronté aux différentes huiles testées

Huiles essentielles	Doses (µl/ml d'air)	Inhibition de croissance en (%)	CMI (µL/disque)
<i>Rosmarinus officinalis</i>	0,625	100	50
<i>Eucalyptus camaldulensis</i>	0,5	100	40
<i>Origanum floribundum</i>	0,062	100	5

➤ *Effets des huiles testées sur Botrytis cinerea*

Nous tenons à rappeler que, pour *Botrytis cinerea* confronté aux trois huiles testées, par la méthode de fumigation, nous avons remarqué la formation de deux cercles concentriques au voisinage des disques imbibées d'huile ; ces cercles traduisent l'effet inhibiteur des huiles testées sur le champignon phytopathogène, qui s'exprime par la formation d'un halo au voisinage de la molécule active. Le premier halo, noté pour *Botrytis cinerea* est un halo ayant la couleur du milieu de culture (PDA) et ne montrant aucune croissance du champignon, et qui correspond à une zone d'inhibition complète de la croissance, alors qu'autour de cette zone nous remarquons la formation d'une autre zone, formée par un mycélium blanc rasé, cette zone correspond à une zone d'inhibition de la formation des fructifications fongiques (Fig. 16 et 17)

La figure 16, qui affiche le diamètre « interne » de la zone d'inhibition, qui traduit l'importance de l'halo formé, et l'inhibition complète de la croissance fongique au voisinage de l'huile, montre que :

- Pour la concentration de 5 µL/disque, un halo de diamètre de 10 mm a été enregistré pour l'huile l'huile d'origan et l'huile d'eucalyptus, et aucun halo n'a été observé pour l'huile romarin à cette dose.

- Pour la concentration 10 $\mu\text{L}/\text{disque}$, l'huile d'eucalyptus a montré un pouvoir inhibiteur plus important que celui de l'huile d'origan, et l'huile de romarin n'a montré aucun effet à cette dose également.

- L'effet inhibiteur de l'huile de romarin n'a été observé qu'à partir de la dose 20 $\mu\text{L}/\text{disque}$.

- Au-delà de la concentration 40 $\mu\text{L}/\text{disque}$, le diamètre de la zone d'inhibition devient de plus en plus important et une inhibition complète de la croissance a été notée pour l'huile d'origan à partir de la concentration 50 $\mu\text{L}/\text{disque}$, et pour l'huile d'eucalyptus à partir de la concentration 60 $\mu\text{L}/\text{disque}$.

L'activité du fongicide testé (Fosétyl-Aluminium à 80 %) s'est révélée moyenne, et il a enregistré un taux d'inhibition de l'ordre de 50 % pour les trois doses testées (Fig. 16). Ce qui permet de déduire que les huiles essentielles d'origan et d'eucalyptus, ont enregistré une activité antifongique plus élevée que le témoin positif aux doses testées.

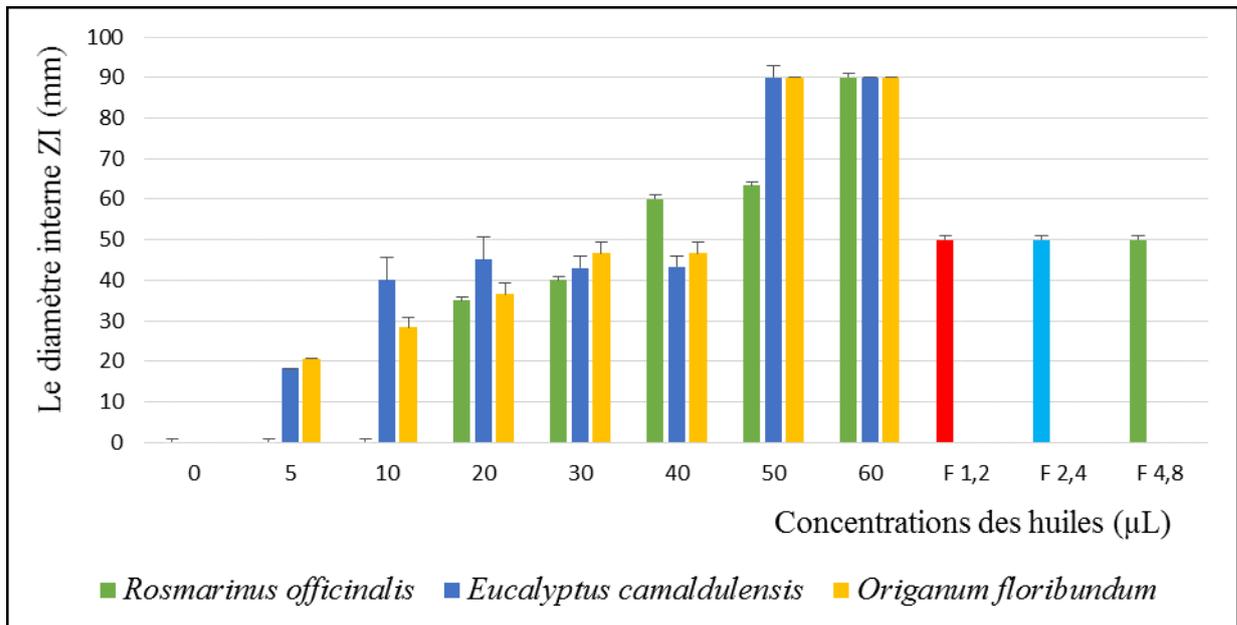


Figure 16 : Résultats du test de confrontation par la méthode de fumigation 01 de *Botrytis cinerea* x Huiles essentielles testées (Diamètre Interne)

La figure 17, qui affiche l'inhibition « partielle » de la croissance de *Botrytis cinerea*, par inhibition de la formation des structures fongique, a montré que le diamètre de cette zone « diamètre externe », a suivi le même rythme que celui du diamètre interne, de point de vue

son apparition, d'où il n'a été détecté pour l'huile de romarin qu'à partir de la concentration de 20 µL/disque, et il augmente avec l'élévation des concentrations en huile essentielle ; il atteint un diamètre qui dépasse 80 mm pour l'huile d'origan et d'eucalyptus, à partir de la concentration de 50 µL/disque.

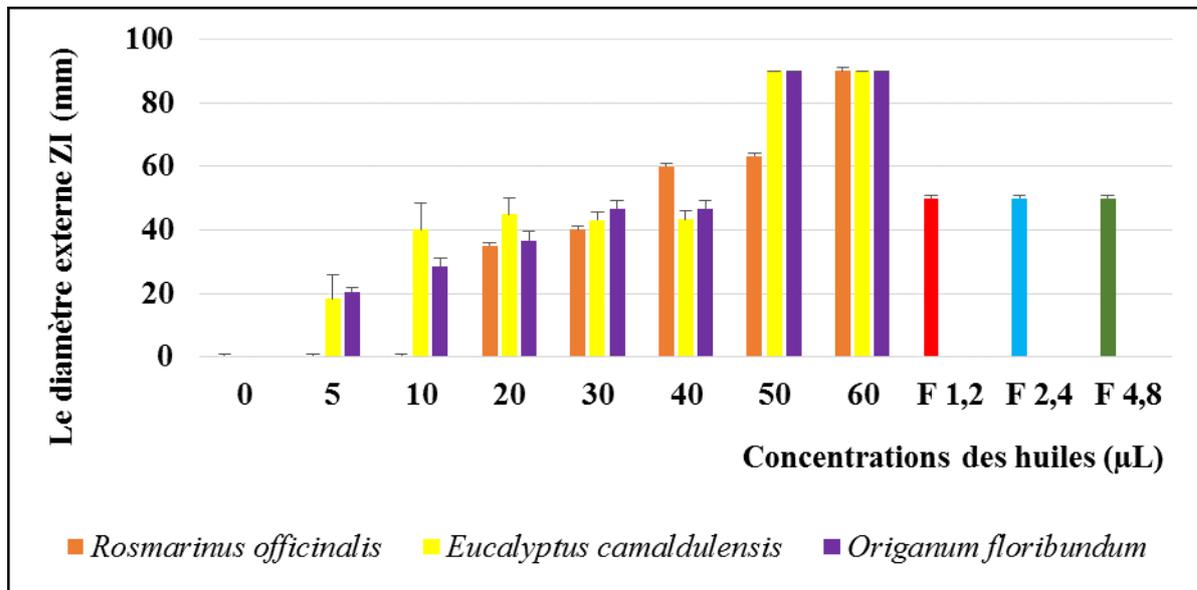


Figure 17 : Résultats du test de confrontation par la méthode de fumigation 01 de *Botrytis cinerea* x Huiles essentielles testées (Diamètre Externe)

Les valeurs obtenues du test de détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) pour *Botrytis cinerea*, en confrontation avec les huiles testées sont affichées dans le tableau 10.

Tableau 10 : CMI de *Botrytis cinerea*, confronté aux différentes huiles testées

Huiles essentielles	Doses (µl/ml d'air)	Inhibition de croissance en (%)	CMI (µL/disque)
<i>Rosmarinus officinalis</i>	0,75	71.42	> 60
<i>Eucalyptus camaldulensis</i>	0,75	100	60
<i>Origanum floribundum</i>	0,75	100	60

3.3.1.3. Résultats obtenus pour la technique de micro-atmosphère 02 (Fumigation 02)

Les résultats obtenus pour ce test, qui n'a concerné que *Botrytis cinerea*, confronté à l'huile de romarin, sont représentés dans la figure 18.

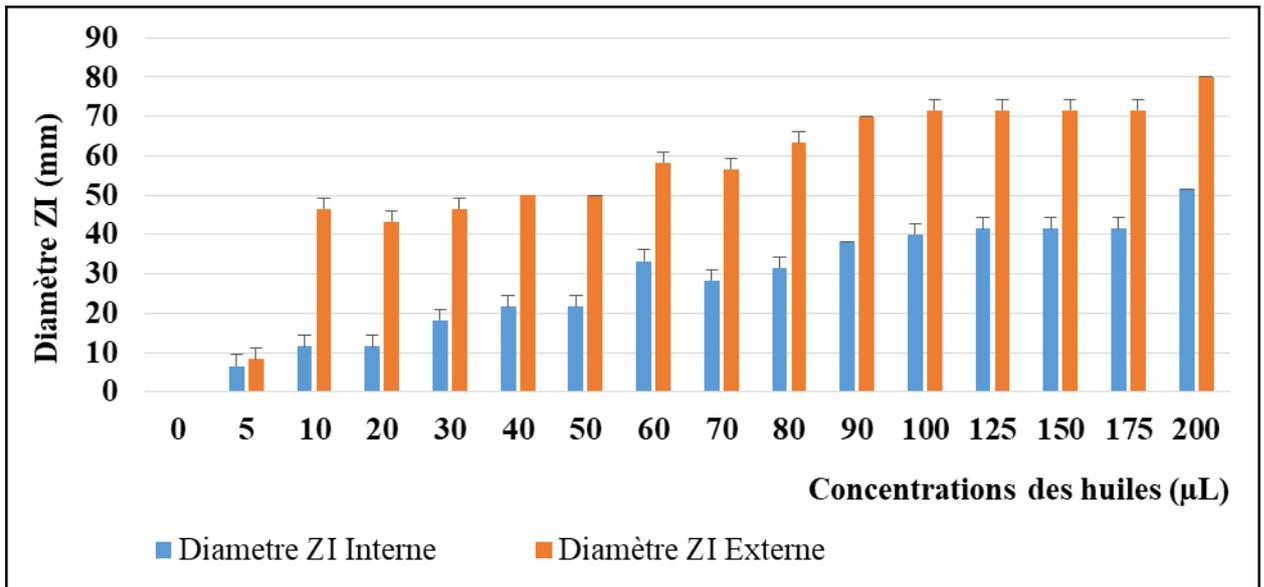


Figure 18 : Résultats du test de confrontation par la méthode de fumigation 02 de *Botrytis cinerea* x Huile essentielle de romarin

Pour cette méthode de fumigation, nous avons également noté la formation de deux cercles concentriques, un halo de la couleur du milieu, caractérisé par une absence totale de la croissance du champignon au voisinage de l'huile, et un deuxième cercle formé par un mycélium blanc rasé, à partir duquel des fragments de mycélium observés au microscope optique ont montré une altération du développement des structures fongiques.

La figure 18 montre que, aussi bien, la zone d'inhibition « diamètre interne », que la zone d'altération de la croissance « diamètre externe », augmentent avec l'élévation de la concentration en l'huile testée.

Les valeurs obtenues du test de détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) pour *Botrytis cinerea*, en confrontation avec l'huile de romarin sont affichées dans le tableau 11.

Tableau 11 : CMI de *Botrytis cinerea*, confronté à l'huile de romarin

Huiles essentielles	Doses (µl/ml d'air)	Inhibition de croissance en (%)	CMI (µL/disque)
<i>Rosmarinus officinalis</i>	2,5	> 40 ,47	> 200

3.3.2. Activité des huiles testées sur la germination des spores et la longueur des tubes germinatifs, des souches fongiques étudiées

Rappelons que ce test n'a été réalisé que pour le champignon phytopathogène, caractérisé par une croissance rapide ; confronté à deux huiles (huile d'eucalyptus et huile de l'origan), testées à trois concentrations (25, 50 et 75 µL/mL).

Les effets des différentes concentrations des huiles essentielles testées sur la germination des spores de *Botrytis cinerea*, sont illustrés sur la figure 19.

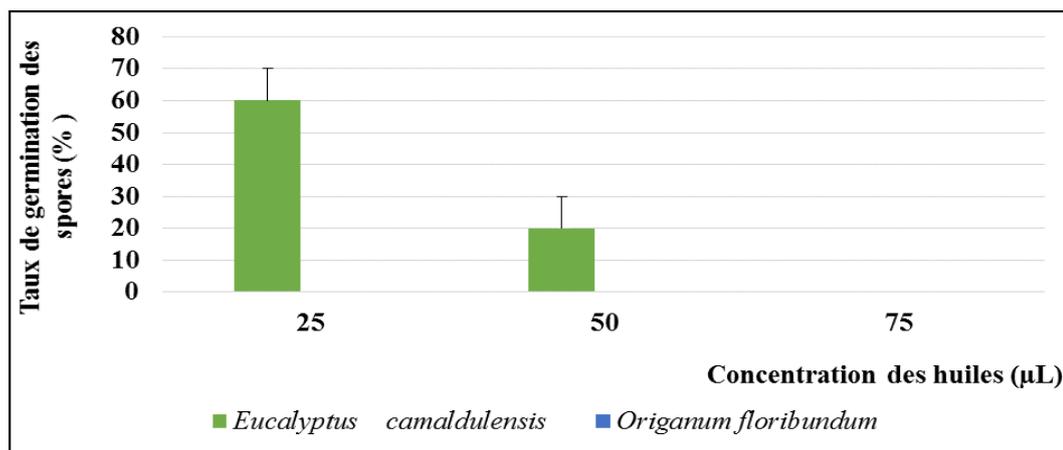


Figure 19 : Résultats du test de l'activité des huiles essentielles sur la germination des spores de *Botrytis cinerea*

A une concentration de 25 µL/mL, le taux de germination des spores était de l'ordre de 60 %, mais le taux a chuté à 20 % à la concentration de 50 µL/mL, et la germination est inhibée complètement à la concentration de 75 µL/mL, et ce pour l'huile d'eucalyptus ; pour l'huile de l'origan, une inhibition totale de la germination des spores a été obtenue pour les trois doses testées.

L'examen microscopique des structures fongiques formées après germination, a montré que pour des concentrations élevées de l'huile d'eucalyptus, les tubes germinatifs formés sont courts et déformés, alors que pour l'huile d'origan, un éclatement et une destruction des cellules fongiques ont été notées.

Des résultats similaires ont été obtenus par Daferera *et al.* (2003). Cette inhibition peut être liée à la composition chimique des huiles essentielles d'origan et d'eucalyptus, ayant comme constituants principaux, le carvacrol et le P-Cymène. Plusieurs études portant sur le genre *Origanum* ont montré que ces huiles possèdent une forte activité antimicrobienne, et qui est attribuée à leur teneur élevée en composés phénoliques, spécifiquement le carvacrol, le thymol, le p-cymène et leur précurseur c-terpinène.

Adebayo *et al.*, 2013 ont rapporté que les huiles essentielles de d'origan et de monarda, inhibaient la germination des spores et la croissance mycélienne de *B. cinerea* à des concentrations plus élevées de 150 et 200 µg / mL.

3.4. Etude de la nature de la fongitoxicité des huiles essentielles testées à l'égard des souches fongiques étudiées

L'étude de la nature de la fongitoxicité des huiles essentielles testées à l'égard des champignons étudiés et la détermination des valeurs de CMI et CMF des HEs et des fongicides, a été réalisée par la technique de micro dilution.

Le tableau 12 récapitule tous les résultats des valeurs de la concentration minimale inhibitrice et des valeurs de la concentration minimale fongicide qui ont été enregistrées pour les trois huiles testées, et pour les fongicides, et ce pour les trois champignons utilisés.

La concentration minimale inhibitrice (CMI), la plus faible (0,2 µL/mL) a été notée pour les huiles essentielles d'eucalyptus et d'origan, pour *Zymoseptoria tritici* et *Fusarium roseum*. Cette CMI était très proche de celle du fongicide testé contre les mêmes champignons (1,95 µL/mL). Par contre la plus grande CMI (3,9 µL/mL) a été notée pour le *Botrytis cinerea*, confronté à l'huile de romarin. Pour les concentrations minimales fongicides, nous

avons noté les mêmes concentrations des CMI pour toutes les huiles, et ce pour les trois champignons étudiés (Tab. 12).

Tableau 12 : Concentrations minimales inhibitrices (CMI) et concentrations minimales fongicides (létales) (CMF) des HEs testées, et des fongicides, à l'égard des champignons étudiés

	CMI				CMF			
	<i>R. officinalis</i>	<i>O. floribundum</i>	<i>E. camaldulensis</i>	fongicide	<i>R. officinalis</i>	<i>O. floribundum</i>	<i>E. camaldulensis</i>	fongicide
<i>Botrytis cinerea</i>	3,9 µL/mL	0,45 µL/mL	0,45 µL/mL	0,45 µL/mL	3,9 µL/mL	0,45 µL/mL	0,45 µL/mL	0,45 µL/mL
<i>Fusarium roseum</i>	0,95 µL/mL	0,2 µL/mL	0,2 µL/mL	0,45 µL/mL	0,95 µL/mL	0,2 µL/mL	0,2 µL/mL	1,95 µL/mL
<i>Zymoseptoria tritici</i>	0,2 µL/mL	0,2 µL/mL	0,2 µL/mL	0,45 µL/mL	0,2 µL/mL	0,2 µL/mL	0,2 µL/mL	1,95 µL/mL

Conclusion

Le présent travail est une contribution à l'étude de l'effet antifongique des huiles essentielles de *Rosmarinus officinalis*, *Origanum flolibundum* et *Eucalyptus camaldulensis*, à l'égard de champignons phytopathogènes, et il a porté sur trois espèces fongiques : *Zymoseptoria tritici*, *Botrytis cinerea* et *Fusarium roseum*.

Les résultats obtenus ont montré que le rendement en huile essentielle d'*O. flolibundum* est significativement supérieur à celui obtenu par les deux autres espèces végétales (*R. officinalis* et *E. camaldulensis*). Un total de 41 constituants, ont été repérés dans l'huile essentielle d'eucalyptus (*Eucalyptus camaldulensis*), 37 constituants dans l'huile essentielle du romarin (*Rosmarinus officinalis*), et 26 constituants dans l'huile essentielle de l'Origan (*Origanum flolibundum*). Une grande variabilité a été notée dans la composition chimique des trois huiles essentielles testées.

Les tests de l'activité antifongique des huiles essentielles, réalisés par la méthode de contact direct, et la méthode de microatmosphère (fumigation), ont montré que par la méthode de fumigation, l'huile essentielle d'origan a enregistré une activité inhibitrice très élevée à l'égard de tous les champignons étudiés (*Z. tritici*, *F. roseum* et *B. cinerea*), et ce à partir de la plus faible concentration testées (5 µL/ disque), les taux d'inhibitions étaient de l'ordre de 100 % pour *Zymoseptoria tritici* et *Fusarium roseum*, pour cette faible concentration. L'huile d'eucalyptus a montré une activité antifongique similaire à celle de l'huile d'origan, à des concentrations supérieures à 20 µL/ disque, pour *Zymoseptoria tritici*, et supérieures à 40 µL/ disque, pour *Fusarium roseum*, Alors que *Botrytis cinerea*, semble être moins sensibles aux huiles d'eucalyptus et d'origan, car l'inhibition totale de la croissance n'a été observée qu'au-delà de la concentration de 50 µL/ disque. Par contre l'huile de romarin semble être moins active que les deux autres huiles testées, sur les champignons étudiés. Ces résultats permettent de déduire que la fraction volatile des composants de l'huile de romarin a effet moindre par rapport à celles des deux autres huiles, et plus particulièrement, celle de l'origan.

Par la méthode des puits, les trois huiles ont montré une activité importante contre les trois champignons étudiés, et ce pour des concentrations supérieures ou égales à 40 µL/ puit, parfois même à des concentrations plus faibles pour certaines huiles.

Les valeurs des CMI enregistrées, sont généralement faibles pour l'huile d'origan, moyennes pour l'huile d'eucalyptus et élevées pour l'huile de romarin.

La germination des spores et la formation des structures fongiques ont été très affectées par les huiles testées pour *Botrytis cinerea*. Des différences remarquables ont été notées entre les huiles testées et entre le témoin et les différentes concentrations pour chaque huile.

A la lumière de ces résultats, nous pouvons conclure que les trois huiles testées ont montré une activité antifongique élevée à l'égard des trois champignons étudiés, et leur utilisation dans le contrôle de ces champignons semble être une méthode de lutte à encourager.

D'autres études doivent être entreprises « *in vivo* » sur les mêmes huiles et les mêmes agents pathogènes, ainsi que sur d'autres extraits de plantes, et d'autres agents microbiens et ravageurs, afin de valoriser notre patrimoine national en plantes médicinales et aromatiques et les intégrer dans les programmes de lutte contre les maladies parasitaires, et les ravageurs des cultures, pour réduire l'utilisation des pesticides et minimiser leurs impacts et leurs effets non intentionnels sur l'environnement et sur la santé publique.

Résumé

Dans le but de rechercher des molécules naturelles à effet fongicide, ce travail a porté sur l'étude de l'activité antifongique de trois huiles essentielles de trois plantes aromatiques et médicinales de la flore algérienne *R. officinalis*, *O. floribundum*, *E. camaldulensis* obtenues par hydrodistillation des parties aériennes des plantes, vis-à-vis de trois champignons phytopathogènes : *B. cinerea*, *F. roseum* et *Z. tritici*. L'activité antifongique a été testée par différentes méthodes (contact direct et microatmosphère), en utilisant différentes concentrations des huiles testées. Un essai portant sur l'impact des huiles testées sur la germination des spores de *B. cinerea* a été également conduit avec l'huile d'eucalyptus et l'huile d'origan. Les résultats obtenus ont montré que les huiles essentielles testées ont montré une très bonne activité antifongique à l'égard des trois champignons phytopathogènes étudiés, notamment pour des concentrations supérieures à 40 µL/ puit ou /disque. Les huiles d'eucalyptus et d'origan ont montré une activité plus élevée que celle de l'huile romarin.

Mots clés : Les huiles essentielles, plantes médicinales ou aromatiques, champignons phytopathogènes, activité antifongique, lutte biologique.

Summary

In order to search of natural fungicide molecules, this work focused on the study of the antifungal activity of three essential oils of three plants and of Algerian flora *R. officinalis*, *O. floribundum* and *E. camaldulensis* obtained by distillation from the aerial parts of plants, against three plant pathogenic fungi : *B. cinerea*, *F. roseum*, and *Z tritici*. Antifungal activity was tested by different methods (direct contact and fumigation), using different concentrations of the tested oils. A test on the impact of studied oils on spore germination of *B. cinerea* was also conducted with *O. floribundum* and *E. camaldulensis* oils. The results showed that the tested essential oils have a very good antifungal activity against the three plant pathogenic fungi studied, especially for higher concentrations, up to 40 μL / well or disc. Oils of oregano and eucalyptus showed higher activity, than rosemary oil.

Key words: Oil essential, plant medicinal and aromatic, pathogenic fungi, antifungal activity, biology control.

المخلص

من أجل البحث عن الجزيئات الطبيعية التي لها تأثير على الفطريات، هذا العمل ركز على دراسة نشاط مضاد من ثلاث زيوت اساسية تم الحصول عليها من ثلاث نباتات عطرية و طبية من الطبيعة الجزائرية و هي *O. floribundum* *R. officinalis*, *E. camaldulensis* المتحصل عليها بتقنية التقطير البخار من الأجزاء الهوائية للنباتات ضد ثلاثة فطريات ممرضة للنبات : *B. cinerea* *F. roseum* *Z. tritici*.

تم اختبار نشاط مضاد للفطريات بواسطة طرق مختلفة (الاتصال المباشر و التدخين) و باستعمال تراكيز مختلفة و اختبار اخر على انبات ابواغ *B. cinerea* مع زيت الاوكالبتوس و الزعتر. هذه النتائج بينت لنا ان الزيوت الأساسية التي تم دراستها لها تأثير مهم و جيد على النشاط المضاد للفطريات المدروسة، وخاصة بالنسبة للتركيزات أعلى من 40 µL في القرص وأظهرت زيوت الأوكالبتوس و الزعتر نشاطاً أعلى من زيت إكليل الجبل.

الكلمات المفتاحية : الزيوت الاساسية ، النباتات الطبية و العطرية ، الفطريات ، النشاط المضاد للفطريات ، المكافحة البيولوجية.

Summary

In order to search of natural fungicide molecules, this work focused on the study of the antifungal activity of three essential oils of three plants and of Algerian flora *R. officinalis*, *O. floribundum* and *E. camaldulensis* obtained by distillation from the aerial parts of plants, against three plant pathogenic fungi : *B. cenirea*, *F. roseum*, and *Z tritici*. Antifungal activity was tested by different methods (direct contact and fumigation), using different concentrations of the tested oils. A test on the impact of studied oils on spore germination of *B. cenirea* was also conducted with *O. floribundum* and *E. camaldulensis* oils. The results showed that the tested essential oils have a very good antifungal activity against the three plant pathogenic fungi studied, especially for higher concentrations, up to 40 μL / well or disc. Oils of oregano and eucalyptus showed higher activity, than rosemary oil.

Key words: Oil, plant, fungi, antifungal activity, control.

Références bibliographiques

Livres, articles, thèses et mémoires

- **Abdoune M.A., 2013**, L'effet préventif de quelques huiles essentielles contre la croissance et la formation de biofilms de certains pathogènes de la cavité buccale, Mémoire pour l'obtention du diplôme de Magister en Biologie. Option : Maîtrise de la Qualité Microbiologique et du Développement Microbien, Université de Telemcen, 28p.
- **Adebayo O., Dang T., Bélanger A., Khanizadeh S., 2013**. Antifungal Studies of Selected Essential Oils and a Commercial Formulation against *Botrytis Cinerea*. *Journal of Food Research*. Vol. 2. N°1 : 217-227.
- **Adjou E.S. et Soumanou M., 2013**. Efficacité des extraits de plantes dans la lutte contre les moisissures toxigènes isolées de l'arachide en post-récolte au Bénin. *Journal of Applied Biosciences* 70 : 5555– 5566.
- **Aissani F., 2015**. Analyse sensorielle de la viande bovine additionnée aux huiles essentielles *Thymus ciliatus* (Zaitra) et *Ammoïdes verticillata* (Nunkha). Mémoire pour l'obtention du diplôme Master en Agronomie, option technologie des industries agroalimentaires, Département d'Agronomie, Université Aboubaker belkaid, Tlemcen : 76 p.
- **Alem-Etsouri M., Laala S., Abdelhamid T., et Louanchi M., 2016**. Etude de la diversité génétique de *Botrytis cinerea* agent de la pourriture grise de la vigne : morphotypes, résistance aux fenhexamides, pouvoir pathogène et marqueurs moléculaires. Laboratoire de Biologie des systèmes microbiens *ResearchGate*. vol. 7 : 32p.
- **Allioui N., 2015**. Structure et diversité génétique d'une population algérienne de l'agent causal de la septoriose du blé (*Zymoseptoria tritici/ Mycosphaerella graminicola*). Thèse de Doctorat en biologie végétale, option phytopathologie. Département de biologie, Université Badji Mokhtar, Annaba : 220 p.
- **Amarti F., Satrani B., Ghanmi M., Farah A., Aafi A., Aarab L., El Ajjouri M., et Chaouch A., 2010**. Composition chimique et activité antimicrobienne des huiles essentielles de *Thymus algeriensis* Boiss. & Reut. Et *Thymus ciliatus* (Desf.) Benth. du Maroc. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* 14(1) : 141-148.
- **Analia P., Ulrike N., et Alan J., 2013**. *In vitro* efficacy of garlic extract to control fungal pathogens of wheat. *Journal of Medicinal Plants Research*. 7(24) : 1809-1817.
- **Attou A., 2017**. Détermination de la Composition Chimique des Huiles Essentielles de quatre Plantes Aromatiques de l'Ouest Algérien (Région d'Ain Témouchent). Etude de Leurs

activités antioxydante et antimicrobienne, Thèse de Doctorat en Biologie, Option : Substances Naturelles, Activités Biologiques et Synthèse, Université Abou Bekr Belkaid, Tlemcen : 9 p.

- **Aouis N., 2015.** Etude chimique et biologique des huiles essentielles de coriandre, de fenouil et de persil. Thèse de Doctorat en chimie organique. Université d'Oran 01 : 239p.
- **Balouiri M., Sadiki M., et Saad Koraichi I., 2016.** Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity : Areview. *Journal of Pharmaceutical Analysis*. N°1 : 71–79.
- **Baser KHC., Körkçüoğlu MK., Houmani Z., et Abed., 2000.** Composition of the essential oil of *Origanum floribundum* Munby from Algeria. J. Essent. Oil. Res. Nov/Dec, 12 : 753-756.
- **Benabdelkrim N., 2013.** Contribution à l'étude du rendement et du pouvoir antimicrobien de l'huile essentielle de *Piturantho schloranthus* de la région de Biskra. Mémoire présenté en vue de l'obtention du diplôme de Master en Biologie. Option : Biochimie appliquée, Département de Biologie, Université Abou Bekr Belkaid – Tlemcen : 28p.
- **Benjlali B., Tantaoui-Elaraki A., Ismaili-Alaoui M., et Ayadi A., 1986.** Chemical polymorphism of Moroccan thyme essential oils : compounds characterization. *Sci. Aliments*. vol. 7 : 77-91.
- **Ben Sultane F., et Bahri F., 2017.** Activité antioxydante des huiles essentielles du gingembre (*Zingiber officinale*) et du clou de girofle (*Syzygium aromaticum*). Mémoire pour l'obtention du diplôme de Master, option : Analyses biologiques et biochimiques, Département de Biologie, Université de Djilali Bounaama, Khemis Miliana, Algérie, 57p.
- **Bouterfas K., Mehdadi Z., Aouad L., Elaoufi M., Khaled M.B. Latreche A., et Benchiha W., 2016.** La localité d'échantillonnage influence-t-elle l'activité antifongique des flavonoïdes de *Marrubium vulgare* vis-à-vis de *Aspergillus niger* et *Candida albicans*. *Journal de Mycologie Médicale*. N° 26 : 201-211.
- **Brada M., Saadi A., Wathelet JP., et Lognay G., 2012.** The Essential Oils of *Origanum majorana* L. and *Origanum floribundum* Munby in Algeria. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*. Vol. 15 : 497-502.
- **Bruneton J., 1993.** Pharmacognosie : phytochimie, plantes médicinales. *Tec & Doc*. Lavoisier, Paris : 915 p.
- **Camele I., Altieri L., Martino L., De Feo V., Mancini E., and Rana G., 2012.** In Vitro Control of Post-Harvest Fruit Rot Fungi by Some Plant Essential Oil Components. *Int. J. Mol. Sci.* 13, 2290-2300.

- **Camara B., Dick. E., Sako A., Kone D., Kanko C., Boye M.A.D., Ake S., et Anno A., 2010.** Lutte biologique contre *Deightonella torulosa* (Syd.) Ellis, par l'application des huiles essentielles d'*Eucalyptus platyphylla* F. Muell. et de *Melaleuca quinquenervia* L., volume : DOI 10.1007/s10298-010-0568-3, phytothérapie et écologie, Springer-Verlag France : 240-244.
- **Chemloul F., 2014.** Etude de l'activité antibactérienne de l'huile essentielle de *Lavandula officinalis* de la région de Tlemcen. Mémoire de fin d'étude pour l'obtention du diplôme de Master en Agronomie, option amélioration végétale Université Abou Bekr Belkaid, Tlemcen : 35 p.
- **Daferera D., Nziogas B., et Gpolissiou M., 2003.** The effectiveness of plant essential oils on the growth of *Botrytis cinerea* *Fusarium* sp. and *Clavibacter michiganensis* subsp. *Michiganensis*. *Crop protection*. Vol. 22 39-44p.
- **Dima A., 2014.** Eco-Extraction des huiles essentielles et des arômes alimentaires en vue d'une application comme agent antioxydant et antimicrobiens. Présentée pour obtenir le grade de Thèse de Doctorat en Sciences, Université d'Avignon et des pays de vaucluse France : 142p.
- **El Ajjouri M., Ghanmi M., Satrani B., Amarti F., Rahouti M., Aafi A., Ismaili MR., et Farah A., 2010.** Composition chimique et activité antifongique des huiles essentielles de *Thymus algeriensis* Boiss. & Reut. et *Thymus ciliatus* (Desf.) Benth. contre les champignons de pourriture du bois. *Acta Botanica Gallica*. 157 (2) : 285-294.
- **El haïb A., 2011.** Valorisation des terpènes naturels issus de plantes marocaines par transformations catalytiques. Thèse de Doctorat en biologie, option Chimie organique et catalyse, Département de biologie, Université Paul Sabatier, Toulouse III - France : 157 p.
- **El Kalamouni C., 2010.** Caractérisations chimiques et biologiques d'extraits de plantes aromatiques oubliées de Midi-Pyrénées. Thèse de Doctorat en Sciences des Agroressources. Univ. de Toulouse : 263 p.
- **Farah A., Satrani B., Fechtal M. ; Chaouch A. et Talbi M., 2001.** Composition chimique et activités antibactérienne et antifongique des huiles essentielles extraites des feuilles d'*Eucalyptus camaldulensis* et de son hybride naturel (clone 583). *Acta Bot. Gallica*, 148 (3) : 183-190.
- **Gbogbo K., Batawila K., Anani K., Prince-David M., Gbéassor M., Bouchet P., et Akpagana K., 2013.** Activité antifongique des huiles essentielles de *Ocimum basilicum* L. (Lamiaceae) et *Cymbopogon schoenanthus* L. Spreng. (Poaceae) sur des micromycètes influençant la germination du Maïs et du Niébé. *Acta Bot. Gallica*. 153 (1) : 115-124.

- **Gakuubi M.M.; Maina A.W. and Wagacha J.M. 2017.** Antifungal Activity of Essential Oil of *Eucalyptus camaldulensis* Dehnh. against Selected *Fusarium* spp. *International Journal of Microbiology.* : 7p.
- **Hajji F., El Idrissi A., Fkih-Tetouani S., et Bellakhdar J., 2012.** Étude des compositions chimiques de quelques espèces d'*Eucalyptus* du Maroc. Al Biruniya, *Rev. Mar. Pharm.* 5 (2) : 125-132.
- **Hamdani F., 2016.** Déterminisme moléculaire de l'activité antifongique des huiles essentielles extraites à partir des feuilles d'agrumes, Thèse de Doctorat en biologie, option agronomie, Université Hassiba Ben bouali, Chlef : 144 p.
- **Hmiri S., Rahouti M., Habib Z., Satrani B., Ghanmi M. et EL Ajjouri M., 2011.** Evaluation du potentiel antifongique des huiles essentielles de *mentha pulegium* et d'*eucalyptus camaldulensis* dans la lutte biologique contre les champignons responsables de la détérioration des pommes en conservation. Bulletin de la Société Royale des Sciences de Liège, Vol. 80 : 824 – 836.
- **Janicke Ch., Grunwald J., et Boccador S., 2006.** Le guide de phytothérapie. Collection Médecine naturelle. Editeur Marabout, Broché : 406p.
- **Kaloustian J., et Hadji-Minaglou F., 2012.** La connaissance des huiles essentielles : Qualitologie et aromathérapie entre science et tradition pour une application médicale raisonnée, Springer- verlag, Paris-France : 17-160.
- **Kerbouche L., 2017.** Composition chimique et activite biologique des huiles essetielles de quelques plantes des familles de labiacees et de curpressacees. En vue de l'obtention du diplôme de magister en science agronomique, option : sciences alimentaires departement de technologie alimentaire. Ecole superieure agronomique –El-harrach, Alger, Algerie : 133p.
- **Ksouri S., 2015.** Situation épidémiologique des mammites mycosiques chez le bovin laitier dans deux régions de l'est-Algérien et étude de l'efficacité *in vitro* des huiles essentielles des plantes aromatiques sur des isolats fongiques. Thèse de Doctorat en biologie option : Sciences vétérinaires. Universite d'El-Taraf : 224p.
- **Labiod R., et Aouadi S., 2016.** Valorisation des huiles essentielles et des extraits de *Satureja calamintha nepeta* : activité antibactérienne, activité antioxydante et activité fongicide. Présentée en vue de l'obtention du diplôme de Doctorat en biochimie, option biochimie appliquée, Département de Biochimie, Universite Badji Mokhtar-Annaba : 128 p.

- **Laghchimi A., Znini M., Majidi L., Renucci F., El Harrak et A., Costa J., 2014.** Chemical composition and effect of liquid and vapor phase of *Lavandula multifida* essential oil on mycelial growth of fungi responsible for the rot of apple. *J. Mater. Environ. Sci.* 5 (6) : 1770-1780.
- **Laib I., 2001.** Etude des activités antioxydante et antifongique de l'huile essentielle des fleurs sèches de *Lavandula officinalis* : application aux moisissures des légumes secs, *Nature & Technologie*. N° 7 : 44 – 52.
- **Laib I., 2012.** Etude des activités antioxydante et antifongique de l'huile essentielle des fleurs sèches de *Lavandula officinalis* : application aux moisissures des légumes secs. *Revue « Nature & Technologie »*, N° 07, 44-52.
- **Lakhdar L., 2015.** Evaluation de l'activité antibactérienne d'huiles essentielles marocaines sur *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* : étude *in vitro*, Thèse de Doctorat en biologie, option Sciences odontologiques, Université de Mohammed V de Rabat, 124 p.
- **Mahboubi M., et Kazempour N., 2015.** The antifungal activity of *Artemisia sieberi* essential oil from different localities of Iran against dermatophyte fungi. *MYCMED*. 537, 7p.
- **Marianne P., 2008.** Etude des huiles essentielles d'espèces végétales de la flore laurentienne : composition chimique, activités pharmacologiques et héli-synthèse. Mémoire présenté à l'Université du Québec à Chicoutimi comme exigence partielle de la maîtrise en ressources renouvelables, 5 p.
- **Meghazi N., 2012.** Activité antifongique de quelques huiles essentielles sur les moisissures du blé stocké. Mémoire En vue de l'obtention du diplôme de magistère en sciences agronomiques. Option : Santé végétale et environnement, Ecole Nationale Supérieure Agronomique, El Harach, Algerie : 84p.
- **Métali M., et Kerras K., 2016.** Etude des activités antibactériennes et antioxydantes des extraits d'*Ocimum basilicum* (basilic) dans la région de Ain Defla. Mémoire de Master en biologie, option : Analyses biologiques et biochimiques. Département de biologie, Université de Khemis Miliana, Algerie : 76p.
- **Modzelewska A., Sur S., Kumar KS., et Khan SR., 2005.** Sesquiterpenes : Natural products that decrease cancer growth. *Current. Medicinal Chemistry - Anti-Cancer Agents*. N° 5: 477-499.
- **Morcia C., Mehani M., Salhi N., Nazari L., Khelil L., Bara A., Ghizzoni R., and Terzi V., 2015.** On the role of natural compounds in mycotoxigenic fungi. Control the Battle Against Microbial Pathogens. *A. Méndez-Vilas* : 193-197.

- **Nedjai I., et Nedjai S., 2017.** Activité antimicrobienne des huiles essentielles. Mémoire de Fin de cycle en vue de l'obtention du diplôme Master, option écologie microbienne. Département de microbiologie, Université A. MIRA – Bejaia, 12p et 34 p.
- **Perelló A., Noll U., and Slusarenko A., 2013.** In vitro efficacy of garlic extract to control fungal pathogens of wheat. *Journal of Medicinal Plants Research* Vol. 7(24) : 1809-1817.
- **Prapagdee B., Kuekulvong C., et Mongkolsuk S., 2008.** Antifungal potential of extracellular metabolite produces by *Streptomyces hygroscopicus* against phytopathogenic fungi. *Int. J. Biol. Sci.* 4 : 330-337.
- **Remmal A., Bouchikhi T., Rhayour K., Ettayebi M., et Tantaoui A., 2014.** Improved Method for the determination of antimicrobial activity of essential oils in Agar Medium. *Journal of Essential Oil Research.* 5(2) : 179-184.
- **Samah Djeddi S., 1,2 Nassim Bouchenah B., Ibtissem Settar I., et Helen D., 2007.** Composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Rosmarinus officinalis* from Algeria. *Chemistry of Natural Compounds.* Vol. 43, No. 4 : 547-913.
- **Sasidharan S., Yoga Latha L., Yuet Ping K. and Jothy Lachumy S., 2012.** Screening Methods in the Study of Fungicidal Property of Medicinal Plants. Chapitre 05 in *Fungicides for Plant and Animal Diseases*. Dr. Dharumadurai Dhanasekaran (Ed.), ISBN: 978-953-307-804-5, InTech, Available from: <http://www.intechopen.com/books/fungicides-for-plant-and-animal-diseases/screening-methods-in-the-studyof-fungicidal-property-of-medicinal-plants>
- **Satrani B., Ghanmi M., Farah A., Aafi A., Fougrach H., Bourkhiss B., Bousta D., et Talbi M., 2007.** Composition chimique et activité antimicrobienne de l'huile essentielle de *cladanthus mixtus*. *Bull. Soc. Pharm.* N° 146, Bordeaux : 85-96.
- **Scimeca D., 2007.** Les plantes du bonheur, Ed. Alpen : 12-17.
- **Soylu E., Kurt S., et Soyly S., 2010.** In vitro and in vivo antifungal activities of the essential oils of various plants against tomato grey mould disease agent *Botrytis cinerea*. *International Journal of Food Microbiology.* 143 : 183-289.
- **Sutour S., 2011.** Etude de la composition chimique d'huiles essentielles et d'extraits de menthe de Corse et de Kumquats. Thèse de Doctorat, spécialité : chimie organique et analytique. Université De Corse Pascal Paoli Faculté Des Sciences Et Techniques : 222p.

- **Syngenta, 2018.** Fusariose du blé - *Fusarium roseum*, *Fusarium roseum*. Fiche technique : 5p.
- **Vivek K., Bajpai J., et Yoon S., 2009.** Antifungal potential of essential oil and various organic extracts of *Nandina domestica* Thunb. against skin infectious fungal pathogens. *Appl Microbiol Biotechnol.* 83 : 1127–1133.
- **Viret O., Bloesch B., Dubuis P., et Gindro K., 2010.** Epidémiologie de *Botrytis cinerea* et stratégies de lutte. Revue suisse Viticulture, Arboriculture, Horticulture. Vol : 162 (3) : 162–167.
- **Walker A., 2013.** Diversité et adaptation aux fongicides des populations de *Botrytis cinerea*, agent de la pourriture grise. Thèse de Doctorat. Université Paris-Sud école doctorale : Sciences du végétal, 170p.

- **Sites et pages web.**

[1] : <https://www.mdidea.com/products/herbextract/rosemary/photogallery.html>

(date de consultation le 08/06/2018).

[2] :

1&ei=u3YaW_rPBsPXUd6dqKgC&q=Origanum+floribundum&oq=Origanum+floribundum&gs_l=img.3..0i24k112.563321.563321.0.573647.1.1.0.0.0.313.313.3-1.1.0....0...1c..64.img..0.1.308....0.6WbtZ2aC3gI#imgrc=uo3Cm_D1RP_x7uM:

(date de consultation le 08/06/2018).

[3] : <http://www.jardinexotiqueroscoff.com/site/genre/153/1/8/eucalyptus/eucalyptus-camaldulensis.html> (date de consultation le 08/06/2018).

[4] : <http://fr.db-city.com/--Ouenza> (date de de consultation le 18/06/2018).

[5] : <https://www.horlogeparlante.com/coordonnées-géographiques-2495662.html> (date de de consultation le 18/06/2018).

Annexe I

Milieu PDA : (Potato Dextrose Agar)

P : pomme de terre200g.

D: D- Glucose.....18 g.

A: Agar- Agar.....18 g.

Eau distillée.....1 L.

- stérilisation à l'autoclave à 180 C°, pendant 20 min.

L'eau physiologique (0.9 %)

NaCl9 g.

Eau distille1 L.

Milieu sabauroud

Peptone de caséine..... 5 g.

Peptone de viande5 g.

Glucose monohydraté.....40 g.

Agar.....15 g.

Eau distille1 L.

- stérilisation à l'autoclave à 180 C°, pendant 20 min, pour les trois milieux.