

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
République Algérienne Démocratique et Populaire
وزارة التعليم العالي و البحث العلمي
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

Université 8 Mai 1945 Guelma
Faculté des Sciences de la Nature et de 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 : Phytopharmacie et protection des végétaux

Département : Ecologie et Génie de l'Environnement

Thème

Etude du potentiel de rendement en huile essentielle et de l'activité antifongique de la Rue (*Ruta graveolens L.*) de la région de Guelma (Nord-Est de l'Algérie)

**Présentée par : - Abdi aridj
- Tirouche rayan**

Devant le jury composé de :

Présidente : Mme Ouchtati N. (MCA) Université 8 Mai 1945 Guelma

Examinatrice : Mme Chahat N. (MCB) Université 8 Mai 1945 Guelma

Encadreur : Mme Alloui N. (MCA) Université 8 Mai 1945 Guelma

Juin 2022

REMERCIEMENTS

Avant toutes choses, nous remercions Dieu, le tout puissant, pour nous avoir donné la force et la patience pour réaliser ce travail.

Nous tenons à adresser nos remerciements les plus sincères à notre encadreur **Dr. Allioui. N.** pour sa patience, ses précieux conseils, et son aide indéfectible. Qu'elle trouve ici l'expression de notre reconnaissance et notre profonde gratitude pour sa disponibilité permanente.

Nous remercions vivement **Dr. Ouchtati N.**, pour avoir accepté de présider le jury et évaluer ce modeste travail.

Nos remerciements s'adressent également à **Dr. Chahat N.** pour avoir accepté de faire partie du jury et examiner notre travail.

Nos vifs remerciements s'adressent tout particulièrement au **Pr. Benhamida A.**, enseignante au département de Génie des procédés, faculté des sciences et technologies de l'université 8 Mai 1945 de Guelma pour sa gentillesse, ses orientations et son aide très précieuse dans la caractérisation de notre huile essentielle.

Nous tenons à remercier vivement **Dr. Zitouni A.** pour son aide pour le traitement statistique des résultats.

Enfin, nous remercions l'ensemble du personnel technique des laboratoires de notre faculté, pour l'aide qu'ils nous ont accordé durant la période de la réalisation de notre mémoire, et plus particulièrement **Mme Louiza**, pour sa gentillesse et son soutien.

Une profonde reconnaissance à tous ceux qui, de loin ou de près nous ont aidé dans la réalisation de ce travail.

Dédicaces

C'est avec grand plaisir que je dédie ce modeste travail,

A ma mère, pour son amour, ses encouragements et ses sacrifices ;

A mon père pour son soutien, son affection et la confiance qu'il m'a accordée ;

A mon frère et mes sœurs pour leur patience, leur amour, leur soutien et leurs encouragements.

Sans oublier ma chère copine Marwa et Ramy pour leur soutien moral, leur patience et leurs encouragements pendant cette période.

En fin, merci à mon binôme Rayen pour son soutien moral, sa patience aussi et sa compréhension tout au long de la réalisation de ce mémoire.

Aridj

Dédicaces

À la mémoire de mon grand-père **TIROUCHE Mouhamed El Hadi** qui nous a quitté pour pas longtemps, qui aurait été si fier de me voir réussir....

A mes parents, en reconnaissance de leurs efforts, leurs sacrifices et leurs encouragements durant toutes mes études.

A mon frère et mes sœurs pour leur patience, leur amour, leur soutien et leurs encouragements pendant tout mon parcours.

A mes chers cousins Amira et Akram vous avez toujours offert soutien et réconfort, j'exprime envers vous une profonde admiration, reconnaissance et attachement inconditionnels

A Amine aucun langage ne saurait exprimer mon respect et ma considération pour ton soutien et encouragements, en reconnaissance de ta bonté exceptionnelle

A la personne qui m'est la plus chère et qui m'apporte chaque jour autant de courage et de confiance

En fin, merci à mon binôme Aridj pour son soutien moral, sa patience aussi et sa compréhension tout au long de la réalisation de ce mémoire

Rayen

Liste des figures

N°	Titre	Page
01	Photographie de <i>Ruta graveolens</i> , à gauche : les fleurs, à droite les feuilles et les rameaux.	11
02	Situation géographique de la wilaya de Guelma, site de collecte de <i>Ruta graveolens</i> .	12
03	Dispositif de l'hydrodistillation de type <i>Clevenger</i> utilisé pour l'extraction de l'huile essentielle.	13
04	Différentes étapes de la CCM.	15
05	Cuve chromatographique (à gauche) et lampe à UV (à droite) utilisées pour le test de la CCM.	16
06	Photographie du spectromètre utilisé pour l'analyse IRTF.	17
07	Spectroscopie UV-visible utilisée pour l'analyse de l'huile essentielle.	18
08	Titration de l'huile essentielle et changement de la couleur après un certain volume de KOH.	19
09	Le réfractomètre utilisé pour la détermination de l'indice de réfraction de l'HE.	20
10	Papier pH montrant la gamme de couleur selon le pH de la solution analysée.	21
11	Plaques CCM obtenues pour l'huile essentielle de rue (<i>Ruta graveolens</i>).	28
12	Spectre IRTF de l'HE de <i>Ruta graveolens</i> enregistré dans la région 4000 – 400 cm ⁻¹	30
13	Spectre UV-visible de l'HE de <i>Ruta graveolens</i> .	32
14	Aspect physique de l'HE de <i>Ruta graveolens</i> obtenue dans cette étude.	33
15	Résultats du test de confrontation de <i>Botrytis cinerea</i> avec l'huile essentielle de rue (<i>Ruta graveolens</i>).	34
16	Résultats du test de confrontation de <i>Fusarium roseum</i> avec l'huile essentielle de <i>Ruta graveolens</i> .	36
17	Résultats du test de confrontation d' <i>Aspergillus niger</i> avec l'huile essentielle de <i>Ruta graveolens</i> .	38

Liste des tableaux

N°	Titre	Page
01	Caractéristiques botaniques des espèces les plus connues du genre <i>Ruta</i> .	7
02	Matériel et produits chimiques utilisés pour le test de l'activité antifongique.	22
03	Fractionnement par CCM des extraits de rue (<i>Ruta graveolens</i>) Dans le système d'élution.	28
04	Propriétés physico-chimiques des huiles essentielles de <i>R. graveolens</i> comparées à celles de <i>R. chalepensis</i> .	32
05	Propriétés organoleptiques de l'huile essentielle de <i>Ruta graveolens</i> .	33
06	Résultats de l'analyse de la variance pour <i>Botrytis cinerea</i> confronté à l'huile de <i>Ruta graveolens</i> .	35
07	Résultats de l'analyse de la Dunnett pour <i>Botrytis cinerea</i> confronté à l'huile de <i>Ruta graveolens</i> .	36
08	Résultat de l'analyse de la variance pour <i>Fusarium roseum</i> confronté à l'huile essentielle de <i>Ruta graveolens</i> .	37
09	Résultats du test de Dunnett pour <i>Fusarium roseum</i> confronté à l'huile de <i>Ruta graveolens</i> .	38
10	Résultat de l'analyse de la variance pour <i>Aspergillus niger</i> confronté à l'huile de <i>Ruta graveolens</i> .	39
11	Résultats du test de Dunnett pour <i>Aspergillus niger</i> confronté à l'huile de <i>Ruta graveolens</i> .	40

Liste des abréviations

CCM :	Chromatographie sur couche mince
D :	Densité
D, d :	Diamètre
GC/MS :	Chromatographie en phase gazeuse/ spectrométrie de
HE :	Huile essentielle
Ia :	Indice d'acide
ID ²⁰ :	Indice de réfraction à 20°C
If :	Indice de réfraction
IRTF :	Infrarouge à transformée de Fourier
KOH :	Hydroxyde de potassium
M :	Masse
M :	Masse d'huile essentielle en gramme
M' :	Masse de la matière végétale sèche utilisée en gramme
Nm :	Nanomètre
RF :	Rapport frontal
RHE% :	Rendement en huile essentielle
UV :	Ultra-violet
λ :	Longueur d'ondes
μ L :	Microlitre

Résumés

Résumé

Dans le but de préserver les cultures et augmenter la gamme de molécules naturelles biopesticides, cette étude a porté sur la rue (*Ruta graveolens*), largement répandue dans la région de Guelma (Nord-Est de l'Algérie). L'objectif visé est de déterminer son potentiel de rendement en huile essentielle, les caractéristiques physico-chimiques de cette huile, et son pouvoir antifongique contre des champignons phytopathogènes (*Botrytis cinerea*, *Aspergillus niger* et *Fusarium roseum*). Les résultats obtenus ont montré que cette espèce a donné un rendement en HE de $0,75 \pm 0,057\%$, c'est une huile acide caractérisée par la présence de plusieurs types chimiques, et a montré une activité antifongique satisfaisante, à l'égard des souches fongiques testées.

Mots clés : *Ruta graveolens*, huiles essentielles, rendement, activité antifongique, composition chimique.

Abstract

In order to preserve crops and increase the range of natural biopesticide molecules, this study focused on rue (*Ruta graveolens*), widely distributed in the region of Guelma (North-East of Algeria). The objective is to determine its essential oil yield potential, physicochemical characteristics of this oil, and its antifungal activity against some plant pathogenic fungi (*Botrytis cinerea*, *Aspergillus niger* and *Fusarium roseum*). The results obtained showed that this species gave an essential oil yield of $0.75 \pm 0.057\%$, it is an acid oil characterized by the presence of several chemical compounds. Satisfactory antifungal activity was noted for this oil against the fungal strains tested.

Key words: *Ruta graveolens*, essential oils, yield, antifungal activity, chemical composition.

الملخص

من أجل الحفاظ على المحاصيل وزيادة عدد المركبات الطبيعية التي يمكن استعمالها كمبيدات حيوية ، ارتكزت هذه الدراسة على نبات الفيجل (*Ruta graveolens*) ، واسع الانتشار في منطقة قالمة (شمال شرق الجزائر). و تهدف إلى تحديد المردود من الزيت الأساسي، والخصائص الفيزيائية والكيميائية لهذا الزيت، وكذا قدرته المضادة للفطريات ضد الفطريات الممرضة للنبات (*Botrytis cinerea*، *Aspergillus niger* و *Fusarium roseum*). أظهرت النتائج المتحصل عليها أن هذا النبات أعطى مردود زيت أساسي حوالي $0.75 \pm 0.057\%$ ، وهو زيت حمضي يتميز بوجود عدة أنواع كيميائية، كما لوحظ نشاط مضاد للفطريات لهذا الزيت ضد السلالات الفطرية المختبرة.

الكلمات المفتاحية : *Ruta graveolens* ، الزيوت الأساسية ، المردود ، النشاط المضاد للفطريات ، التركيب الكيميائي.

Titre	Page
Liste des tableaux.....	I
Liste des figures.....	Ii
Liste des abréviations.....	Iii
Résumés.....	
Introduction	1
Chapitre 01 : Matériel et méthodes.....	
1.1 Objectif de l'étude.....	11
1.2. Matériel végétal utilisé.....	11
1.2.1. Origine de l'espèce végétale utilisée.....	11
1.2.2 Situation géographique et caractéristiques pédoclimatiques de la région de Guelma, origine de la plante utilisée (<i>Ruta graveolens</i>).....	12
1.2.3. Traitement des échantillons collectés.....	12
1.2.4. Extraction des huiles essentielles.....	13
1.3. Caractérisation de l'huile essentielle de <i>Ruta graveolens</i>	14
1.3.1. Caractérisation physico-chimique.....	14
1.3.1.1 La chromatographie sur couche mince (CCM).....	15
1.3.1.2. Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (IRTF).....	16
1.3.1.3. Spectroscopie UV-visible.....	17
1.3.1.4. Indice d'acide.....	18
1.3.1.5. L'indice de réfraction.....	19
1.3.1.6. Mesure du pH.....	20
1.3.2. Caractéristiques organoleptiques.....	21
1.4. Evaluation de l'activité antifongique de l'huile essentielle de (<i>Ruta graveolens</i>).....	21
1.4.1. Matériel de laboratoire.....	21
1.4.2. Matériel fongique.....	21
1.4.2.1. Présentation des espèces fongiques utilisées.....	21
1.4.2.2. Origine des souches.....	23
1.4.2.3. Culture et conservation des souches.....	23
1.4.2.4. Préparation des suspensions sporales.....	24
1.4.3. Concentrations testées (volumes), de l'huile essentielle.....	24
1.4.4. Technique de confrontation.....	24

1.5. Analyse statistique des résultats.....	25
Chapitre 2 : Résultats et discussion	26
2.1. Rendement en huile essentielle de <i>Ruta graveolens</i>	27
2.2. Caractérisation des huiles essentielles de <i>Ruta graveolens</i>	27
2.2.1. Caractéristiques physico-chimiques.....	27
2.2.1.1. Analyse chromatographique sur couche mince (CCM).....	27
2.2.1.2. Analyse par spectroscopie Infrarouge à transformée de Fourier (IRTF).....	29
2.2.1.3. Spectroscopie UV-visible.....	31
2.2.1.4. Indice d'acide, indice de réfraction et Ph.....	32
2.2.2. Propriétés organoleptiques.....	33
2.3. Evaluation de l'activité antifongique de l'huile essentielle de <i>R. graveolens</i> ...	34
2.3.1. Effets de l'huile essentielle de <i>R. graveolens</i> sur <i>Botrytis cinerea</i>	34
2.3.2. Effets de l'huile testée sur <i>Fusarium roseum</i>	36
2.3.3. Effets de l'huile testée sur <i>Aspergillus niger</i>	38
Conclusion.....	40
Références bibliographiques	

Introduction générale

Introduction générale

Aux travers les âges, l'homme a pu compter sur la nature pour ses besoins élémentaires, tels que la nourriture, le logement, l'habillement, les besoins médicaux ; mais aussi pour développer des médicaments, des parfums, des colorants ou des pesticides (**Attou, 2011**).

Chaque année 31 à 42 % des pertes mondiales des cultures sont causées par les maladies et les ravageurs et 14,1 % sont attribuées aux maladies seules (**Agrios, 2005**). Les attaques par les champignons constituent un problème major pour une grande variété des plantes.

Les champignons phytopathogènes sont très diversifiés :

- Il existe des champignons pathogènes des plantes au champ (*Puccinia sp.*, *Erysiphe sp....*) ,
- D'autres s'attaquent aux produits agricoles stockés (*Aspergillus niger*, *Aspergillus flavus*,)
- Certains sont polyphages et ont un spectre d'hôtes très large (*Botrytis cinerea*),
- D'autres sont spécifiques à une seule famille ou même à une seule espèce botanique (*Zymoseptoria tritici*, *Fusarium roseum*,....).

Les attaques fongiques des cultures, qui se traduisent par des pertes quantitatives et qualitatives de la récolte, peuvent également avoir un impact considérable sur la santé du consommateur, suite à la contamination des produits alimentaires par des métabolites secondaires appelés « toxines », qui ont des effets neurotoxiques, cancérigènes, immunodépressifs,

Pour lutter contre les ravageurs et les parasites et améliorer la productivité des cultures, plusieurs méthodes peuvent être utilisées, la lutte physique, la lutte culturale, la lutte chimique, la lutte biologique et la lutte intégrée ; mais la lutte chimique par utilisation des pesticides (insecticides, fongicides, ..) demeure la méthode la plus utilisée car elle est très efficace et très rapide.

Toutefois, ces molécules chimiques présentent un risque pour l'environnement et peuvent avoir des effets nocifs sur l'homme, les animaux et les plantes. Plusieurs travaux ont montré que l'utilisation non raisonnée des pesticides de synthèse peut avoir des effets néfastes sur le consommateur, le manipulateur et l'environnement. **Errami (2012)** et **Benali et al. (2020)**, rapportent que, 15 à 20% des pesticides de nature chimique sont cancérigènes et la plupart

d'entre eux sont des perturbateurs endocriniens ; comme ils peuvent être la cause principale de mutations chez les champignons phytopathogènes, qui développent des potentialités de virulence et de résistance aux pesticides.

Pour toutes ces raisons, la demande des consommateurs pour les conservateurs naturels a augmenté. Les huiles essentielles et les extraits obtenus à partir de nombreuses plantes ont récemment acquis une grande popularité et un intérêt scientifique pour leurs propriétés biologiques (**Benali et al., 2020**). L'utilisation des produits naturels renfermant les huiles essentielles pour la protection des cultures a été employée régulièrement comme bio-pesticides en phyto-protection (**Amirat et al., 2011**).

Plusieurs plantes aromatiques et médicinales, notamment, la lavande, le romarin, l'origan, le thym, ... ont attiré l'attention de plusieurs chercheurs, et leurs extraits, notamment, les huiles essentielles, ont montré une efficacité satisfaisante à l'égard de plusieurs parasites. De nombreux auteurs ont rapporté que les extraits d'herbes ont des composés chimiques capables d'avoir une activité antimicrobienne (**Fertout, 2015**) :

- **Activité antibactérienne** : les huiles essentielles les plus étudiées pour leurs propriétés antibactériennes sont celles appartenant à la famille des Labiées: thym, romarin, origan, clou de girofle, très riches en composés phénoliques comme l'eugénol, le thymol et le carvacrol. Ce dernier est le plus actif de tous, non toxique et utilisé comme agent de conservation et arôme alimentaire. Le thymol et l'eugénol utilisés dans les produits cosmétiques et alimentaires possèdent un effet antimicrobien contre différents types de bactéries: *E. coli*, *Staplylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Listeria monocytogenes*, *Clostridium sp.* et *Helicobacter pylori*.
- **Activité antifongique**: de nombreux auteurs ont mis en évidence le pouvoir antifongique des huiles essentielles contre les moisissures allergisantes et contre des champignons pathogènes comme *Candida albicans* et *Aspergillus fumigatus* et ont établi que les champignons sont généralement plus sensibles que les bactéries.

- **Activité antivirale** : les virus sont généralement très sensibles aux molécules aromatiques des huiles essentielles telles que les monoterpénols et les monoterpénals (**Fertout, 2015**).

Les huiles essentielles ou « essences » sont des produits aromatiques légers, volatils ; généralement liquides à température ambiante et insolubles dans l'eau. Elles se caractérisent par leur odeur, spécifique des plantes ou des organes végétaux dont elles proviennent (**Engonga, 2009**).

Maatallah (2007) signale que, la norme AFNOR indique que l'huile essentielle est un produit obtenu à partir d'une matière végétale, soit par entraînement à la vapeur, soit par distillation à sec ou bien par des procédés mécaniques. Les huiles essentielles se localisent dans toutes les parties vivantes de la plante. Elles se trouvent chez environ 2000 espèces réparties en 60 familles. Nous citerons quelques unes :

- Les labiacées ou labiées (basilic, menthe, thym),
- Les lauracées (camphrier, laurier.)
- Les myrtacées (eucalyptus, girofle,..)
- Les ombellifères (carvi, persil, anis,..)
- Les rutacées (rue, citron, orange, bergamote,..)

Les huiles essentielles sont élaborées par des glandes sécrétrices qui se trouvent dans toutes les parties de la plante et se forment dans le cytoplasme de cellules spécialisées. Les cellules sécrétrices sont souvent localisées sur ou à proximité de la surface de la plante, ce qui facilite leur émission. Elles peuvent exister dans différents organes de la plante et la composition chimique pouvant varier d'un organe à un autre. Elles sont obtenues en utilisant différentes méthodes, le choix de la technique dépend de la localisation de l'essence dans le végétal (**Maatallah, 2007**) :

a- La distillation : C'est la méthode la plus simple. Elle consiste à vaporiser partiellement l'eau ou un solvant organique qui entrainera avec lui les substances volatiles. Les vapeurs ainsi formées sont condensées puis récupérées.

- *L'hydro distillation* : C'est la méthode la plus répandue, le matériel végétal est placé dans un alambic et immergé directement dans l'eau qui est ensuite portée à l'ébullition.

- *L'entraînement à la vapeur d'eau* : La plante est introduite dans un ballon traversé par un courant de vapeur d'eau. Les principes volatils peu solubles dans l'eau sont alors entraînés par la vapeur d'eau du fait de leur point d'ébullition faible et de leur caractère hydrophobe. Après l'HE est séparée par décantation.

b- Extraction par les solvants organiques : Dans le cas où l'huile essentielle a une densité voisine de l'eau, l'extraction par les solvants organiques est utilisée; elle consiste à faire une macération de la plante dans le solvant froid (**Maatallah, 2007**) :

- *Extraction par les solvants organiques volatils* : des solvants organiques à température d'ébullitions peu élevée sont utilisés, pour éviter la décomposition des molécules odorantes fragiles, différents appareillages sont utilisés (Soxhlet,...).
- *Extraction par le forane*: C'est une technique qui permet d'extraire un mélange d'huile essentielle et d'huile lipidique.
- *Extraction par le dioxyde de carbone liquide ou supercritique* : Cette technique a des applications potentielles dans l'industrie des arômes et des parfums, elle exige des pressions élevées.

c-L'enfleurage : L'enfleurage est une méthode très ancienne qui concerne l'extraction des parfums des fleurs. L'extraction se fait à froid ou à chaud en mettant en contact les pétales des fleurs avec un corps gras (**Puis, 2015**).

d- L'expression : C'est une opération qui concerne uniquement les huiles essentielles des agrumes tels que les citrons, les oranges,... Elle consiste à extraire les huiles essentielles de l'épicarpe de certains fruits en les soumettant à de fortes pressions mécaniquement ou à la main, à froid ou à chaud (**Attou, 2011**).

Le rendement des huiles essentielles est extrêmement faible, il est de l'ordre de 1%, sauf pour quelques cas exceptionnels comme le clou de girofle dont le rendement est de 15%, l'eucalyptus de 3% et la lavande de 2 à 3 % (**Maatallah, 2007**).

Selon **Belhachat (2019)**, les huiles essentielles sont des mélanges de constituants dont les principaux sont des Carbures terpéniques (aliphatiques, mono, bis et parfois tricycliques) et leurs dérivés oxygénés (Alcools, aldéhydes, cétones, oxydes et/ou peroxydes). Elles contiennent aussi

des composés acycliques linéaires comme des acides organiques à faible poids moléculaire (acide formique, acide acétique), des carbures terpéniques et sesquiterpéniques (Limonène, zingibérène), aldéhydes, alcools (linalol, sabinol), cétones (camphre, leptospermone), phénols (thymol, eugénol), éthers (anéthol, eucalyptol), et, en plus des coumarines (bergaptènes, ombelliférones) et des produits de structures irrégulières pouvant contenir des atomes d'azote (dérivés indoliques) ou de soufre (polythiophènes, allyl et aryl isothiocyanates).

Engonga (2009) rapporte que, longtemps considérés comme métabolites secondaires, les constituants volatils ont un rôle encore mal défini dans la plante. Quelques hypothèses peuvent être énumérées :

- Ces essences constituent un moyen de défense contre les prédateurs en modulant les comportements trophiques de ceux-ci vis à vis des plantes.
- Les constituants des huiles essentielles sont considérés comme des modérateurs des réactions d'oxydation intramoléculaire protégeant la plante contre les agents atmosphériques.
- Certains de ces composés se comportent aussi comme source d'énergie à la suite d'une baisse de l'assimilation chlorophyllienne.
- Certains de ces produits seraient des composés intermédiaires du métabolisme et qu'ils se trouveraient à l'état libre durant certaines périodes en relation avec l'activité végétale de la plante.
- Les mono et sesquiterpènes peuvent jouer des rôles aussi importants dans la relation des plantes avec leur environnement. C'est le cas du 1,8-cinéole et du camphre qui inhibent la germination des organes infectés ou la croissance des agents pathogènes issus de ces organes.
- Les huiles essentielles jouent un rôle dans la pollinisation et la dispersion des diaspores grâce à leur pouvoir attracteur sur les insectes pollinisateurs.
- La volatilité et l'odeur marquée de ces essences en font de ces composés des éléments de la communication chimique.
- Les huiles volatiles auraient en réalité un rôle de mobilisateur d'énergie lumineuse et de régulateur thermique au profit de la plante. Elles réguleraient la transpiration diurne en absorbant les rayons ultraviolets par leurs constituants insaturés. La présence et la teneur des plantes en huile essentielle seraient donc en rapport avec la photochimie.

Cependant, dans la littérature, l'effet antifongique des extraits de plantes, contre les champignons phytopathogènes, n'a été que partiellement étudié ; et très peu de travaux sont réalisés sur les rutacées, malgré que leurs propriétés biologiques et thérapeutiques soient très rapportées.

La *Rutaceae* forme une famille de plantes appartenant à l'ordre des *Sapindales* et comprend près de 1500 espèces regroupées en 150 genres environ. Cette famille est plus ou moins cosmopolite, avec une forte concentration dans la zone intertropicale et dans les régions tempérées de l'hémisphère Sud, notamment, l'Australie et l'Afrique du Sud (**Alloun, 2013**). Les rutacées sont des plantes dicotylédones, ce sont des arbres, des arbustes ou des herbes rares des régions tempérées à tropicales qui sont producteurs d'huiles essentielles. Les agrumes appartiennent à cette famille (**Engonga, 2009**).

Alloun (2013) signale que, la Rue est largement répandue dans le monde à cause de ses propriétés ornementales et médicinales. Elle est souvent cultivée dans les jardins pour ses qualités décoratives en variété de couleur. En Algérie, elle est rencontrée dans les zones montagneuses de l'intérieur sur l'Atlas Saharien et les pelouses arides. Le genre *Ruta* comprend 8 espèces d'arbustes à feuilles caduques ou à feuilles persistantes, de sous-arbustes et d'herbes vivaces qui vivent dans des endroits secs et rocheux de la région méditerranéenne, du nord-Est de l'Afrique au sud-ouest de l'Asie. Fleurs et feuilles aromatiques. Il existe plusieurs espèces du genre *Ruta*, parmi lesquelles on note :

- *Ruta graveolens* : rue officinale, rue domestique, rue des jardins, herbe de grâce.
- *Ruta chalpensis*: rue d'Alep.
- *Ruta bracteosa* rue d'hiver.
- *Ruta montana* : rue des montagnes.
- *Ruta latifolia* (**Alloun, 2013**).

En Algérie. Il existe 4 espèces du genre *Ruta*, qui se différencient entre elles par l'allure des feuilles, la grappe fructifère, les bractées et les sépales: *Ruta montana* *Ruta angustifolia* (*R. graveolens*), *Ruta chalpensis* et *Ruta latifolia*. Les espèces de *Ruta* les plus connues (**Tab. 01**), sont très proches en forme, composition et en propriétés pharmacologiques (**Attou, 2011**).

Tableau 01 : Caractéristiques botaniques des espèces les plus connues du genre *Ruta*(Deorper, 2008 ;Merghache et al., 2009 ; Attou, 2011 ; Hazzit et al., 2015 ;Sharifi et al., 2019 ; Eman et al.,2020)

Espèce botanique	Noms communs	Caractéristiques	Aspect botanique	Ecologie	Propriétés biologiques et thérapeutiques
<i>Ruta montana</i> L.	* Rue des montagnes, * Rue sauvage * "Fidjel el djebel"	- Plante herbacée vivace, d'environ 1 mètre de long. - Les feuilles sont glauques finement découpées en segments linéaires. - Les capsules sont globuleuses 3,5 x 4 mm à 4 loges obtuses très brièvement pédicellées. - Les fleurs petites 5-6 mm à pétales denticulés sur les marges.	 <p>[1]</p>	C'est une plante médicinale méditerranéenne bien connue qui pousse sur les rocailles et les pâturages du tell. C'est une espèce commune dans les montagnes jusqu'à l'Atlas saharien.	<ul style="list-style-type: none"> · A petite dose, <i>R. montana</i> facilite la digestion. · Les extraits sont utiles pour traiter les infections internes et les inflammations. · Les parties aériennes sont utilisées contre les affections respiratoires sévères, les gastralgies, les troubles intestinaux, l'épilepsie et les troubles nerveux, les rhumatismes, les courbatures et les douleurs articulaires, · C'est un répulsif pour les insectes, notamment les pucerons. - C'est une plante qui demande à être manipulée avec précaution car son huile essentielle est toxique, elle contient des alcaloïdes, des flavonoïdes, de la vitamine C et des furocoumarines.

Tableau 01 (Suite) : Caractéristiques botaniques des espèces les plus connues du genre *Ruta* (Deorper, 2008 ; Merghache et al., 2009 ; Attou, 2011 ; Hazzit et al., 2015 ; Sharifi et al., 2019 ; Eman et al., 2020)

Espèce botanique	Noms communs	Caractéristiques	Aspect botanique	Ecologie	Propriétés biologiques et thérapeutiques
<i>Ruta chalepensis</i>	* Rue d'Alep * « Fidjel »	- Plante herbacée à tige ligneuse à la base, pouvant atteindre 1 m. Les feuilles de 6 à 12 cm de long, sont aromatiques, ovales, larges, pennatiséquées, bleu-vert, elles présentent de nombreux lobes oblongs, lancéolés ou aborales. En été, s'épanouissent des fleurs de 1 à 2 cm de diamètre, en coupe, de couleur jaune foncé, portant quatre ou cinq pétales frangés de longs poils. Elles sont réunies en cymes lâches.	 <p>[2]</p>	<p>Espèce méditerranéenne, relativement commune dans toute l'Algérie septentrionale, au Nord-est de l'Afrique, Sud de l'Europe et le Sud-ouest de l'Asie. Elle est spontanée, largement ré pondue en Afrique du nord, particulièrement en Algérie. On la rencontre fréquemment dans les rocailles, pelouses et coteaux secs. En Algérie, cette plante est aussi cultivée dans les jardins.</p>	<p><i>Ruta chalepensis</i> L. est une plante médicinale utilisée dans la médecine traditionnelle de nombreux pays comme laxatif, anti-inflammatoire, analgésique, antispasmodique, abortif, antiépileptique, emménagogue et pour le traitement de pathologies cutanées.</p>

Tableau 01 (Suite) : Caractéristiques botaniques des espèces les plus connues du genre *Ruta* (Deorper, 2008 ; Merghache et al., 2009 ; Attou, 2011 ; Hazzit et al., 2015 ; Sharifi et al., 2019 ; Eman et al., 2020)

Espèce botanique	Noms communs	Caractéristiques	Aspect botanique	Ecologie	Propriétés biologiques et thérapeutiques
<p><i>Ruta graveolens L.</i></p>	<p>*Rue fétide, *Rue des jardins, *Herbe de grâce, *Rue officinale, *Rue commune</p>	<p>- Espèce herbacée, c'est une plante méditerranéenne semi arbustive, d'un mètre de haut environ, très ramifiée et ligneuse à la base.</p> <p>- Ses feuilles d'un vert terne, semi persistantes, sont alternes, pennatiséquées (souvent trilobées) et de consistance un peu charnue. - - La floraison s'étend de mai à août. Ses fleurs, regroupées en corymbe, sont composées de 4 à 5 pétales jaunes verdâtres soudés à la base, du même nombre de sépales et de 8-10 étamines. La plante est hermaphrodite et entomogame.</p> <p>- Les fruits sont des capsules déhiscentes libérant à maturité de petites graines noirâtres.</p>	<div data-bbox="1155 363 1541 751" data-label="Image"> </div> <p data-bbox="1330 788 1366 820">[3]</p> <div data-bbox="1162 849 1534 1249" data-label="Image"> </div> <p data-bbox="1330 1286 1366 1318">[4]</p>	<p>Répartie dans les régions tropicales et tempérées du monde, y compris l'Amérique du Sud et l'Europe du Sud, et est considérée comme originaire de la région méditerranéenne. Elle nécessite un sol léger, sec, calcaire et bien exposé au soleil.</p>	<p>A des utilisations historiques dans la médecine traditionnelle de différentes civilisations, par exemple, pour le contrôle des troubles menstruels, des maux de tête et d'oreille, des crampes et des inflammations cutanées. Elle est connue pour sa grande valeur des médicaments tels que les antioxydants, les anti-inflammatoires.</p>

L'objectif visé par ce travail, consiste à étudier le potentiel de rendement en huiles essentielles de la rue officinale, *Ruta graveolens L.*, une plante de la famille des Rutacées, répandue dans la région de Guelma (Algérie), de définir certaines de ses caractéristiques chimiques et son pouvoir antifongique à l'égard de quelques champignons phytopathogènes, notamment, *Botrytis cinerea*, agent de la pourriture grise de plusieurs cultures, *Fusarium roseum*, agent de la fusariose du blé et *Aspergillus niger*, pathogène des plantes au champs et contaminant redoutable, responsable de libération de toxines dangereuses sur les produits agricoles stockés.

Chapitre 01 :
Matériel et méthodes

1.1. Objectif de l'étude

Le présent travail a pour but d'évaluer le potentiel de rendement en huile essentielle de *Ruta graveolens*, de déduire ses caractéristiques physicochimiques et son pouvoir antifongique pour une utilisation éventuelle dans le domaine de la lutte biologique, et plus particulièrement en protection des cultures.

1.2. Matériel végétal utilisé

Notre travail a porté sur les parties aériennes (Feuilles et sommités fleuries) d'une espèce de plante aromatique et médicinale : la rue (*Ruta graveolens*). Cette espèce de plante a été choisie pour les raisons suivantes :

- La large utilisation de cette plante en médecine traditionnelle (Préparation des tisanes et autres), pour le traitement de maladies et d'infection de nature microbienne.
- Cette plante est largement répandue comme ressource végétale naturelle dans plusieurs régions du pays, notamment dans l'Est de l'Algérie.
- Manque de recherches sur les caractéristiques antifongiques des huiles essentielles de cette espèce végétale, et plus particulièrement ses activités à l'égard des champignons phytopathogènes.

1.2.1. Origine de l'espèce végétale utilisée

Les échantillons de la rue, *Ruta graveolens* (**Fig. 01**) utilisés dans cette étude ont été collectés des montagnes de la région de Guelma (commune Guelma). La récolte de la plante a été faite au mois d'avril 2022.



Figure 01 : Photographie de *Ruta graveolens*, à gauche : les fleurs, à droite les feuilles et les rameaux (Photo personnelle)

1.2.2. Situation géographique et caractéristiques pédoclimatiques de la région de Guelma, origine de la plante utilisée (*Ruta graveolens*)

La wilaya de Guelma se situe au Nord-Est du pays et constitue, du point de vue géographique, un point de rencontre, voire un carrefour entre les pôles industriels du Nord (Annaba – Skikda) et les centres d'échanges au Sud (Oum-El-Bouaghi et Tébessa), outre la proximité du territoire Tunisien à l'Est (**Fig. 02**).

La wilaya de Guelma se situe au sein d'une grande région agricole dans le Nord-Est de l'Algérie, à une altitude de 36°27'43" Nord et une longitude de 7°25'33" Est. Le Climat est subhumide ; la pluviométrie est d'environ 450 à 600 mm/an. La géographie de la Wilaya se caractérise par un relief diversifié dont on retient essentiellement une importante couverture forestière et le passage de la Seybouse qui constitue le principal cours d'eau [5].



Figure 02 : Situation géographique de la wilaya de Guelma, site de collecte de *Ruta graveolens* [5].

1.2.3. Traitement des échantillons collectés

La matière végétale utilisée pour extraire les huiles essentielles de *Ruta graveolens* L. (feuilles, rameaux et sommités fleuries) a été séchée à l'air libre, à l'ombre et à température ambiante pendant 10 jours, puis des pesées de 100 g ont été conservées au laboratoire dans des sachets en papier, propres, jusqu'à l'utilisation.

1.2.4. Extraction des huiles essentielles

L'huile essentielle de *Ruta graveolens* a été extraite au niveau du laboratoire par le procédé de l'hydrodistillation, à l'aide d'un hydrodistillateur de type *Clevenger* (**Fig. 03**). Cette technique est basée sur l'immersion d'un échantillon du végétal dans l'eau portée à ébullition, la vapeur saturée d'huiles essentielles traverse un serpentin où elle se condense pour donner le distillat qui contient l'huile essentielle (**Fig. 03**).

- Matériel utilisé

- Eau distillée.
- Pissette contenant de l'eau distillée
- Hydrodistillateur de type *Clevenger* relié à un chauffe-ballon et à un bac de glace
- Balance de précision
- Balance analytique
- Flacons de 5-10 ml, en verre fumé lavés et séchés
- Ballon en verre de 2 litres
- Matière végétale sèche (100 g /distillation), finement broyée
- Papier aluminium.

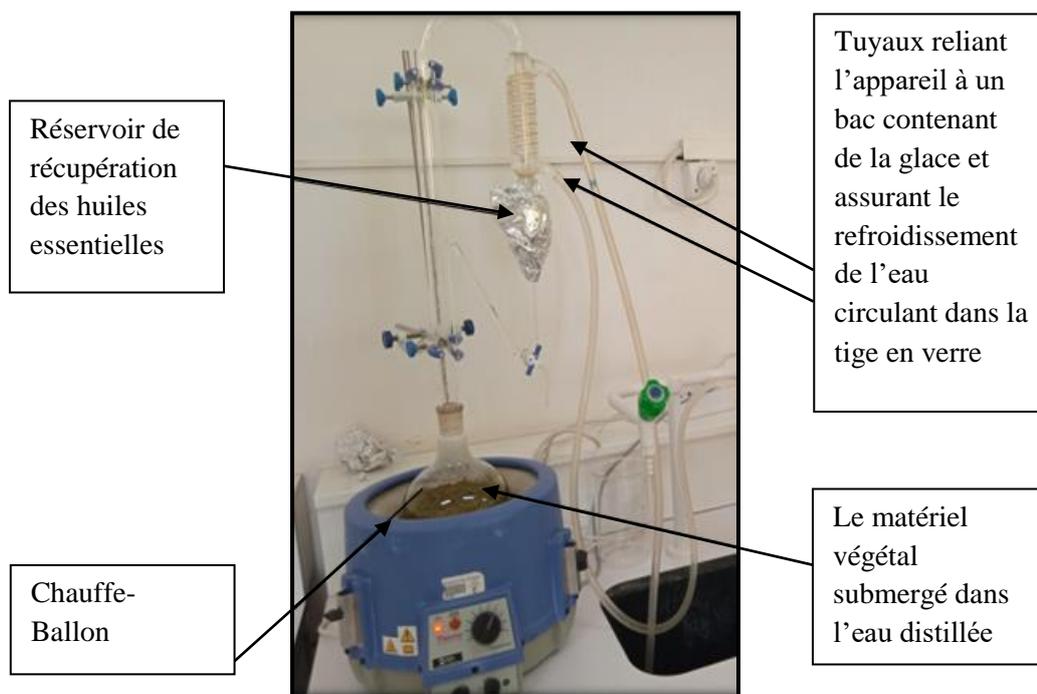


Figure 03 : Dispositif de l'hydrodistillation de type *Clevenger* utilisé pour l'extraction de l'huile essentielle (Photo personnelle)

- Mode opératoire

Dans un ballon d'une capacité de 2 litres, on introduit 100 g de matière végétale finement broyée, submergée dans de l'eau distillée (environ 2/3 du volume du ballon). Ensuite, on adapte le ballon à l'appareil de condensation et on alimente le réfrigérant en eau. Ainsi, le ballon et son contenu sont mis sur un chauffe-ballon. Les huiles essentielles entraînées par les vapeurs d'eau générées dans le ballon se condensent sous l'effet du refroidissement au niveau d'un réservoir (**Fig. 03**), la distillation se fait pendant 3h de temps, et à la fin de l'opération l'huile est récupérée dans des flacons en verre fumé (sombres), bien fermés pour éviter l'évaporation et la volatilisation, et conservées au congélateur (- 4° C) jusqu'à l'utilisation.

-Détermination du rendement d'extraction

Les huiles essentielles extraites ont été pesées afin de calculer leur rendement, le rendement en huile essentielle (RHE) est défini par le rapport entre la masse de l'huile essentielle obtenue après l'extraction (M') et la masse de la matière végétale utilisée (M). Le rendement est exprimé en pourcentage, il est donné par la formule suivante décrite par (**Berbouchi et al., 2021**).

$$\text{RHE (\%)} = \text{M}'/\text{M} \times 100$$

Où :

RHE : Rendement en huile essentielle en %.

M' : Masse d'huile essentielle en gramme.

M : Masse de la matière végétale sèche utilisée en gramme.

1.3. Caractérisation de l'huile essentielle de *Ruta graveolens*

1.3.1. Caractérisation physico-chimique

Il convient de déterminer les propriétés physico-chimiques de l'huile essentielle extraite avant de déterminer son activité fongicide, car il serait intéressant d'identifier les espèces chimiques responsables de cette activité. Une série d'analyses chimiques de l'huile essentielle de *Ruta graveolens* ont été réalisées au niveau du laboratoire pédagogique du département de Génie des Procédés, Faculté des Sciences et Technologies, Université de Guelma, sous la direction du Professeur BENHAMIDA Aida.

1.3.1.1. La chromatographie sur couche mince (CCM)

▪ Principe

Hessas *et al.*, (2018) signalent que, la chromatographie sur couche mince est une méthode analytique intéressante, par sa simplicité et sa modularité. En CCM, les supports utilisés sont des plaques de verre ou d'aluminium sur lesquelles est déposée une fine couche d'absorbant (par exemple de la silice) qui agit comme une phase au repos, l'échantillon sera déposé dessus. La partie inférieure de la plaque est en immersion dans le solvant (phase mobile) qui remonte la plaque par capillarité. Les composants de l'échantillon sont entraînés à des vitesses différentes (**Fig. 04**). Le traitement des plaques séchées avec un révélateur peuvent mettre en évidence des composés isolés. De petites taches visibles (sous lumière naturelle ou UV) peuvent se former. L'analyse qualitative se fait à l'œil nu.

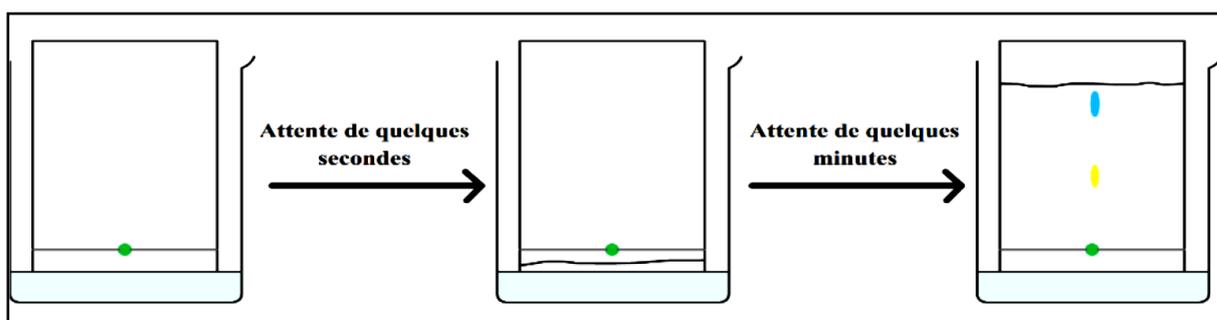


Figure 04 : Différentes étapes de la CCM (Reghaissia, 2020)

▪ Méthode

Cette analyse se fait comme suit :

- Déposer une goutte d'huile essentielle sur la ligne de dépôt ;
- Après avoir placé la plaque dans la cuve avec l'éluant, ce dernier va migrer lentement le long de la plaque, transportant des échantillons de différentes espèces chimiques ;
- Chaque espèce se déplace devant l'éluant à sa propre vitesse ;
- Retirer la plaque de la cuvette et marquer le devant de l'éluant avec un crayon.
- Laisser sécher la plaque
- L'éluant s'évapore

L'éluant utilisé est le *Cyclohexane*. La visualisation de la carte se fait par des méthodes physiques, sous lumière UV à la longueur d'onde : 254 nm (**Fig. 05**).



Figure 05 : Cuve chromatographique (à gauche) et lampe à UV (à droite) utilisées pour le test de la CCM

▪ **Exploitation de la CCM**

Selon **Hessas et al. (2018)**, La distance entre la ligne de dépôt et le centre de la tache est caractéristique de l'espèce chimique. Les espèces qui migrent à la même hauteur sont les mêmes. Le rapport frontal ou débit (R_f) observé pour chaque point est calculé comme suit :

$$R_f = h/H$$

Où :

- **h**: la distance entre la ligne de dépôt et le centre de la tache
- **H** : distance entre la ligne de dépôt et le front de solvant.

1.3.1.2. Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (IRTF)

▪ **Principe**

Selon **Benazzouz (2011)**, la spectroscopie infrarouge exploite le fait que les molécules possèdent des fréquences spécifiques pour lesquelles elles tournent ou vibrent en correspondance avec des niveaux d'énergie discrets. Ces fréquences de résonance sont déterminées par la forme des surfaces d'énergie potentielle, les masses atomiques et par le

couplage vibronique associé. La spectroscopie IRTF a été faite à l'aide d'un spectromètre de type Agilent Technologies Cary 360 FTIR (**Fig. 06**).



Figure 06 : Photographie du spectromètre utilisé pour l'analyse IRTF

▪ **Mode opératoire**

- Après avoir nettoyé la zone de dépôt avec du chloroforme, calibrez l'équipement pour éliminer les traces des échantillons précédents ;
- Verser une goutte d'huile essentielle dans le cristal ;
- Introduire le cristal dans l'instrument pour analyse en mode transmission.
- Le test est contrôlé par ordinateur pour permettre l'analyse statistique des données spectrales.

1.3.1.3. Spectroscopie UV-visible

▪ **Principe**

Benazzouz (2011), signale que, la spectroscopie UV-Visible ou spectroscopie UV-Vis est une technique spectroscopique impliquant des photons avec des longueurs d'onde gamme UV (200 nm – 400 nm), visible et proche infrarouge (750 nm -1400 nm). Soumises à un rayonnement dans cette gamme de longueurs d'onde, les molécules subissent une transition électronique. La technique est complémentaire à la spectroscopie de Fluorescence, car la fluorescence implique une transition à partir d'un état excité jusqu'à l'état fondamental, tandis que le spectre d'absorption gère les transitions entre état fondamental et état excité. La **figure 07** montre le spectrophotomètre utilisé pour cette analyse.



Figure 07 : Spectroscopie UV-visible utilisée pour l'analyse de l'huile essentielle

▪ **Méthode**

- Nettoyer la cuvette quartz à l'acétone, puis au cyclohexane (solvant utilisé) ;
- Remplir le réservoir de référence avec du cyclohexane, l'introduire dans le spectromètre UV et appuyez sur zéro ;
- Remplir à nouveau le réservoir de cyclohexane et ajouter quelques gouttes d'huile essentielle;
- Placez le réservoir rempli dans le spectrophotomètre UV, où il est traversé par le faisceau lumineux.
- Le spectre d'absorption UV-visible s'affiche

1.3.1.4. Indice d'acide

▪ **Principe**

L'indice d'acide (IA) est le nombre de milligrammes d'hydroxyde de potassium (KOH) nécessaire à la neutralisation des acides contenus dans un gramme d'HE. Cet indice est déterminé selon les indications de la norme AFNOR (**Boukedjar et al., 2021**).

▪ **Mode opératoire**

- Mettre 0,2 g d'échantillon d'huile essentielle de *Ruta graveolens* dans une fiole conique de 25 ml propre et sèche.
- Ajouter 5 ml d'éthanol à la pipette, puis ajouter 3 gouttes de phénolphtaléine, ce dernier est utilisé comme indicateur coloré.

- A l'aide d'une burette, neutraliser la solution obtenue avec une solution de KOH (0.1 N : 0.1 mol/l).
- Arrêter le titrage lorsque la couleur change (**Fig. 08**).
- Notez le volume de KOH consommé (V KOH).

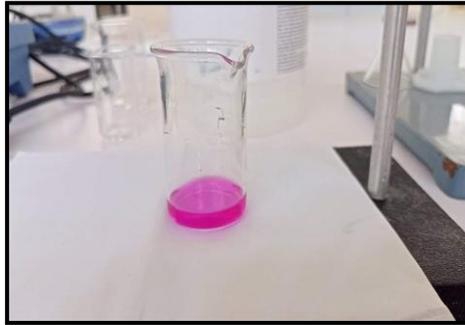


Figure 08 : Titrage de l'huile essentielle et changement de la couleur après un certain volume de KOH

- Le calcul se fait par la formule suivante décrite par (**Reghaissia, 2020**) :

$$I_A = \frac{56,1 \times M \times v}{m}$$

Où :

v = volume de KOH
 m = masse d'huile
56.1 = masse de KOH
 M = molarité de KOH

1.3.1.5. L'indice de réfraction

▪ Principe

L'indice de réfraction reflète le changement de direction subi par un rayon lumineux passant d'un milieu optique à un autre (par exemple de l'air à l'huile essentielle), à 20°C. Il s'agit d'une grandeur sans unité (**Belhachat, 2019**). L'indice de réfraction est mesuré à l'aide d'un réfractomètre (**Fig. 09**).



Figure 09 : Le refractomètre utilisé pour la détermination de l'indice de réfraction de l'HE

▪ **Mode opératoire**

- Déposer une goutte d'HE de *Ruta graveolens* sur le prisme du réfractomètre ;
- Utilisez les vis miniatures pour effectuer les réglages nécessaires, puis lisez les résultats.
- L'indice de réfraction diminue avec l'augmentation de la température. Lors d'une mesure à température T°C, il faut la ramener à la valeur de référence à l'aide de la formule suivante, décrite par (Hessas et al., 2018) :

$$ID^{20} = I + 0,0003 (T - 20 \text{ } ^\circ\text{C})$$

Où :

I : est la valeur de lecture, obtenue à la température T à laquelle a été effectuée la détermination.

1.3.1.6. Mesure du pH

Plus communément, le pH mesure l'acidité ou l'alcalinité d'une solution. C'est un coefficient qui indique si la solution est acide, basique ou neutre. Le pH de notre huile essentielle a été mesuré par le papier pH (Fig. 10).



Figure 10 : Papier pH montrant la gamme de couleur selon le pH de la solution analysée

• **Mode opératoire**

- Déposer quelques gouttes d'HE à analyser sur un papier pH ;
- Après le changement de la couleur du papier, comparer avec la gamme de couleurs, et noter le pH.

1.3.2. Caractéristiques organoleptiques

Les caractéristiques organoleptiques (aspect, couleur, odeur) sont des indications qui permettent d'évaluer initialement la qualité d'une huile essentielle.

1.4. Evaluation de l'activité antifongique de l'huile essentielle de *Ruta graveolens*)

L'activité antifongique de l'huile essentielle de la rue (*Ruta graveolens*) a été testée in vitro, à l'égard des trois souches fongiques phytopathogènes, citées ci-après.

1.4.1. Matériel de laboratoire

Pour la réalisation de ce test nous avons utilisé le matériel et les produits indiqués dans le **tableau 02**.

1.4.2. Matériel fongique

1.4.2.1. Présentation des espèces fongiques utilisées

Trois espèces de champignons ont fait l'objet de cette étude, et la sélection de ces espèces a été faite selon leur importance économique et les dégâts qu'ils causent aux cultures:

Tableau 02 : Matériel et produits chimiques utilisés pour le test de l'activité antifongique

Matériel	Produits
<ul style="list-style-type: none"> - Microscope optique - Cellule de Malassez + lamelles - Bain marie (Mammert) - Balance de précision - Etuve, réglée à 24 °C. - Autoclave - Vortex. - Flacons de 250 ml. - Bec bunsen. - Boîtes de Pétri de 50 mm et de 90 mm de diamètre. - Pipettes Pasteur. - Anse de platine. - Papier Wattman (disques de 6 mm de diamètre, autoclavés). - Tubes coniques en plastique stérile de 15 ml. - Micro pipette (2,5 µl, 10 µl, 100 µl) + embouts. - Parafilm - Pince stérilisée 	<ul style="list-style-type: none"> - Alcool (éthanol 95°) - Eau distillée stérilisée - Eau physiologique - Milieu de culture: PDA - Huile essentielle de <i>Ruta graveolens</i> - Tween 80

➤ *Botrytis cinerea*

Botrytis cinerea est un ascomycète pathogène, ubiquiste et très polyphage. Ce champignon est responsable de pourritures sur un grand nombre de plantes hôtes d'importances économiques en agriculture. Il attaque plus de 200 espèces de cultures dans le monde (Vasquez, 2017).

➤ *Fusarium roseum*

Heit (2015) signale que, l'espèce type de *Fusarium* est *Fusarium roseum*, décrite par Link en 1809. Ce champignon Deutéromycète, responsable de la fusariose du blé peut occasionner des pertes de rendement pouvant aller de 30 à 70 % suite à la nécrose précoce des épis et au grains mal remplis et déformés, ainsi qu'une diminution de la qualité boulangère et du taux de germination [6].

➤ *Aspergillus niger*

Ce champignon noir est souvent observé dans le sol ou sous forme de champignon saprophyte sur les résidus végétaux, peut causer des problèmes dans la culture de l'oignon et de l'ail, principalement lorsque les cultures sont mûres ou stockées à des températures très élevées. La caractéristique la plus importante est la présence de spores poudreuses à la surface du bulbe ou entre les écailles [7].

1.4.2.2. Origine des souches

- *Botrytis cinerea*: Isolé à partir de fruit de tomate montrant les symptômes de la pourriture grise.
- *Fusarium roseum*: Isolé du blé sur des échantillons collectés de Guelma.
- *Aspergillus niger*: Isolé de l'oignon sur des échantillons de Guelma.

1.4.2.3. 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 24° C, puis conservées à + 4° C jusqu'à utilisation.

1.4.2.4. Préparation des suspensions sporales

Pour les différentes souches fongiques, les suspensions sporales ont été préparées à partir de cultures jeunes, âgées de 5 jours.

Les spores ont été récoltées par grattage de mycélium fongique, dans des tubes coniques, contenant 20 ml d'eau distillée stérilisée, avec l'ajout de 1 à 2 gouttes de tween 80 pour faciliter la dispersion des spores fongiques, après agitation au vortex, la concentration sporale est déterminée à l'aide d'une cellule de Mallassez au microscope photonique ($\times 40$). Les concentrations retenues sont :

- 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).
- Pour *Aspergillus niger* : une concentration sporale de 10^4 spores/ml a été utilisée (Athammia et al., 2018).

1.4.3. Concentrations testées (volumes), de l'huile essentielle

Les concentrations d'huile essentielle (Volumes en μl) testées dans cette étude sont : 5 μl ; 10 μl , 20 μl , 40 μl pour la souche d'*Aspergillus niger* et la souche de *Fusarium roseum* et 5 μl ; 10 μl , 20 μl , 40 μl , 50 μl et 75 μl , pour la souche de *Botrytis cinerea*, en plus du témoin négatif (0 μl) traité avec de l'eau distillée stérilisée sans ajout d'huile, et ce, pour chaque souche fongique.

1.4.4. Technique de confrontation

Les confrontations souches fongiques-huile ont été réalisées dans des boîtes de Pétri de 90 mm de diamètre, par la technique de contact directe, à travers des disques de papier Wattman. Cette technique consiste en une diffusion d'huile dans le milieu inoculé par les champignons étudiés à travers des disques en papier wattman de 6 mm de diamètre, placés au centre des boîtes. Chaque boîte de Pétri, contenant du milieu PDA, est inoculée par 100 μl de la suspension de spores préparée le jour même ; après séchage de quelques minutes, les disques de papier wattman sont placés au centre des boîtes à l'aide d'un emporte-pièce stérile (Pince), et

imprégnés par les différents volumes utilisés de l'huile essentielle de *Ruta graveolens*. Les boîtes sont ensuite bien fermées à l'aide du parafilm et incubées à une température de 24 °C à l'étuve. La lecture des boîtes a été effectuée après 5 jours d'incubation, par l'observation et la mensuration des diamètres des zones d'inhibition de la croissance des champignons au voisinage des disques imprégnés d'huile. Trois répétitions de chaque souche ont été réalisées, et la moyenne des 03 valeurs est retenue.

1.5. Analyse statistique des résultats

Les moyennes et les écartypes des résultats ont été calculés par l'Excel, version 2010. Une analyse de la variance a été conduite pour les résultats obtenus, et le test de Dunnett a servi pour vérifier l'importance des variations dans les valeurs enregistrées entre le témoin (0 µL) et les différents volumes de l'huile testée. Ces tests ont été réalisés par le logiciel Minitab 18.1.

Chapitre 02 :

Résultats et discussion

Chapitre 02 : Résultats et discussion

Ce chapitre est consacré à nos résultats et à leur discussion. Il est divisée en trois parties fondamentales, la première partie concerne le rendement en huile essentielle, la deuxième concerne la caractérisation de l'huile essentielle de *Ruta graveolens*, la troisième partie présentera les résultats de l'activité antifongique de l'HE, sur les champignons phytopathogènes testés.

2.1. Rendement en huile essentielle de *Ruta graveolens*

Le rendement en huile essentielle extraite de la partie aérienne (feuilles, fleurs, rameaux) de la plante utilisée dans cette étude (*Ruta graveolens*), obtenue par hydrodistillation, est de 0.750 ± 0.057 %.

En comparant nos résultats avec ceux rapportés dans la littérature, nous remarquons que :

- ✚ **Attiaet al. (2018)**, a obtenu un rendement de 0,36 et 0,21% pour les feuilles et les fleurs, respectivement pour des échantillons de la même espèce (*Ruta graveolens*) soumis à une hydrodistillation à l'aide d'un appareil de type *Clevenger*.
- ✚ Par ailleurs, un rendement élevé de l'ordre de 1,29 % a été obtenu par **Reddy et Al-Rajab (2016)**, en utilisant les parties aériennes de la même espèce, et en utilisant la même technique d'extraction.
- ✚ **Ben Hadj Fredj et al. (2007)**, ont obtenu par hydrodistillation des feuilles et les tiges fraîches de la même espèce, collectée de la Tunisie, des rendements en huile essentielle de 0,30 % et 0,10 % respectivement. Ceci-laisse supposer que les feuilles sont plus riches en huiles essentielles que les tiges.
- ✚ Les rendements en huiles essentielles d'échantillons marocains ont enregistré des différences entre les organes végétaux de trois espèces analysées de la Rue (*Ruta chalpensis*, *Ruta graveolens* et *Ruta montana*). Les rendements de *Ruta chalpensis* varient de 0,06% en racines, 0,22 % dans les tiges, 3,37 % dans les feuilles, 3,86 % dans les fleurs. A propos de l'HE de *Ruta graveolens*, le rendement était de 0,07% en racines, 0,17% en tiges, 0,84 % pour les feuilles, et 1,13 %, pour les fleurs. Tandis que le rendement en HE de *Ruta Montana*, était de 0,08 % pour les racines, 0,09 % pour les

tiges, 0,85 % pour les feuilles et 2,24 % dans les fleurs (**Barbouchi et al., 2021**). Ces travaux confirment que les fleurs de la rue sont les organes les plus riches en huile essentielle.

✚ **França Orlanda et Nascimento (2015)**, signalent que l'huile essentielle obtenue par hydrodistillation d'un échantillon de feuilles fraîches de *R. graveolens* L. a une couleur verte avec un rendement de 1,29 %.

✚ **Semerdjieva et al. (2019)**, ont obtenu un rendement en HE des fruits séchés de *R. graveolens* de 0,39 %, et ils ont remarqué que la majorité de la quantité d'HE (31 % de la quantité total récupérée) est obtenue pendant la période de 30 à 60 minutes de distillation.

✚ **Boughendjioua (2019)**, a traité des échantillons de feuilles séchées de *Ruta chalpensis*L., collectées de la région de Souk-Ahras et a obtenu un rendement en HE de l'ordre de 0,65 %.

Les différences des rendements enregistrés d'huile essentielle de *Ruta graveolens* peuvent être attribuées à plusieurs facteurs notamment l'origine géographique de la plante, l'environnement (type de climat, sol, ...), le stade de la récolte et la méthode d'extraction.

2.2. Caractérisation des huiles essentielles de *Ruta graveolens*

2.2.1. Caractéristiques physico-chimiques

2.2.1.1. Analyse chromatographique sur couche mince (CCM)

La chromatographie sur couche mince a été réalisée sur des plaques de gel de silice comme phase stationnaire. Des chromatogrammes sous lumière UV (254 nm) de l'HE extraite des parties aériennes de *R. graveolens* ont montré la présence de nombreux spots. La **figure 11** et le **tableau 03** montrent les résultats de cette étude.



Figure 11: Plaques CCM obtenues pour l'huile essentielle de rue (*Ruta graveolens*)

Tableau 03: Fractionnement par CCM des extraits de rue (*Ruta graveolens*)
Dans le système d'élution

Nombre de spots	1	2	3	4
Facteur de rétention Rf (cm)	0,35	0,65	3,25	3,5

Les chromatogrammes des extraits huileux de *Ruta graveolens* sont montrés la présence de quatre taches bien distinctes, à facteurs de rétention (Rf) différents, montrant que cette huile renferme 04 composés majoritaires (**Tab. 03**), en plus d'autres composants chimiques avec des concentrations plus faibles. La composition détaillée de l'huile peut être obtenue par d'autres analyses plus précises, notamment la chromatographie en phase gazeuse (CPG).

Haddouchi et al. (2013), ont analysé l'huile essentielle de la même plante, collectée d'Annaba (Algérie) et ont trouvé qu'elle contient 81,08% de cétones aliphatiques et deux principaux composés qui sont le 2-undécanone (55,4%) et le 2-nonanone (21,62%).

Reddy et Al-Rajab (2016) ont rapporté que des HEs de la même espèce, collectée de la chine, contiennent principalement des cétones aliphatiques (80,04%), et les principaux composés sont le 2-undécanone (46,15%) et le 2-nonanone(27,01%).

De Feo et al. (2002) ont analysé l'huile essentielle de *R. graveolens L.*, collectée de l'Italie et ont signalé que cette huile contient principalement deux séries de cétones aliphatiques (83,4%), et les cétones majeures sont : le 2-undécanone (46,8%) et le 2-nonanone (18,8%).

Pour des échantillons de *R. graveolens L.* collectés de l'Egypte, **El-Sherbeny et al. (2007)**, ont signalé la présence, du 2-undécanone (50,50 %) et le 2-nonanone (17,47 %).

Pour *Ruta montana L.* l'huile essentielle est composée de cétones aliphatiques acycliques : 2-nonanone, 2-décanone, 2-undécanone, 2-dodécane et 2-tridécanone (**Fekhar et al., 2017**)

Bañuelos-Valenzuela et al. (2018) révèlent que l'analyse de l'huile essentielle de *Ruta graveolens* par la chromatographie en phase gazeuse (CPG), a permis de détecter plusieurs composés : le nonanone (18,8 %), le 2-undécanone (46,8 %), le 2-nonanone (18,8 %), le 2-décanone (2,2 %), le 2-tridécanone (2,5 %). Les terpénoïdes constituaient 11,2 % de l'huile avec l' α -pinène (1,3 %), le limonène (3 %) et le 1,8-cinéole (2,9 %) comme principaux mono terpènes.

2.2.1.2. Analyse par spectroscopie Infrarouge à transformée de Fourier (IRTF)

Cette technique permet d'identifier et de caractériser des pics distincts correspondant à des groupes de constituants présents dans l'huile essentielle.

Le spectre infrarouge se présente sous la forme d'une série de bandes d'absorption, fines et larges, dont l'axe des abscisses représente le nombre d'onde en cm^{-1} et la direction axiale de droite à gauche (de 4000 à 400 cm^{-1}). L'axe des ordonnées est vers le haut et l'absorbance est exprimée en pourcentage.

En pratique, on ne cherche pas à identifier toutes les bandes de fréquences en raison de leur grand nombre. Il suffit juste de vérifier la présence ou l'absence de caractéristiques de bandes pour un groupe fonctionnel donné.

En interprétant les spectres infrarouges, il est possible de déterminer les groupes fonctionnels contenus dans la molécule : alcools, aldéhydes, cétones, acides, etc., ainsi que les liaisons entre les atomes de carbone de la chaîne, en indiquant les principales bandes de vibrations et en s'appuyant sur les tables fournies.

La **figure 12** montre le spectre IRTF de l'huile essentielle de rue (*Ruta graveolens*), testée dans cette étude.

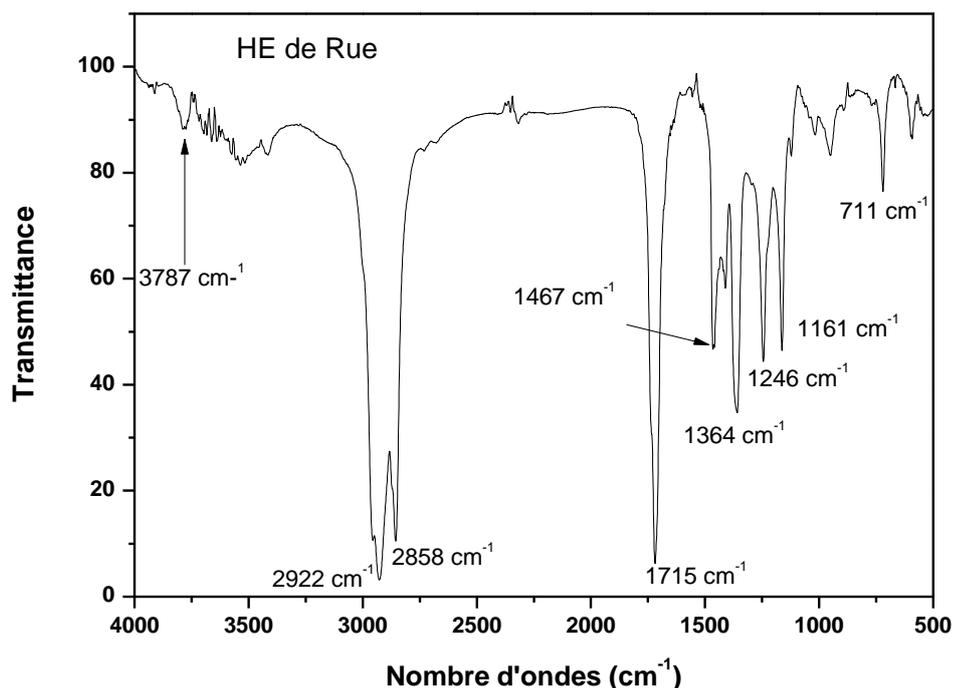


Figure 12 : Spectre IRTF de l'HE de *Ruta graveolens* enregistré dans la région 4000 – 400 cm^{-1}

L'examen des résultats d'analyse par spectroscopie infrarouge, pour l'HE de la rue (*Ruta graveolens*), représentés sur le spectre ci-dessus (**Fig. 12**) montre que cette huile présente plusieurs pics, traduisant une forte absorption à différentes bandes. L'identification des constituants se fait en fonction des bandes observées (**Jeyachandran et al., 2014 ; Bañuelos-Valenzuela et al., 2018**).

L'observation générale du spectre IRTF enregistré dans la région 4000-400 cm^{-1} permet de noter la présence des plusieurs pics d'absorption dont les plus importants sont :

- Plusieurs pics d'absorption situés dans la région 3800 - 3000 cm^{-1} avec un pic plus ou moins important localisé à 3787 cm^{-1} . Cette bande pourrait être attribuée à la liaison **O-H** d'un **alcool lié**.
- Une bande large et forte à 2922 cm^{-1} entre [2500-3200] cm^{-1} attribuée à l'élongation de la liaison hydroxyle **O-H** de l'**acide carboxylique**.
- Une bande d'absorption intense localisée à 1715 cm^{-1} attribuée au groupement carbonyle **C=O**. En effet les vibrations dans la région [1700 cm^{-1} à 1740 cm^{-1}], sont caractéristiques aux vibrations de la fonction **ester**. La présence de cette fonction justifiée par les trois pics à 1160, 1246 et 1364 cm^{-1} qui caractérisent l'élongation de la liaison **C-O** d'un **ester** ou d'**une cétone**.
- La partie des spectres allant de 1400 à 1500 cm^{-1} se compose d'une bande d'absorption située à 1467 cm^{-1} . Cette bande est attribuée à la liaison **C=C** **des cycles aromatiques**.
- L'insaturation et l'aromaticité est confirmé par la présence des bandes de vibration de déformation en dehors du plan vers 700 cm^{-1} .

L'analyse par spectroscopie Infrarouge a permis de révéler que l'HE de Rue contient de nombreuses fonctions chimiques qui sont principalement des cétones, des alcools, des alcènes, des aromatiques et des esters. Les résultats de ce test sont en adéquation avec ceux obtenus par l'analyse CCM, et avec ceux rapportés dans la littérature. En effet, il a été rapporté que l'HE de *R. montana*, contient principalement : le 2-undécanone (fonction chimique : cétone, composé majoritaire), 2-décanone (cétone), 2-dodécanol (alcool), et des traces de : nonanal (aldéhyde), α -pinène (monoterpène bicyclique), camphène (monoterpène bicyclique),...

2.2.1.3. Spectroscopie UV-visible

L'analyse par spectroscopie UV-Vis., nous permet de faire un balayage de longueur d'onde entre 200 et 800 nm pour détecter les bandes d'absorption caractéristiques de l'huile essentielle de *Ruta graveolens*.

La dilution de l'huile essentielle de *Ruta graveolens* dans le cyclohexane permet d'enregistrer un maximum d'absorption vers $\lambda = 264$ nm et 222 nm.

Le spectre d'absorption UV-visible de notre extrait végétal est représenté sur la **figure 13**.



Figure 13 : Spectre UV-visible de l'HE de *Ruta graveolens*

Maatallah (2007) signale que l'huile essentielle de *Ruta montana* montre un profil de spectre UV avec un maximum d'absorption à 254 nm et un épaulement à 360 nm caractéristiques d'une flavonol.

2.2.1.4. Indice d'acide, indice de réfraction et pH

Le **tableau 04** affiche les résultats des tests chimiques relatifs aux caractéristiques chimiques de l'huile essentielle de *R. graveolens* obtenues dans cette étude, comparées à celles de *R. chalepensis*, rapportées dans la littérature.

Tableau 04 : Propriétés physico-chimiques des huiles essentielles de *R. graveolens* comparées à celles de *R. chalepensis*.

Paramètres étudiés	Notre étude (<i>R. graveolens</i>)	<i>Ruta chalepensis</i> (Bendriss, 2003)
Indice d'acide	2,805	2,32
Indice de réfraction	1,4249	1,5326
pH	5,2	-

En comparant nos résultats avec ceux rapportés dans la littérature, nous remarquons que :

- Pour *Ruta graveolens*, l'indice d'acidité enregistré dans cette étude $I_a = 2,805$, est supérieure à celui obtenu par **Bendriss (2003)**, pour *Ruta chalepensis* (2,32) et il est inférieur à celui obtenu par **Maatallah (2007)**, pour *Ruta montana*, pour laquelle il a enregistré un indice d'acide de 3.64.
- Pour l'indice de réfraction, la valeur enregistrée pour *Ruta graveolens* est de l'ordre de 1,4249, et il est inférieur à celui obtenu par **Bendriss (2003)**, pour *Ruta chalepensis* (1,5326), et à celui obtenu par **Maatallah, (2007)**, pour *Ruta montana* (1,6329).

2.2.2. Propriétés organoleptiques

L'observation des huiles essentielles obtenues dans notre étude, par hydro distillation, montre que l'HE de la rue (*Ruta graveolens*) est de couleur jaune pâle (**Tab. 05 et Fig. 14**) avec une odeur propre à la matière végétale, forte, fraîche et épicée, et un aspect mobile et limpide.

Tableau 05: Propriétés organoleptiques de l'huile essentielle de *Rutagraveolens*

	Couleur	Odeur	Aspect	Saveur
<i>Ruta graveolens</i>	Jaune Pâle	Forte odeur, fraîche et épicée	Liquide limpide	Aromatique



Figure 14 : Aspect physique de l'HE de *Ruta graveolens* obtenue dans cette étude

2.3. Evaluation de l'activité antifongique de l'huile essentielle de *R. graveolens*

2.3.1. Effets de l'huile essentielle de *R. graveolens* sur *Botrytis cinerea*

Le résultat obtenu pour le test *in vitro* de l'activité antifongique de l'huile essentielle de *Ruta graveolens* L. sur la croissance mycélienne de *Botrytis cinerea* est représenté dans la **figure 15**.

Aucun effet antifongique n'a été observé pour ce pathogène aux volumes 5 μ l, 10 μ l et 20 μ l ; l'inhibition de la croissance du champignon confronté à l'huile n'a été observée qu'à partir de 40 μ l d'huile. Au-delà de ce volume, l'inhibition est remarquable, et les diamètres enregistrés sont importants et dépassent 1 cm.

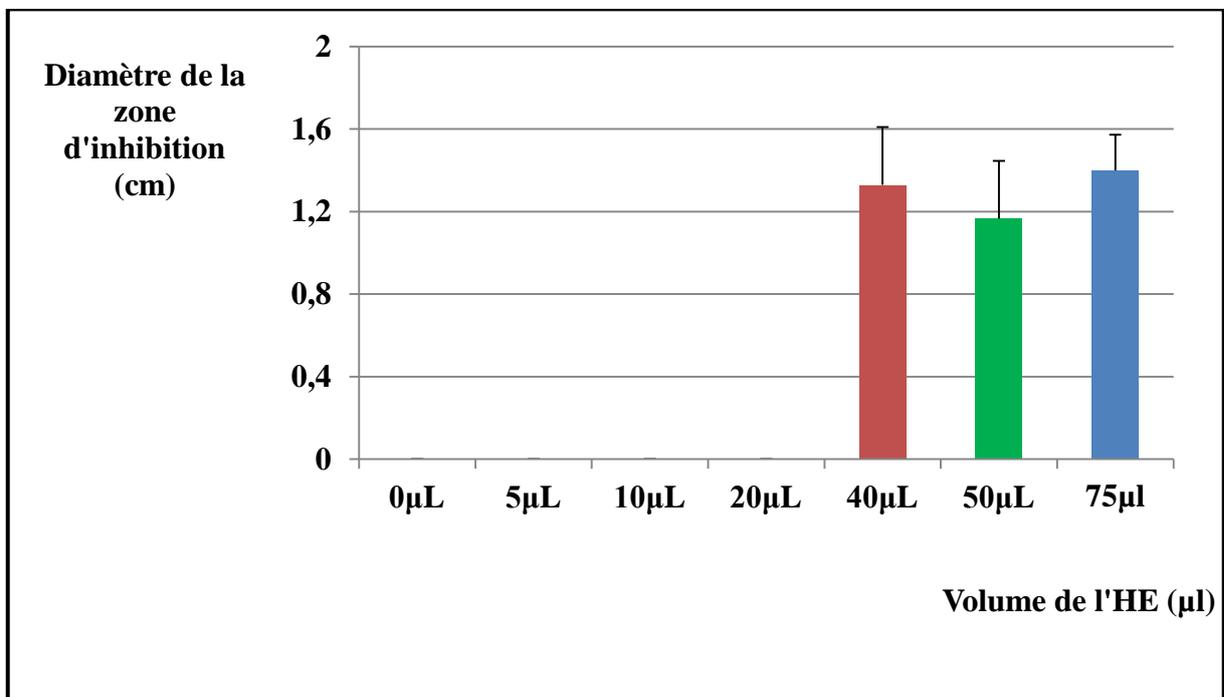


Figure 15 : Résultats du test de confrontation de *Botrytis cinerea* avec l'huile essentielle de rue (*Ruta graveolens*)

Plusieurs auteurs ont montré que les champignons aériens sont plus sensibles vis-à-vis des traitements antifongiques que les champignons telluriques et notamment vasculaires (**Spiga, 2016**). *Botrytis cinerea* s'est révélé sensible vis-à-vis de l'extrait utilisé. **Celikel et Kavas (2008)**, signalent que le classement de la sensibilité des champignons aux extraits se fait en fonction du diamètre de la zone d'inhibition de la croissance au voisinage de l'extrait testé :

- Si le diamètre est inférieur à 8 mm, la souche est considérée non sensible (résistante) et l'extrait n'a pas d'effets sur cette souche.
- Si le diamètre est entre 9 et 14 mm, la souche est considérée sensible.
- Si le diamètre est entre 15 et 19 mm, la souche est considérée très sensible.
- Si le diamètre est supérieur à 20 mm, la souche est considérée extrêmement sensible.

Hammana et Necib (2021) ont testé la même huile sur des souches d'*Alternaria alternata* et *Penicillium expansum* et ils ont obtenu une activité de cette huile à de faibles doses de 2,5 µl.

L'analyse de la variance (**Tab. 06**) a affiché des différences très hautement significatives entre les volumes de l'huile de *Ruta graveolens* à l'égard de *Botrytis cinerea*.

Tableau 06: Résultats de l'analyse de la variance pour *Botrytis cinerea* confronté à l'huile de *Ruta graveolens*

Sources de variations	DL	SCE	CM	Valeur de F	Valeur de P
Volumes d'huile	2	3,3756	1,68778	44,68	0,000 ***
Erreur	6	0,2267	0,03778		
Total	8	3,6022			

DL : Degrés de liberté

SCE : Somme des carrés des écarts

CM : Carré moyen

F : Valeur observée de F de Fisher

P : Probabilité de mettre en évidence des différences significatives

*** $p < 0.001$: différences très hautement significatives.

Le test de Dunnett (**Tab. 07**) a montré des différences significatives entre le témoin et les volumes 40 µL, 50 µL et 75 µL et des différences non significatives entre le témoin et les volumes 5 µL, 10 µL et 20 µL pour cette huile de *Ruta graveolens* contre *Botrytis cinerea*.

Tableau 07 : Résultats du test de Dunnett pour *Botrytis cinerea* confronté à l'huile de *Ruta graveolens*

Volume d'HE	0 μ L	5 μ L	10 μ L	20 μ L	40 μ L	50 μ L	75 μ L
$\bar{X} \pm \sigma$	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0 NS	0.0 \pm 0.0 NS	0.0 \pm 0.0 NS	1.33 \pm 0.28 *	1.166 \pm 0.288 *	1.4 \pm 0.173 *

NS : différences non significatives.

* : différences significatives ($\alpha = 0.05$).

2.3.2. Effets de l'huile testée sur *Fusarium roseum*

Le résultat de ce test est affiché dans la **figure 16**.

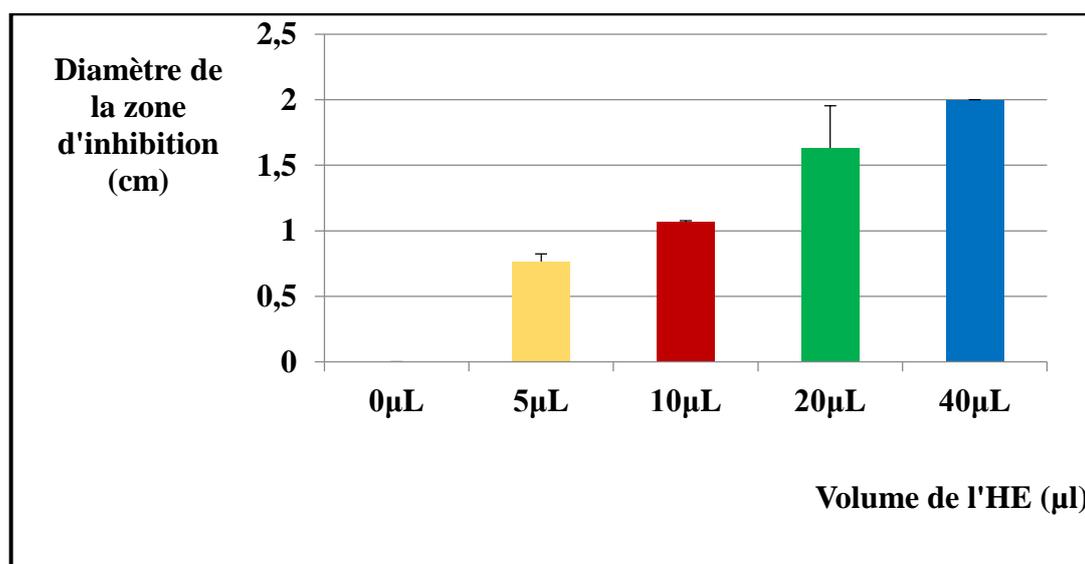


Figure 16 : Résultats du test de confrontation de *Fusarium roseum* avec l'huile essentielle de *Ruta graveolens*.

L'huile essentielle de *Ruta graveolens*, a enregistré un pouvoir antifongique plus ou moins modéré, contre *Fusarium roseum*, aux volumes 5 μ l et 10 μ l, avec des diamètres des zones d'inhibitions de l'ordre 0,8 cm et 1,1cm, alors que pour les volumes 20 μ l et 40 μ l les zone d'inhibition était très franche (1.6 et 2cm, respectivement).

Reddy et Al-Rajab (2016), révèlent que *Fusarium oxysporum* a montré une inhibition de la croissance, au contact de cette huile essentielle, avec des zones d'inhibition de l'ordre de 20.02 ± 0.06 mm.

Allouni (2018), a testé l'effet des extraits de *Ruta montana* sur la croissance de *Fusarium oxysporum* et a montré que l'inhibition de la croissance augmente proportionnellement avec la concentration des extraits.

Le traitement statistique des résultats (**Tab. 08**) a révélé des différences très hautement significatives entre les volumes d'huile pour *Fusarium roseum* confronté à l'huile de *Ruta graveolens*.

Tableau 08: Résultat de l'analyse de la variance pour *Fusarium roseum* confronté à l'huile essentielle de *Ruta graveolens*.

Sources de variations	DL	SCE	CM	Valeur F	Valeur de p
Volumes d'huile	4	6,7760	1,69400	31,37	0,000 ***
Erreur	10	0,5400	0,05400		
Total	14	7,3160			

DL : Degrés de liberté

SC E : Somme des carrés des écarts

CM : Carré moyen

F : Valeur observée de F de Fisher

P : Probabilité de mettre en évidence des différences significatives

*** $p < 0.001$: différences très hautement significatives.

Le test de Dunnett (**Tab. 09**) a montré des différences significatives entre le témoin et tous les volumes testés pour cette huile de *Ruta graveolens* contre *Fusarium roseum*.

Tableau 09 : Résultats du test de Dunnett pour *Fusarium roseum* confronté à l'huile de *Ruta graveolens*

Volume d'HE	0 μ L	5 μ L	10 μ L	20 μ L	40 μ L
$\bar{X} \pm \sigma$	0.0 \pm 0.0	0.766 \pm 0.057 *	1.066 \pm 0.011 *	1.633 \pm 0.321 *	2 \pm 0 *

* : différences significatives ($\alpha = 0.05$).

2.3.3. Effets de l'huile testée sur *Aspergillus niger*

La **figure 17** affiche le résultat du test de l'activité antifongique de l'huile essentielle sur *Aspergillus niger*.

Aucune croissance n'a été observée pour le champignon *Aspergillus niger* au contact de l'huile essentielle de *Ruta graveolens*, et ce pour tous les volumes testés : 5 μ l, 10 μ l, 20 μ l et 40 μ l, avec une zone d'inhibition de 9 cm de diamètre (diamètre de la boîte de Pétri).

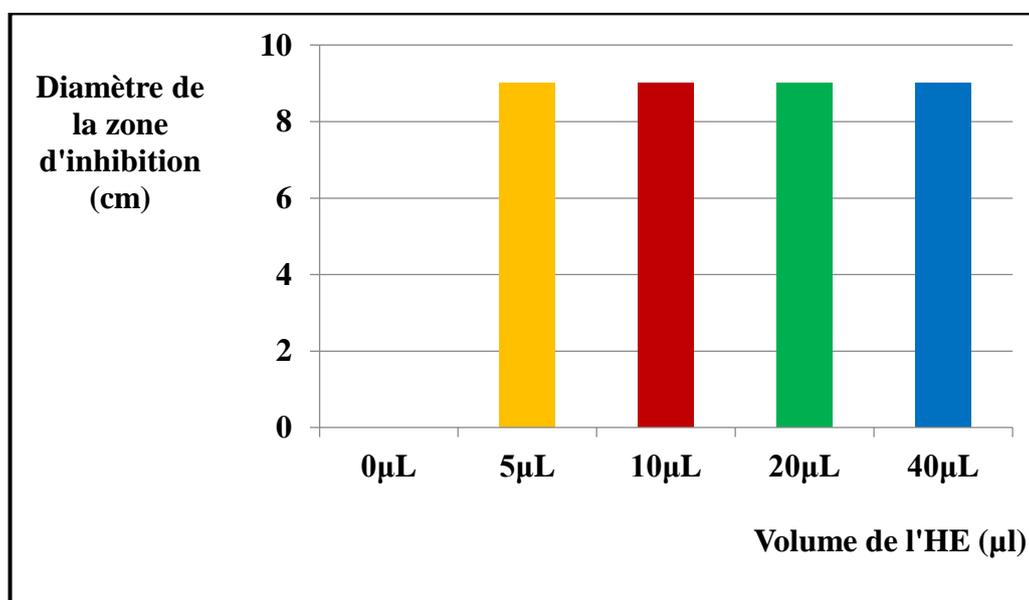


Figure 17: Résultats du test de confrontation d'*Aspergillus niger* avec l'huile essentielle de *Ruta graveolens*

- **Nahar et al. (2021)** ont obtenu, pour ce champignon des zones d'inhibition de 12 mm de diamètre, en présence de l'huile essentielle de *Ruta montana* L.
- **Reddy et Al-Rajab (2016)**, ont enregistré pour *Aspergillus flavus* des zones d'inhibition de la croissance de l'ordre de 25.60 ± 0.02 mm de diamètre, en présence de l'huile essentielle de *Ruta graveolens*. Une activité moindre a été signalée contre *A. fumigatus* ($14,30 \pm 0,06$ mm).
- Les résultats de l'activité antifongique des différents extraits de *Ruta montana*, réalisés par **Allouni (2018)**, indiquent que la sensibilité d'*Aspergillus niger* augmente en fonction de l'augmentation de la concentration d'HE dans le milieu.

Le traitement statistique des résultats (**Tab. 10**) a montré des différences significatives entre les volumes d'huile, pour *Aspergillus niger* confronté à l'huile de *Ruta graveolens*.

Tableau 10: Résultat de l'analyse de la variance pour *Aspergillus niger* confronté à l'huile de *Ruta graveolens*.

Sources de variations	DL	SCE	CM	Valeur F	Valeur de p
Volumes d'huile	4	194,400	48,6000	*	*
Erreur	10	0,000	0,0000		
Total	14	194,400			

DL : Degrés de liberté

SCE : Somme des carrés des écarts

CM : Carré moyen

F : Valeur observée de F de Fisher

P : Probabilité de mettre en évidence des différences significatives

* $p < 0.05$: différences significatives.

Le test de Dunnett (**Tab. 11**) a affiché des différences significatives entre le témoin et les différents volumes d'huile de *Ruta graveolens* pour *Aspergillus niger*.

Tableau 11 : Résultats du test de Dunnett pour *Aspergillus niger* confronté à l'huile de *Ruta graveolens*.

Volume d'HE	0 μ L	5 μ L	10 μ L	20 μ L	40 μ L
$\bar{X} \pm \sigma$	0.0 \pm 0.0	9 \pm 0.0 *	9 \pm 0.0 *	9 \pm 0.0 *	9 \pm 0.0 *

* : différences significatives ($\alpha = 0.05$).

Conclusion

Conclusion

Actuellement, le secteur agricole est devenu un système de production intensif. Cette situation a posé de nombreux problèmes environnementaux et de santé humaine et a conduit au développement de la résistance des agents pathogènes aux molécules chimiques utilisés. Les plantes médicinales et aromatiques constituent une source fiable d'ingrédients actifs reconnus pour leurs propriétés thérapeutiques. La rue (*Ruta graveolens*) est une espèce spontanée, très abondante en Algérie, et fait partie des plantes utilisées dans la médecine traditionnelle algérienne ; cependant peu de travaux sont réalisés sur les propriétés phytopharmaceutiques de cette espèce.

Cette étude a visé pour objectifs, d'étudier le rendement en huile essentielle de la rue, collectée de la région de Guelma (Nord-Est de l'Algérie), de faire une caractérisation physicochimique et organoleptique de cette huile essentielle, et déduire son pouvoir antifongique à l'égard de quelques champignons phytopathogènes.

Les résultats obtenus ont montré que le rendement moyen des parties aériennes de cette plante est de l'ordre de $0,75 \pm 0,057\%$, et il est plus ou moins similaire à ceux rapportés dans la littérature.

Les analyses organoleptiques ont montré que cette huile est de couleur jaune pâle, une odeur forte, fraîche et épicée, et a une saveur aromatique.

Cette huile se caractérise par un pH acide, un indice d'acide de 2,805 et un indice de réfraction de 1,4249.

L'analyse chromatographique par CCM a montré que l'huile essentielle de *Ruta graveolens* contient les composés chimiques suivants : 81,08% de cétones aliphatique et les principaux composés sont, le 2-undécanone (55,4%) et le 2-nonanone (21,62%).

Les analyses spectroscopiques par IR et UV-Visible nous ont permis d'identifier les fonctions organiques présentes dans la composition de cette huile essentielle ; un profil de spectre UV observé avec un maximum d'absorption à 254 nm et un épaulement à 360 nm caractéristiques d'une flavonol. L'analyse IRTF, a révélé la présence d'alcools, d'aldéhydes, de cétones, d'acides, etc...

A propos de son pouvoir antifongique, les résultats obtenus ont montré que, l'huile essentielle de *Ruta graveolens* a une activité antifongique importante, à l'égard des trois espèces de champignons phytopathogènes testées (*Botrytis cinerea*, *Fusarium roseum* et *Aspergillus niger*), notamment *A. niger*.

A la lumière de ces résultats, nous pouvons conclure que cette étude confirme l'intérêt des H.E. et apporte ainsi un héritage à préserver, développer et valoriser, à condition que nos résultats, en conjonction avec les études précédemment menées, constituent une base importante pour leur développement dans le domaine phytopharmaceutique.

Au terme de cette étude, il serait intéressant de faire :

- Des études similaires sur l'activité antibactérienne des huiles essentielles de la rue, ainsi que sur son activité antifongique contre d'autres champignons phytophages.
- Etendre la recherche et l'expérimentation d'autres types d'huiles essentielles ou d'extraits d'autres plantes et déterminer leurs capacités antimicrobiennes, voire insecticides en vue de leur utilisation comme moyen de lutte biologique dans le domaine phytopharmaceutique pour limiter l'usage des pesticides et réduire leur Effets non intentionnels sur l'environnement et la santé publique.

Références bibliographique

Références bibliographique

- **Agrios, G.N. (2005)**. Plant Pathology. 5th Edition, Elsevier-Academic Press. San Diego. C.A. : p 04.
- **Alloun, K. (2013)**. Composition chimique et L'activité antioxydant et antimicrobienne des huiles essentielles de l'aneth (*Anethum graveolens L.*), de la sauge (*Salvia officinalis L.*) et de la rue des montagnes (*Ruta montana L.*). Thèse de magister en agronomie, alimentation et nutrition, département de technologie alimentaire, ENSA El-Harrach .Alger : p1-29.
- **Allouni, R. (2018)**. Etude des aspects morphologique, phytochimique et pharmacotoxicologique de la plante *Ruta montana* .thèse de doctorat en sciences, département de biochimie, faculté des sciences de la nature et de vie, université Ferhat Abbas Sétif 1: p 71.
- **Amirat, N., Tebboun, S., Sebti, M., (2011)**. Effets insecticides des huiles essentielles chémotypées de deux plantes aromatiques *lavandula stoechas* et *origanum glandulosum* du la région de Jijel : p1.
- **Athamnia, L., Djaibet, C., et Zaghdoudi, C., (2018)**. Etude de l'activité antifongique des huiles essentielles de *Rosmarinus officinalis L.* et de *Thymus capitatus L.* sur des agents d'Otomycose : cas d'*Aspergillus Niger*. Mémoire de Master en sciences biologiques. Département de biologie, université 08 Mai 1945 de Guelma : 18 p.
- **Attia, E., Abd El-Baky, R., Desoukey, S., Mahmoud, A., Bishr, M., et al., (2018)**. Chemical composition and antimicrobial activities of essential oils of *Ruta graveolens* plants treated with salicylic acid under drought stress conditions. Future journal of pharmaceutical sciences : p 255-257.
- **Attou, A. (2011)**. Contribution à l'étude phytochimique et activités biologique des extraits de la plante *Ruta chalpensis* (fidjel) de la région d'Ain T'émouchent. Mémoire en vue de l'obtention du diplôme de magister en biologie, option de produits naturels activités biologique et synthèses, département de biologie, faculté des sciences de la

nature et de la vie et des sciences de la terre et de l'univers, université Aboubakr Belkaid Tlemcen : p4.

- **Barbouchi, M., Benzidia, B., Choukrad, M., (2021).** Chemical variability in essential oils isolated from roots, stems, leaves and flowers of three *Ruta* species growing in Morocco. Journal of king saud university – Science : 6 p.
- **Belhachat, D. (2011).** Etude phytochimique des extraits de *Pistacia lentiscus (L)*, activité antioxydant, antimicrobienne et insecticide .Thèse de doctorat en agronomie, département de technologie alimentaire, école nationale supérieure agronomique- El-Harrach-Alger : p 10-15.
- **Ben Hadj Fredj, M., Marzouk, B., Chraief, I., Boukef, K., Marzouk, Z.(2007).** Analysis of tunisian *Ruta graveolens L.* oils from jemmell. Journal of food, agriculture ; Environment Vol.5 (1) : p 5-53.
- **Benali, T., Chtibi, H., El yamani, M.,Marmouzi, I.,Khabach, A. et al., (2020) .** Effect of extraction solvent on total phenol content, total flavonoids content, antioxidant and antimicrobial activities against phytopathogenic and foodborne pathogens bacteria of *Ruta montana* extracts, Mor. J. Chem. 8 N°2 : 552-559.
- **Benazzouz, M. (2011).** Les huiles essentielles, importance et potentialités mise à jour bibliographie des dernières recherches sur leurs emplois et toxicité et analyse de la composition des huiles essentielles de quinze plantes des plus consommées au Maroc. Thèse du doctorat, facultés de la médecine et de pharmacie rabat, université Mohammed V : p32-33.
- **Bendriss, H. (2003).** Valorisation des extraits des plantes aromatiques et médicinales de *ruta chalepensis* et *marrubium vulgan*. Magistère en génie de procédés, option génie chimique, département génie de procédés, université de hassiba ben bouuali- chlef : p87.
- **Benziane maatallah, M. (2007).** Screening photochimique de la plante *Ruta montana* extraction de l'huile essentielle de la rutine, activité antioxydant de la plante. Thèse de magistère, Option chimique organique, Département de chimie, université d'Oran ES-SENIA : p 3- 63.
- **Boughendjioua, H. (2019).** Yield chemical composition and antibacterial activity of *Ruta chalepensis L.* essential oil growing spontaneously in Algeria, pharmacy & pharmacology international journal, education, skikda, 21000, Algeria: p 34.

- **Boukedjar, R. et Bouhalfaya, I. (2021).** Extraction et caractérisation physico-chimique de l'huile essentielle de la plante *Peganum harmala*. Mémoire de master, département de sciences biologique, université Mohamed El Bachir El Ibrahimi - B.B.A : p 10-15.
- **Bañuelos-Valenzuela¹, R., Delgadillo-Ruiz, L., Echavarría-Cháirez, F., Delgadillo-Ruiz, O., Meza-López¹, C., (2018).** Chemical composition and frit of ethane extracts of *Larrea tridentata*, *Origanum vulgare*, *Artemisa ludoviciana* and *Ruta graveolens*: p 317-319.
- **Celikel, N., et Kavas, G., (2008).** Antimicrobial properties of some essential oils against some pathogenic microorganisms, Vol. 26, No. 3: 174–181: p 176.
- **De Feo, V., De Simone, F., et Senatore, F., (2002).** Potential allelo chemicals from the essential oil of *Ruta graveolens*, 61, 573–578.
- **Doerper, S. (2008).** Modification de la synthèse des furocoumarines chez *Ruta graveolens* L. par une approche de génie métabolique. Thèse de doctorat pour obtention de docteur de INPL en sciences agronomiques, sciences agricoles, institut national polytechnique de Lorraine, laboratoire agronomie et environnement, université Nancy : p 34.
- **El-Sherbeny, S.E., Khalil, M.Y., et Hussein, M.S., (2007).** Growth and productivity of Rue (*Ruta graveolens*) under different foliar fertilizers application, journal of applied sciences research, 3(5): 399-407: p 405.
- **Eman, A.M., Hosam, O.E., Diao, O.E., Fahed, A.A., (2020).** Elevated Bioactivity of *Ruta graveolens* against cancer cells and Microbes Using Seaweeds: p 1.
- **Engonga, O.L. (2009)** .Etude photochimique, activités antimicrobiennes et antioxydants de quelques plantes aromatiques et médicinales africaines. Thèse de doctorat unique en sciences biologiques appliquées, université de Ouagadougou, unité de formation et de recherche sciences de la vie et de la terre (UFR-SVT) : p 7-16.
- **Errami, M. (2012).** Devenir atmosphérique de bupirimate et transfert de ses métabolites (les dizines) dans l'atmosphère, sa dissipation dans les fruits de tomate et

sa dégradation électrochimique. Thèse en cotutelle pour l'obtention de grand docteur de l'université Ibn Zohr, spécialité science d'Ingénieur, Qualité de l'environnement, université de Reims Champagne-Ardenne, école doctorale sciences, technologie, santé : p 5.

- **Fekhar, N., Boutoumi, H., Krea, M., et al., (2017).** Thonation of essential oils from algerian *artemisia herba – alba L.* and *Ruta montana L.*: impact on their antimicrobial and insecticidal activities, 12(2), 50-57: p 52.
- **Fertout, M.N. (2015).** Ecophytochimie d'un labiée (*Teucrium polium*) des monts de tessala Algérie accidentelle .Thèse de doctorat en sciences , biodiversité végétale et valorisation , département des sciences de l'environnement , université Djilali liabes de sidi bel abbes : p50-60.
- **França Orlanda, J.F., Nascimento, A.R., (2015).** Chemical composition and antibacterial activity of *Ruta graveolens L.* (Rutaceae) volatile oils, from São Luís, Maranhão, Brazil., 1300 Center, 65901-480 Imperatriz, MA, Brazil : p 104.
- **Haddouchi, F. (2013).** Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oils from four *Ruta* species growing in Algeria , Article in Food Chemistry , 141 253–258 :p 255.
- **Hammana, S., Necib, S., (2021).** Etude de l'effet antifongique des huiles essentielles de trois plantes d'*Eucalyptus camaldulensis*, *Rosmarinus officinalis* et *Ruta graveolens*. Mémoire de master en sciences biologiques, en microbiologie appliquée, département de biologie appliquée, faculté des sciences exactes et des sciences de la nature et de la vie : p 49.
- **Hazzit, M., Benchabane, A., Baaliouamer, A., Alloun, K., Kaci, M., (2015).** Composition chimique et activité antimicrobienne de l'extrait non volatil et des huiles essentielles de la rue des montagnes (*Ruta montana L.*) .Article N° 27 : p118.
- **Heit, S. (2015).** Identification de *Fusarium* et détection des mycotoxines associées par maldi-tof. Thèse de doctorat en Pharmacie, faculté de pharmacie, université de lorraine : p15.
- **Hessas, T. et Simoud, S. (2018).** Contribution à l'étude de la composition chimique et à l'évaluation de l'activité antimicrobienne de l'huile essentielle de *Thymus sp.* Thèse de

doctorat en pharmacie, département de pharmacie, faculté de médecine Tizi-Ouzou, université Mouloud Mammeri : p 54-63.

- **Jeyachandran, S., Oyyappan, D. et Baskaralingam, V., (2014).** Discrete Nanoparticles of *Ruta graveolens* Induces the Bacterial and Fungal Biofilm Inhibition, Cell Communication & Adhesion, 21:4, 229-238, DOI: 10.3109/15419061.2014.926476 : p 232.
- **Merghache, S., Hamza, M., Tabti, B., (2009).** Etude physicochimique de l'huile essentielle de *Ruta Chalepensis* L. de Tlemcen, Algérie. Afrique science 05(1) 67 – 81 : p 68-59.
- **Nahar, L., El-Seedi, H.R., Khalifa, S.A.M., Hosseini, M., et Sarker, S.D., (2021).** Ruta Essential Oils: Composition and Bioactivities. Molecules, 26 (16) : p 16.
- **Puis, N. (2015).** Etude chimique et biologique des huiles essentielles de coriandre, de fenouil et de persil. Thèse de doctorat en science, département de chimie, faculté de la science exacte et appliquées, université d'Iran 1, MESRS: p 8-9.
- **Reddy, D.N., Al-Rajab, A.J., (2016).** Chemical composition, antibacterial and antifungal activities of *Ruta graveolens* L. volatile oils. Cogent Chemistry 2(1) : p 4.
- **Reghaissia, I. (2020).** Extraction et caractérisation de l'huile essentielle de l'*Eucalyptus Globulus* : Application comme insecticide. Mémoire de master en chimie, Faculté des Sciences et de la Technologie, Département : Génie des Procédés, université 8 Mai 1945 Guelma : p 35.
- **Remmal, A., Bouchikhi, T., Rhayour, K., Ettayebi, M., et Tantaoui, A., (2014).** Improved Method of the determination of antimicrobial activity of essential oils in Agar medium. Journal of essential oil Reseach. 5 (2) : 179- 184.
- **Semerdjieva, I., Burducea, M., Astatkie, T., Zheljazkov, V., Dincheva, I., (2019).** Essential Oil Composition of *Ruta graveolens* L. Fruits and Hyssopus officinalis Subsp. aristatus (Godr.) Nyman Biomass as a Function of Hydrodistillation Time, Molecules 24, 4047, Mendeleev 12, 4000 Plovdiv, Bulgaria: p 3.
- **Sharifi, Y., Omran, V., Ghavami, T., Gharakhili, G., Zadeh M., (2019).** Effet of Salicylic acid on Phenols and flavonoids content and DPPH scavenging activity in cell suspension culture of Iranian sodab (*Ruta graveolens*). Tabari Biomed Stu Res J.1(4): p 18.

- **Soylu, E., kurt, S., et soylu, 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.
- **Spiga, N. (2016).** Effet in vitro de l'extrait méthanolique des feuilles et des tiges de *Ruta chalepensis*, *Ruta angustifolia* et *Applophyllum tuberculatum* vis-à-vis de *Fusarium oxysporum f. sp. Radicis lycopersici*, *Alternaria solani*, *botrytis cinerea* et *pectobacterium cacarotovororum*. Master en sciences agronomiques, Faculté des sciences de la nature et de la vie, université Abdelhamid Ibn Badis-Mostaganem : p 74.
- **Vásquez, H. (2017).** Stimuler les défenses des plantes contre *Botrytis cinerea* par des rayonnements UV-C. Thèse de physiologie végétale pour obtenir le grade de docteur de l'université d'Avignon et des pays de Vaucluse, laboratoire de recherche physiologie des fruits et légumes, université d'Avignon et des Pays de Vaucluse : p 8- 10.

Liste des sites

[1]:(https://www.google.com/url?sa=i&url=https%3A%2F%2Fhoseito.com%2Fproducto%2Frutamontanal%2F&psig=AOvVaw3przcfpTQVOKranuPVyuB&ust=1654004609518000&source=images&cd=vfe&ved=0CAwQjRxqFwoTCMDx_b2th_gCFQAAAAAdAAAAABAE)/consulté le 30-5-2022.

[2]:(https://www.florealpes.com/photos/rutachalepensis_2.jpg?25122021192009&PHPSESSID=0a72039f5036d91c7df80dd406b795b0)/Consulté le 2-4-2022.

[3]:(https://www.google.com/url?sa=i&url=https%3A%2F%2Fwww.rarepalmseeds.com%2Frutagraveolens&psig=AOvVaw05GmKOGlyrJz2tbw34Xkzs&ust=1654004063383000&source=images&cd=vfe&ved=0CAwQjRxqFwoTCKDJm7urh_gCFQAAAAAdAAAAABAU)/consulté le 30-5-2022.

[4]: (<https://c8.alamy.com/comp/2H3HPAG/rue-ruta-graveolens-rue-2H3HPAG.jpg>). / Consulté le 2-4- 2022

[5] : <https://www.dcwguelma.dz/fr/index.php/wilaya-guelma> / consultée le 10-6-22.

[6] : <file:///C:/Users/MON%20PC/Desktop/fusarium%20reference.pdf> ./consultés le 7-6-2022.

[7]:<https://www.syngentaseedcare.com/fr/farmore/legumes/maladies/aspergillus/aspergillus-niger>. /Consultés le 21-5-2022.