

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET PUPULAIRE
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

UNIVERSITE DE JIJEL

Faculté des Sciences Exactes et des
Sciences de la Nature et de la vie
Département de Biologie animale
et végétale



جامعة جيجل

كلية العلوم الدقيقة وعلوم الطبيعة والحياة

قسم : البيولوجيا النباتية والحيوانية

Mémoire de fin d'études

En vue de l'obtention du diplôme : Master en biologie

Option : Phytopharmacie et Gestion des Agro-systèmes

جامعة محمد الصادق بن يحيى
كلية علوم الطبيعة والحياة
المكتبة
رقم الجرد : 1795

Thème

*Effet fongicide des huiles essentielles
d'Origanum glandulosum*

Jury :

Président : M^{me}. Bouziane F.

Examineur : M^{me}. Mekircha F.

Encadreur : M. Sebti M.



Présenté par :

Denni Nabila

Session : juillet 2011

REMERCIEMENT

Merci à dieu de nous avoir donnés de la volonté, et de la patience pour réaliser ce travail.

Il nous paraît juste, d'exprimer notre profonde gratitude à tous ceux qui de près ou de loin ont participé à la réussite de notre travail de fin d'étude.

*Remerciement spécial à Mr. **SEBFI MOHAMMED** notre encadreur qui n'a jamais cessé de nous témoigner et pour sa disponibilité de tous les instants et sa précieuse aide.*

*Nous remercions **M Bouziane** pour son aide. Sans oublier de remercier les personnages du laboratoire de biologie.*

A tous les enseignants de phytopharmacie au niveau de l'université de Jije, et tous les étudiants de la phytopharmacie.

Nous ne saurions terminer sans présenter nos vifs remerciements à tous les membres du jury pour qui nous ont fait d'avoir accepté de diriger ce travail.

NABILA

Sommaire

I- Partie bibliographique

Liste des tableaux	i
Liste des figures.....	ii
Introduction	1

Chapitre I : Généralités sur les huiles essentielles

I -1.Définition.....	2
I-2 .Historique	2
I-3 .Localisation dans la plante	3
I-4 .Caractéristiques physico-chimiques	4
I- 5. Propriétés générales des huiles essentielles.....	4
I-5-1. Propriétés antiseptiques, antibactériennes et antifongiques	5
I-5-2. Propriétés antivirales	5
I-5-3. Propriétés antiparasitaires.....	5
I-6. Principales familles d'huile essentielle.....	5
I-7. Caractérisation des huiles essentielles.....	8

Chapitre II : Les maladies cryptogamiques

II-1.Définition.....	8
II-2.Caractères généraux des champignons.....	8
II-3.Classification des champignons.....	10
II-4.Quelques maladies causées par les champignons	11

Chapitre III : la lutte biologique

III-1.Définition	13
III-2. Historique.....	13
III-3.Principe de lutte biologique.....	14
III-4.Les types de lutte biologique	14
III-5.Sols suppressifs.....	15
III-6.La lutte contre les maladies cryptogamiques.....	15

III-6-1.Champignon contre champignon.....	15
III-6-2.Pathogènes des produits conservés.....	16
III-7.Problèmes de lutte biologique.....	16
III-8.La lutte par les huiles essentielles	17

II-Partie expérimentale

I- Matériels et méthodes

I-1.Matériel végétal	18
I-2.Méthodes	19
I-2-1.Méthodes d'extraction	19
I-2-1-1.Distillation.....	19
I-2-1-2.Expression	19
I-2-1-3.Enfleurage	19
I-2-1-4.Extraction par solvants chimiques	20
I-2-1-5.Extraction au co2 supercritique	20
I-2-2.Chromatographie en phase gazeuse	22
I-2-4.Préparations de différentes dilutions d'huile essentielles	22
I-2-5.Souches fongiques	23
I-2-5-1. <i>Aspergillus fumigatus</i>	24
I-2-5-2. <i>Aspergillus ochraceus</i>	25
I-2-5-3. <i>Aspergillus sp</i>	25
I-2-6.Préparation d'un milieu PDA (Potato Dextrose Agar.....	26
I-3.Etude de l'activité anti fongique d'huile essentielle d'Origan	27
I 3-1.Méthode d'aromatogramme.....	27

II-Résultat et discussion

II-1.Rendement des huiles essentielles	31
II-2.Analyse chimique	32
II-3.Résultat de l'activité antifongique.....	34

II-3-1. <i>Aspergillus fumigatus</i>	34
II-3-2. <i>Aspergillus ochraceus</i>	34
II-3-3 . <i>Aspergillus sp.</i>	34
III-Discussion	39
Conclusion	41

Liste des tableaux

Tableau 1: Classification des champignons.....	10
Tableau 2 : Conditions opératoires d'hydrodistillation d' <i>Origanum glandulosum</i>	21
Tableau 3 : Le traitement des champignons avec différentes dilutions d'huile d' <i>Origanum glandulosum</i>	29
Tableau 4 : Rapport eau/matière végétal des extractions.....	31
Tableau 5 : Les composés majoritaires d'huile essentielle d'Origan et leurs pourcentages...	32
Tableau 6 : Les diamètres des zones d'inhibitions des champignons testés par les concentrations d'HE d'Origan après 15 jours d'incubation.....	33

Liste des figures

Figure 1 : bio cycle d'un champignon type.....	9
Figure 2 : Appareillage utilisé pendant l'hydrodistillation d'huile essentielle. (De type Clevenger).....	21
Figure 3 : Les dilutions des huiles essentielles d'Origan.....	23
Figure 4 : Colonie d' <i>Aspergillus fumigatu</i> sur PDA.....	24
Figure 5 : Colonie d' <i>Aspergillus ochraceus</i> sur PDA	25
Figure 6 : Colonie d' <i>Aspergillus sp</i> sur PDA.....	25
Figure 7 : Organigramme de la préparation de milieu de culture PDA.....	26
Figure 8 : Le milieu PDA sur agitateur.....	27
Figure 9 : Organigramme représentatif d'une méthode d'aromatogramme.....	28
Figure 10 : Représentation schématique d'un aromatoigramme.....	30
Figure 11 : Résultats de la chromatographie (CPG-SM).....	33
Figure 12 : <i>A.F</i> avec solution Mère.....	36
Figure 13 : <i>A.F</i> avec dilution [1/ 10 ^e].....	36
Figure 14 : <i>A.F</i> avec dilution [1/ 100 ^e].....	36
Figure 15 : <i>A. fumigatus</i> avec méthanol pur.....	36
Figure 16 : <i>A. fumigatus</i> avec l'HE pure.....	36
Figure 17 : <i>A.O</i> avec solution Mère.....	37
Figure 18 : <i>A.O</i> avec dilution [1/ 10 ^e].....	37
Figure 19 : <i>A.O</i> avec dilution [1/ 100 ^e].....	37
Figure 20 : <i>A. ochraceus</i> avec méthanol pur.....	37
Figure 21 : <i>A. ochraceus</i> avec H.E Pure.....	37

Figure 22 : <i>A. sp</i> avec solution Mère.....	38
Figure 23 : <i>A. sp</i> avec dilution [1/ 10 ^e].....	38
Figure 24 : <i>A. sp</i> avec dilution [1/ 100 ^e]	38
Figure 25 : <i>Aspergillus sp</i> avec méthanol pur.....	38
Figure 26 : <i>Aspergillus sp</i> avec HE pure.....	38

Introduction

Introduction

Notre région est riche en plantes aromatiques et médicinales susceptibles d'être utilisées dans différents domaines (pharmacie, parfumerie, cosmétique et agroalimentaire) pour leurs propriétés thérapeutiques, et odorantes.

De part le relief accidenté de la région ce qui reflète une grande biodiversité, nos ressources naturelles et notamment forestières, nous offre une matière première gratuite méritant d'être étudiée en vue d'une valorisation scientifique et économique. Ainsi les plantes aromatiques sont, donc, à l'origine de produits à forte valeur ajoutée (huiles essentielles, extraits...) qui se présentent presque toujours comme des mélanges complexes dont il convient d'analyser la composition avant leur éventuelle valorisation. [4]

La notion d'aromathérapie, qui signifie littérairement « soin par les odeurs », est le terme que l'on utilise pour désigner la thérapie basée sur l'utilisation des huiles essentielles. Il s'agit donc de la capacité et de l'art de soigner avec les huiles essentielles. [6]

Les huiles essentielles sont des substances odoriférantes, volatiles, complexes produits par des plantes aromatiques, renfermes des principes actifs utilisés en aromathérapie depuis l'antiquité. En outre de leur utilisation pour la santé humaine et d'autres domaines, il serait intéressant de les tester aussi dans le domaine de la lutte biologique sur différentes maladies, insectes, parasites, etc. [39]

En effet, toutes les huiles essentielles naturelles ont des vertus antiseptiques et cicatrisantes, voire des propriétés antifongiques. [40]

Dans le but de la valorisation des effets antifongiques d'huiles essentielles *d'Origanum glandulosum*, nous avons effectué un travail qui se divise en deux parties :

- Une partie est consacrée à une étude bibliographique sur les huiles essentielles et les maladies cryptogamiques ainsi que la lutte biologique contre ces maladies.
- Une deuxième partie expérimentale qui a pour but l'étude de la sensibilité des champignons (du Genres *Aspergillus*), par les huiles essentielles *d'Origanum glandulosum*.

Les résultats attendus devraient nous orienter sur la possibilité éventuelle de l'utilisation des huiles essentielles *d'Origanum glandulosum*, ou l'un de leur composants dans le domaine phytopharmaceutique, ou agro-alimentaire.

Partie bibliographique

Chapitre I

Généralités sur les huiles essentielles

Chapitre I : Généralités sur les huiles essentielles

I-1. Définitions

Il existe plusieurs expressions pour définir une huile essentielle, elle peut être un ensemble de molécules pour un chimiste, un arôme pour un parfumeur ou encore la quintessence ou l'esprit d'un végétal pour un alchimiste. [6]

Dans la réalité, une huile essentielle est l'ensemble de tout cela, car il s'agit d'un produit parfumé et volatil, composé de molécules sécrétées par certains arbres et certaines plantes qui lui confèrent un parfum spécifique. Les huiles essentielles se distinguent des autres huiles végétales par leur volatilité. [1]

Le terme « volatil » s'explique par le fait que les huiles essentielles s'évaporent très rapidement. C'est pourquoi il est nécessaire de les conserver correctement afin qu'elles gardent intacts leurs principes actifs. [6]

Selon la pharmacopée française (1965), les huiles essentielles sont : « *des produits de composition généralement assez complexe renferment les principes volatils contenus dans les végétaux et plus ou moins modifiés au cours de la préparation* ». [2]

L'AFNOR (1972) (l'association française de normalisation) propose une autre définition : « *Produit obtenu à partir d'une matière végétale soit par entraînement à la vapeur d'eau, soit par des procédés mécaniques à partir de l'épicerie des citrus, soit par distillation sèche* ».

Le terme d'essence ou d'huile essentielle est parfois utilisé pour désigner des produits odorants, issus de la dégradation enzymatique d'un substrat de la plante dans le cas de fruits, on parle d'arômes. [2]

I-2. Historique

Reconnues pour leurs puissantes propriétés thérapeutiques et utilisées depuis des millénaires en Chine (cannelle, anis, gingembre), en Inde, au Moyen Orient (khella, pin, fenouil...), en Egypte, en Grèce, en Amérique (Azèques, Mayas,) et en Afrique (encens, myrrhe, ravensare). [7]

Déjà, 40 000 ans av. J.-C., les aborigènes australiens utilisaient les plantes aromatiques pour traiter les infections.

Mais c'est autour du bassin méditerranéen que la science médicinale va vraiment s'établir avec les grandes civilisations égyptienne, babylonienne, puis grecque et romaine. Ce sont cependant les textes égyptiens qui apportent les descriptions les plus détaillées.

Les pays arabes vont faire considérablement progresser l'aromathérapie. 1 000 ans av. J.-C. C'est Avicenne, médecin et philosophe (980-1037), qui produit la première huile essentielle pure ; c'est une huile essentielle de roses. [4]

Aujourd'hui, des médecins (Valnet, Duraffourd, Lapraz, d'Hervincourt, Belaiche) et des chercheurs de haut niveau (P. Franchomme), des pharmaciens (D. Baudoux) ont définitivement assis la réputation, l'efficacité et l'extraordinaire richesse des huiles essentielles. [7]

I-3. Localisation dans la plante

Les huiles essentielles n'existent quasiment que chez les végétaux supérieurs (exemples : familles des labiées odorante renferment presque toutes une huile essentielle). Elles peuvent être stockées dans tous les organes végétaux : les fleurs, les feuilles, et moins souvent les écorces, les bois, les racines, les rhizomes, les fruits et les graines.

Si tous les organes d'une même espèce peuvent renfermer une huile essentielle, la composition de cette dernière peut varier selon sa localisation. [2]

Dans le cas d'orange amère, par exemple, le zeste fournit l'« *essence de curaçao* », la fleur fournit l'« *essence de néroli* » et les feuilles, ramilles et petite fruites « *essences de petite grain bigaradier* » la composition de ces trois huiles essentielles est cependant très différentes.

De façon générale, les huiles essentielles sont présentes en très petites quantités : 1 à 2 % de matière sèche au maximum. [2]

Différents facteurs font varier la composition des huiles essentielles :

- **Les facteurs intrinsèques :**

- Les différentes parties de la plante : (cas de l'orange amère) Les parties fleuries de la sauge, par exemple, ont une huile essentielle plus riche en certains terpènes que les feuilles.

-le cycle de la plante : des poussées engendrent une accumulation plus ou moins importante de certains constituants des chaînes métaboliques au cours des saisons, des mois, voire des journées. Le profil chimique de l'huile de menthe, par exemple, peut être différent au cours de la journée. [2]

-le chimio type : Pour une même espèce botanique, il peut exister plusieurs races chimiques ou chimio types qui trouvent leur origine dans de légères différences des voies de biosynthèse, aboutissant à l'accumulation de métabolites secondaires différents.

Il est donc indispensable, pour certaines huiles essentielles (HE), de bien préciser le chimio type car il peut conditionner l'activité et/ou la toxicité. [5]

- **Les facteurs extrinsèques,**

Dont les plus importants sont :

- la nature du sol.
- la température.
- l'humidité.

La fonction de ces huiles essentielles dans les plantes reste obscure. On pense qu'elles ont un rôle écologique. Leur rôle d'inhibiteur de la germination a été prouvé expérimentalement ainsi que leur rôle dans la protection contre les prédateurs et l'attraction des pollinisateurs. [2]

I-4. Caractéristiques physico-chimiques

Les huiles essentielles sont habituellement liquides à température ambiante et volatiles, ce qui les différencie des huiles dites fixes. Elles sont plus ou moins colorées et leur densité est en général inférieure à celle de l'eau. Elles sont liposolubles et solubles dans les solvants organiques usuels, entraîna- bles à la vapeur d'eau, très peu solubles dans l'eau.

Elles sont composées de molécules à squelette carboné, le nombre d'atomes de carbone étant compris entre 5 et 22 (le plus souvent 10 ou 15). [5]

I- 5. Propriétés générales des huiles essentielles

Depuis des millénaires, les huiles essentielles sont employées pour guérir et prévenir les maladies. Hommes et femmes ont pu constater l'efficacité de ces petites gouttes. Ils ont alors listé les principales caractéristiques de la plus part des huiles essentielles.

I-5-1. Propriétés antiseptiques, antibactériennes et antifongiques

Les huiles essentielles peuvent rendre stérile une culture de microbes, signe d'une activité antiseptique. Plusieurs études ont montré que les huiles essentielles sont capables de s'attaquer aux microbes les plus puissants, comme le staphylocoque, le bacille de koch (tuberculose). Pour combattre les champignons (action antifongique), on utilise les huiles essentielles de thym, d'origan, des lavandes. Le pouvoir d'action des huiles essentielles ne faiblit pas dans le temps. [6]

I-5-2. Propriétés antivirales

Les virus sont très sensibles aux molécules aromatiques dans les huiles essentielles, ce qui confère à ces dernières la capacité de combattre certaines pathologies virales. Les huiles essentielles arrêtent le développement des virus et facilitent l'élimination du mucus tout en stimulant le système immunitaire. [7]

I-5-3. Propriétés antiparasitaires

Les huiles essentielles de géranium, de citronnelle, de menthe ou lavande diffusées dans l'air sont efficaces, pour protéger des attaques des insectes, en particulier des moustiques. [6]

I-6. Principales familles des huiles essentielles

Les composants principaux des huiles essentielles peuvent être regroupés en grandes familles :

- **Les esters :**

Ils agissent directement sur le système nerveux central, ont une action équilibrante et apaisante. Ils ont des propriétés anti-inflammatoires et de régénération des cellules. Parmi les huiles essentielles riches en esters, on trouve celles de lavande, de sauge, de petit grain et de camomille romaine.

- **Les phénols :**

Ils ont action stimulante. Ils sont antiseptiques, bactéricides et antifongique, protégeant ainsi l'organisme des contaminations. Ces composants sont très irritants pour

la peau et les muqueuses, aussi il faut utiliser les huiles qui sont riches en basses concentration et pour de courte période.

- **Les aldéhydes :**

Ils ont une action relaxante et calmante, ils sont aussi anti-inflammatoire, ils donnent un parfum d'agrumes à certaines huiles parmi les huiles essentielles riches en aldéhydes, citons celle d'orange, de clou de girofle, de mélisse, de citronnelle et de cannelle.

- **Les cétones :**

Ils ont une action relaxante et sédative. Ils possèdent des propriétés cicatrisantes et aident à éliminer le mucus. Parmi les huiles essentielles riches en cétones, on trouve celles d'eucalyptus, de romarin, de sauge et de niaouli.

- **Les alcools :**

Ils comptent parmi les molécules les plus bénéfiques dans les huiles essentielles en raison de leurs propriétés antiseptiques, antivirales et analgésiques ils sont également immunostimulants. Parmi les huiles essentielles riches en alcools on trouve celles de menthe, de lavande et d'arbres à thé.

- **Les terpènes :**

Très répandus dans l'ensemble des huiles essentielles ils ont une action stimulante et tonique. Certains ont des propriétés antivirales même à très basse concentration. Parmi les Huiles essentielles riches en terpènes, on compte celles de pin, de citron, et de romarin.

- **Les acides :**

Ils sont présents en petites quantités, mais ils ont une action puissante. Ils sont anti-inflammatoires et sédatifs. Parmi les huiles essentielles riches en acides, citons celles d'ylang-ylang, de géranium, de néroli et de genièvre.

- **Les sesquiterpènes :**

Ils ont une action équilibrante pour le système immunitaire, ils possèdent aussi des propriétés antivirales. Parmi les huiles essentielles riches en sesquiterpènes, on compte notamment celles de clou de girofle, de genièvres et de camomille. [6]

I-7. Caractérisation des huiles essentielles

L'analyse des huiles essentielles est une étape importante qui malgré les progrès constants des différentes techniques de séparation et d'identification, demeure toujours une opération délicate nécessitant la mise en œuvre ou successive de diverses techniques. [28]

- Chromatographie en Phase Gazeuse (CPG)

La CPG est une méthode d'analyse par séparation qui s'applique aux composés gazeux ou susceptibles d'être vaporisés par chauffage sans décomposition [29]. C'est la technique de séparation la plus utilisée dans le domaine des huiles essentielles, car elle permet d'effectuer l'individualisation des constituants à partir d'échantillons de l'ordre du milligramme voire du microgramme. Les progrès technologiques réalisés dans le domaine des colonnes capillaires, des phases stationnaires et des détecteurs (FID) ont contribué à rendre la CPG incontournable pour l'analyse des huiles essentielles. [30, 31,32]

Le couplage de la chromatographie en phase gazeuse avec la spectrométrie de masse (CPG/SM) permet d'effectuer simultanément la séparation et l'analyse des différents constituants d'un mélange complexe. [29, 33,34]

Chapitre II

Les maladies cryptogamiques

Chapitre II : Les maladies cryptogamiques

II-1. Définition

La phytopathologie est aux plantes ce que la médecine est à l'homme et la médecine vétérinaire aux animaux.

Le terme *cryptogamique* est utilisé pour les maladies parasitaires des plantes, suit à l'attaque par un ou plusieurs champignons. Donc c'est une succession de réponses visibles et invisibles de cellules et des tissus de ces plantes. [1]

Malheureusement, lorsqu' une plante est atteinte d'une maladie, sa croissance, sa fertilité et sa productivité sont affectées. Des symptômes se développent et tout une partie de l'organisme peut mourir. [1]

Ces maladies sont très nombreuses. On estime qu'elles peuvent être à l'origine de pertes pouvant aller jusqu'à 40% des récoltes. [1]

Dans toutes les attaques cryptogamiques, on distingue habituellement trois phases qui correspondent à la mise en œuvre de trois programmes de défenses : la phase de contact et de reconnaissance du pathogène, l'activation des cascades de réactions dans les cellules en contact avec le pathogène mais aussi celles qui adressent l'information aux autres cellules, et même aux autres individus vivant à proximité, en fin la sécrétion de molécules toxiques pour le pathogène. [1]

II-2. Caractères généraux des champignons

La science des champignons est dite mycologie et le mot mycète désigne les champignons. Ces végétaux cryptogames appartiennent à la division des thallophytes. Ils sont eucaryotes, non chlorophylliens. La plante entière dite thalle (sans racines, tige ou feuille) peut être un plasmode (masse protoplasmique sans paroi nette) ou un mycélium composés d'hyphes. Celle-ci est non cloisonnée chez les champignons supérieurs.

Les hyphes s'attachent à la surface de l'hôte par des ventouses en forme de disques « *appresoria* » puis pénètrent à l'intérieur. [8]

La nutrition s'effectue à travers les haustoria c'est-à-dire des tubes suçoirs. Le champignon est un parasite obligatoire, d'autres champignons sont saprophytes qui vivent même sur la matière organique morte, il ya d'autres qui s'associent en symbiose, une association très intime et d'intérêt mutuel. [8]

La reproduction est assurée par la voie asexuée, sexuée ou les deux voies en même temps. Il existe des champignons supérieurs dits imparfaits chez lesquels la reproduction sexuée est inconnue jusqu'à ce jour, la plupart des champignons utilisent toutes les voies (asexuée, sexée et végétative) afin de produire un nombre très important d'unités de propagation telle que les spores ou mycélium pour la survie et la propagation. [9]

Les meilleures conditions physiologiques pour la croissance des champignons sont variables, mais une humidité relativement élevée et une température optimale, entre 23° - 25°C donnent des bons résultats au laboratoire pour la plupart des champignons.

Comme il a été déjà mentionné, étant un être non chlorophyllien donc hétérotrophe. Les champignons sont obligés de chercher les éléments nutritifs sur des hôtes vivants ou substrats inertes. Ainsi les modes de vie étant saprophytes, parasites ou des symbiotes. C'est son mode de vie qui provoque des perturbations ou des dérangements chez les plantes hôtes la science qui étudie ce phénomène est la phytopathologie. [9]

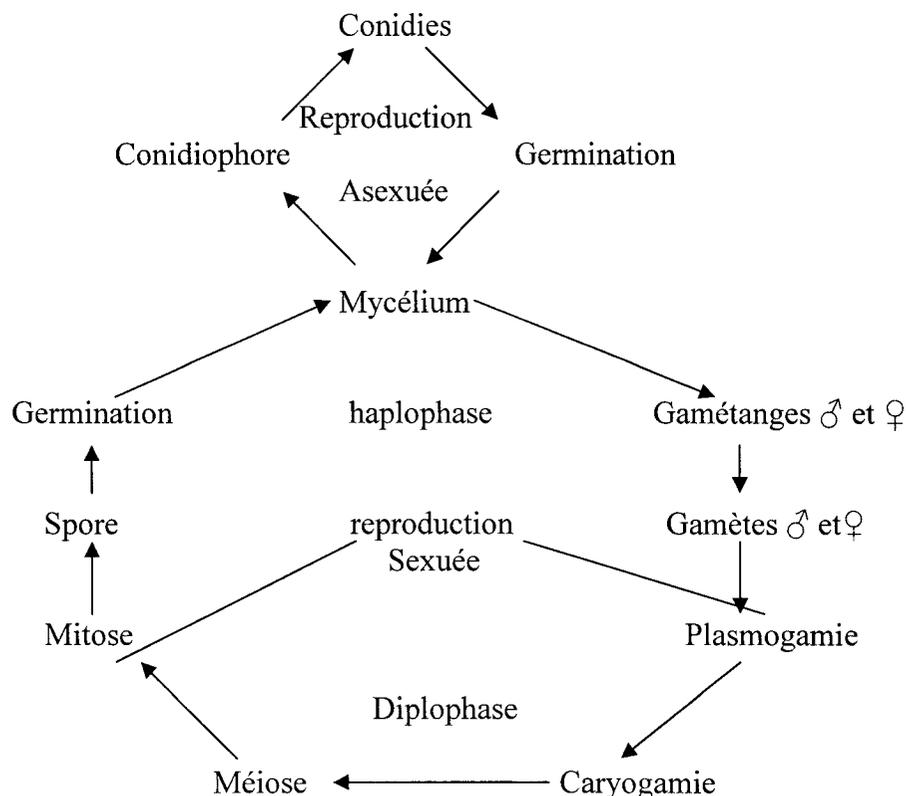


Figure1 : bio cycle d'un champignon type. [8]

II-3. Classification des champignons

Une classification simplifiée peut être réalisée comme suit :

1. **Myxomycètes (thalle de type plasmode)**: son comportement est similaire à celui de l'amibe. Ce plasmode est une masse protoplasmique sans parois nettes. Fructifications pourvues de membranes protectrices.
2. **Archimycètes** : le thalle de type plasmode
3. **Zygomycètes** : le thalle filamenteux dite aussi hyphes, ils sont non cloisonnés, les cellules flagellées absentes, la reproduction sexuée par la voie de cystogamie (copulation gamétangiale), d'où résulte une spore sexuelle « zygospore » à partir de laquelle est produit le sporange.
4. **Oomycètes** : absence de plasmode, les hyphes non cloisonnées, présence des deux flagelles égaux, l'un lisse et l'autre mastigonémé, en position latérale, reproduction sexuée par la voie d'oogamie.
5. **Basidiomycètes** : filament généralement cloisonnés, cellules flagellées absentes, les spores sexuelles normalement 2 à 4, portées par l'intermédiaire de stérigmateur sur les sacs dites basides.
6. **Ascomycètes** : hyphes cloisonnées, absence de flagelles, les spores sexuelles à nombre défini, en sacs dits « asques », ces derniers enfermées en 3 sortes de fructifications :
 - cléistothécie.
 - périthèce.
 - apothécie. [8]

Tableau 1: Classification des champignons [8]

	Forme végétative	Reproduction asexuée	Reproduction sexués
Myxomycètes	Plasmode	Zoospores	Zygotes de nature divers
archimycètes	Cellules et kystes Divers	Zoospores	
Oomycètes	Mycélium non Cloisonnés	Sporanges produisant des zoospores ou se conduisant comme conidies	Oospores
Zygomycètes	Mycélium non	Sporanges produisant des sporangiospores, conidies	Zygosporés

	cloisonnés		
Ascomycètes	Mycélium cloisonnés	Conidies, chlamydozozores, sclérotos	Asques contenant des ascospores
Basidiomycètes	Mycélium cloisonnés	Ecidiospores, urédospores (chez les rouilles), sclérotos	Basides produisant des basidiospores

II-4. Quelques maladies causées par les champignons

Après les pourritures racinaires, les infections foliaires sont les dommages les plus souvent rencontrés sur les plantes vivaces, elles se manifestent par les taches, les brûlures, les rouilles, le blanc, le mildiou et les anthracoses. La plupart de ces maladies sont causées par les champignons et les bactéries, mais il ya aussi les virus et des désordres physiologiques qui peuvent être impliqués. [9]

Certains organismes, tel celui qui est à l'origine de la hernie du chou, ont des spores protégées, en dormance, qui restent viables dans le sol pendant au moins 40 années. L'organisme responsable du mildiou de la pomme de terre se transmet d'une année à l'autre sur les semences de pomme de terre, mais se répand d'une plante à l'autre sous forme de spores. [10]

Les champignons responsables de maladies sont difficilement observables; seuls les symptômes qu'ils provoquent chez la plante permettent de les détecter. Les maladies cryptogamiques prédominent lorsque le climat est chaud et humide ; ces conditions facilitent en effet le déplacement des spores de champignons dans l'air et à la surface des feuilles. Transportées par le sol ou le vent, les spores arrivent à la surface de la plante où elles peuvent envahir les cellules végétales. [9]

Les maladies cryptogamiques sont très diverses et sont classées selon le type de symptôme qu'elles produisent. Au sein de ces groupes, les microorganismes pathogènes peuvent être spécifiques à leur hôte. Ainsi, l'organisme responsable de l'oïdium chez le pommier diffère des champignons de l'oïdium, apparemment identique chez le prunier ou encore le rosier. D'un autre côté, le champignon de la pourriture grise, *Botrytis cinerea*, peut affecter différentes plantes et parties de plantes. [10]

Parmi ces maladies on cite :

- **Mildiou** : la maladie cause des dégâts considérables dans des conditions favorables. Très dangereuse, du fait qu'elle se propage à très grande vitesse, elle apparaît sous forme de taches blanches soit à la face inférieure soit à la face supérieure ou sur toutes les deux. Il existe deux sortes de mildiou et tous les deux sont des parasites obligatoires. [11]

Sur feuillage, taches aqueuses de forme irrégulière, devenant brunes, souvent entourées d'un halo plus clair, en conditions humides, sur la face inférieure apparaît une moisissure blanche en bordure des taches, la maladie peut évoluer très rapidement, les taches confluent entre elles, provoquant le dessèchement et la mort de la plante. Une odeur caractéristique peut accompagner la décomposition. [8,11]

- **Tavelures** : ce sont des taches pourvues de bords d'une teinte différente de celle de la tache. Cette nuance est caractéristique de l'agent pathogène et l'apparence morphologique est comme un œil. [8]
- **Pourritures** : les tissus tels que le parenchyme, le collenchyme et aussi d'autre partie de la plante comme les feuilles, les fruits et les racines sont infectés et pourrissent. Eventuellement différentes colorations sont produites. Ces pourritures sont connues selon leur couleur. Aussi, l'état de tissu infecté (comme tissu sec, tissu mou, tissu humide) est nommé comme différentes pourritures. [8,11]
- **Flétrissement** : c'est une infection vasculaire. Le mycélium bloque les vaisseaux. En même temps le champignon secrète des toxines affectant la vitalité des tissus. La plante perd sa vigueur et devient molle. [8]

Chapitre III

La lutte biologique

Chapitre III : La lutte biologique

III-1. Définitions

C'est un moyen élégant de réduire les effectifs d'un organisme - animal ou plante - gênant, en le faisant dévorer par un de ses ennemis naturels.

La lutte biologique ou plus précisément microbiologique fait appel à des microorganismes divers pour lutter contre des maladies cryptogamiques, bactériennes ou virales, des arthropodes ravageurs des cultures et des plantes adventices.

C'est donc l'ensemble du domaine de la protection des plantes qui est ouvert à l'utilisation des microorganismes. [19,12]

Plusieurs définitions ont été proposées, selon l'organisation internationale de lutte biologique l'OILB : « *la lutte biologique consiste à utiliser des organismes vivants pour prévenir ou réduire les dégâts causés par les ravageurs et agents phytopathogènes (champignons, bactéries, insectes et phanérogames)* ». Ainsi, l'agence de la protection environnementale des Etats-Unis (EPA) a adopté en 1989 une définition très large de la lutte biologique. Selon cette agence : « *les biopesticides sont des dérivés de matériel naturels telle que les animaux, les plantes, les bactéries et certains minéraux* ».

Une troisième définition plus restrictive que celle formulée par l'EPA et s'approche de celle énoncée par l'OILB : « *nous considérons que la lutte biologique vise à contrôler les agents pathogènes au moyen d'agents de lutte biologique, des champignons, bactéries ou virus ainsi que leur dérivées* ». [9]

La lutte biologique utilise des organismes vivants appelés également auxiliaires ou ennemis naturels ou encore des produits dérivés d'organismes vivants. [13]

Actuellement c'est la méthode la plus utilisée après la méthode chimique et les façons culturales. [14]

III-2. Historique :

Au début du XXe siècle, quasi simultanément en phytopathologie et entomologie, l'appellation lutte biologique fut proposée pour désigner toute méthode phytosanitaire mettant en œuvre des organismes vivants. L'étude de Sanford (1926) sur les facteurs influençant la pathogénicité de la bactérie *Streptomyces scabies* matérialise ce concept en observant que des microorganismes saprophytes pouvaient entraîner une diminution de l'intensité des

symptômes de ce phytopathogène du sol. Quelque année plus tard, weindling mis en évidence que le champignon *Trichoderma lignorum* parasitait d'autres champignons du sol. [9]

III-3. Principe de lutte biologique

Dans la nature, les populations de pathogènes interagissent avec plusieurs facteurs naturels. Certains de ces facteurs sont des organismes antagonistes capables d'affecter la croissance et la viabilité des pathogènes. [19]

Le principe de lutte biologique consiste en l'identification de ces contraintes biologiques et leur exploitation là où c'est possible pour limiter le développement des maladies.

Dans un sens large, la lutte biologique comprend l'utilisation de tout organisme pour contrôler un pathogène, y compris la résistance de la plante hôte elle-même comme une forme naturelle et efficace de lutte biologique. [23]

Selon la définition que nous avons retenue, la lutte autocide, ayant pour principe l'introduction d'un grand nombre de mâles stériles dans une population naturelle est également une composante de la lutte biologique. [25]

III-4. Les types de lutte biologique

On distingue classiquement trois types de lutte biologique :

- a) La lutte biologique classique, ou lutte par introduction-acclimatation, consiste à introduire une nouvelle espèce dans un environnement afin de contrôler les populations d'un ennemi des cultures.
- b) La lutte biologique augmentative consiste à augmenter la taille des populations d'ennemis naturels, soit par des lâchers massifs (lutte inondative) ou par lâchers en petite quantité, l'auxiliaire devant s'établir, se multiplier et coloniser une zone donnée (lutte inoculative).
- c) La manipulation environnementale permet de favoriser les effets bénéfiques des espèces indigènes d'ennemis naturels.

Le développement d'une méthode de lutte biologique contre un ravageur nécessite quatre étapes :

- 1) étudier la biologie du ravageur.
- 2) étudier la biologie des ennemis naturels du ravageur.

- 3) mettre au point une production répondant au besoin des expérimentations tant au laboratoire qu'en conditions naturelles.
- 4) valider les expérimentations en laboratoire par des tests en plein champ. [20,21]

III-5. Sols suppressifs

Dans certains sols, appelés alors sols suppressif, les pathogènes transmis par le sol se développent beaucoup moins et causent des maladies beaucoup moins sévères que dans ceux qui sont connus comme sols conductifs. Des exemples de pathogènes avec des activités réduites dans des sols suppressifs sont *Fusarium oxysporum* causant des flétrissements vasculaires, *Phytophthora cinnamomi* causant les pourridiés des arbres et *Pytium ssp.* causant la fonte des semis des plantules. Plusieurs sortes d'antagonistes sont montrées capables de se multiplier dans les sols suppressifs et réduire le développement du pathogènes et de la maladie. [16,22]

III-6. La lutte contre les maladies cryptogamiques

Plusieurs champignons (Oomycètes, Chytridiomycètes et Hyphomycètes) et certaines bactéries pseudo monades et actinomycètes sont antagonistes à plusieurs pathogènes fongiques.

Parmi les champignons antagonistes les plus communs, il y a des espèces de *Trichoderma* et *Gliocladium*, particulièrement *T. harzianum* et *G. virens*, qui sont efficaces contre plusieurs pathogènes comme des espèces de *Pytium*, *Phytophthora*, *Heterobasidion*, et *Fusarium*. Certaines espèces de *Pytium*, telle que *P. nunn* et *P. oligandrum*, sont antagonistes à *Phytophthora* et même d'autres espèces de *Pytium*. [17,18]

III-6-1. Champignon contre champignon

Cet antagoniste est illustré par le premier succès de la lutte biologique au sens strict en 1963. *Heterobasidion annosum* est un basidiomycète qui attaque les conifères ; il prolifère essentiellement sur les troncs laissés après l'abattage des sapins. RISBETH eut l'idée d'inoculer les surfaces mis à nu avec un saprophyte *Peniophora gigantea*, qui occupant simplement la place, empêche *Heterobasidion* de s'installer et pénétrer dans les troncs et les racines. Des chercheuses similaires ont été enregistrées en Australie pour lutter contre le

dépérissement de l'abricotier du à *Eutypa*, en utilisant des espèces de *Trichoderma* et de *Fusarium* non pathogènes.

Dans la lutte contre la tavelure du pommier *Venturia inaequalis* on a tenté de rompre le cycle en favorisant des antagonistes qui inhibent la formation de périthèces durant l'hiver.

La pourriture grise des fraises *Botrytis cinerea* est combattue par l'apport de saprophytes, *Cladosporium herbarum* et *Aureobasidium pullulans*. [24]

III-6-2. Pathogènes des produits conservés

Plusieurs maladies fongiques de produits conservés peuvent être contrôlées en utilisant des champignons antagonistes, principalement des levures. Ainsi, la moisissure verte causée par *Penicillium digitatum* est contrôlée par *Trichoderma* tandis que plusieurs levures, telle que *Candida oleophila*, protègent les fruits contre les moisissures dues à *Botrytis*, *Penicillium* et *Rhizoctonia*. [24]

III-7. Problèmes de lutte biologique

Les raisons de la faible utilisation des méthodes de lutte biologique en grandes cultures sont multiples.

Tout d'abord, il y a bien sûr la faible disponibilité des méthodes, qui concernent essentiellement la lutte contre les arthropodes. Si certaines méthodes se sont révélées prometteuses au niveau de l'expérimentation au laboratoire, ou même au champ, il faut que l'agent biologique puisse être produit en grande quantité et à faible coût, de manière à permettre sa commercialisation.

De plus, même si une méthode de lutte biologique se révèle prometteuse lors d'expérimentations, l'ensemble du système de culture n'est quasiment jamais pris en compte lors de la phase de développement. Or, les conditions environnementales, sous l'influence des pratiques agricoles, influencent fortement le comportement des auxiliaires. L'étude de cette interaction est nécessaire et devrait faire l'objet de recherches spécifiques pour permettre un développement plus efficace de méthodes de lutte biologique en grandes cultures. [15]

III-8. La lutte par les huiles essentielles

Les groupes moléculaires avec les plus puissantes actions antibactériennes sont également des antifongiques efficaces mais ils doivent être utilisés sur de plus longues périodes. Des études fondamentales ont également montré que les alcools et les lactones sesquiterpéniques avaient une activité antifongique. [41]

La plupart de certains composés : aldéhydes et cétones monoterpéniques (géraniol, linalol, menthol, terpinéol, thujanol, myrcénol, citronellaï, néral, thujone, camphre, carvone, etc.), des phénylpropanes (cinnamaldéhyde) et des monoterpènes (yterpinène, p-cymène) sont également de très bons agents antifongiques. Le thymol, le carvacrol, et l'eugénol sont encore ici les composés les plus actifs.[41]

Un grand nombre de composés volatils ont été testés contre une large gamme de champignons: *Candida* (*C. albicans*), *Aspergillus* (*A. neiger*, *A. flavus*, *A. fumigatus*), *Penicillium chrysogenum*, et qui présente l'activité antifongique. [41]



Partie expérimentale

Matériels et méthodes

I- Matériels et méthodes

I-1. Matériel végétal

Le matériel végétal utilisé est une espèce d'origan (*Origanum glandulosum*), cette espèce a été choisie pour le fait qu'elle soit une plante à la fois médicinale et aromatique c'est-à-dire qu'elle contienne des substances bioactives du métabolisme secondaire qui sont les huiles essentielles.

- **Description botanique**

L'*Origanum glandulosum* est une plantes herbacées ou sous-ligneuses à la base. Inflorescences en épis réunis en inflorescences composées. Calice tubuleux à 5 dents courtes bilabié ou non. Corolle blanche ou rosée, à lèvre supérieure marginée et à lèvre inférieure trilobée. 4 étamines divergentes.

Calice non bilabié, à 5 dents subégales, Epis linéaires glabres ou faiblement pubescents

2 Tiges : Toutes dressées. Epis denses, à fleurs restant contiguës après la floraison. Corolle à lèvre inférieure bien plus longue que la lèvre supérieure. [26]

L'espèce *Origanum glandulosum* contient comme principes actifs environ 4% d'huile essentielle dont la majorité est représentée par le thymol et le carvacrol en proportions variables. [27]

I-2. Méthodes analytiques

I-2-1. Méthodes d'extraction

A l'intérieur de leurs cellules, les végétaux renferment des essences, c'est-à-dire des sécrétions naturelles que l'on extrait pour obtenir les huiles essentielles. Il existe plusieurs méthodes d'extraction. [6, 5]

I-2-1-1. Distillation

Il s'agit de la méthode la plus employée. Ce processus nécessite l'emploi de trois cuves reliées par des tubes. La partie de la plante choisies sont places dans la première cuve, traversées par de la vapeur d'eau. La vapeur qui provient de la première cuve traverse la deuxième en entraînant avec elle les principes actifs de la plante. Ensuite la vapeur se refroidit en passant dans un long tube pour arriver à la troisième cuve, où elle redevient de l'eau.

L'huile essentielle peut alors être séparée de l'eau car, elle est plus légère que celle-ci, elle reste en surface. Grâce à cette technique d'extraction d'huile essentielle garde ses propriétés, et l'eau qui reste après la séparation peut servir à la fabrication des hydrolats. [6]

I-2-1-2. Expression

L'expression, aussi appelée « pression à froid » ou « grattage », est un procédé d'extraction très simple. Il est principalement utilisé pour les agrumes (citron, pamplemousse, orange, mandarine), qui renferment une quantité importante d'huile essentielle. Cette opération mécanique vise à casser les molécules qui contiennent les essences dans les zestes des agrumes frais. Dans ce cas, on utilise le terme « essence » plutôt qu'« huile essentielle ». [6]

I-2-1-3. Enfleurage

L'enfleurage est une ancienne méthode d'extraction manuelle des essences, complexe et très coûteuse, qui n'est plus tellement pratiquée de nos jours. Elle est utilisée essentiellement pour les végétaux dont l'arôme est trop fragile. C'est par exemple le cas du jasmin, et du narcisse. [6]

I-2-1-4 Extraction par solvants chimiques

Cette méthode est pratiquée au niveau industriel est utilise des produits chimiques comme le benzène, un solvant volatil. L'huile essentielle ainsi obtenue peut garder des traces du solvant utilisé dans l'opération (2 ou 3%). [6]

I-2-1-5. Extraction au CO_2 supercritique

Il s'agit d'une technique moderne, très couteuse : du dioxyde de carbone à haute pression est employée pour faire exploser les poches végétales contenant l'essence, qu'il est alors possible de récupérer. [6]

I-2-2. Extraction des huiles essentielles

Les huiles essentielles d'Origan ont été extraites par hydrodistillation à l'aide d'un appareil de type Clevenger. (fig. 2), dont le montage est composé de 4 parties principales:

- le réacteur un ballon (de capacité d'un litre) dans le quel on introduit la matière végétale et l'eau.
- La colonne, un cylindre en verre placé au dessus du réacteur qui recueille la phase vapeur.
- Le réfrigérant dans lequel se condensent les vapeurs.
- Un décanteur où vont se séparer la phase organique (huile essentielle) et la phase aqueuse (eau). [28]

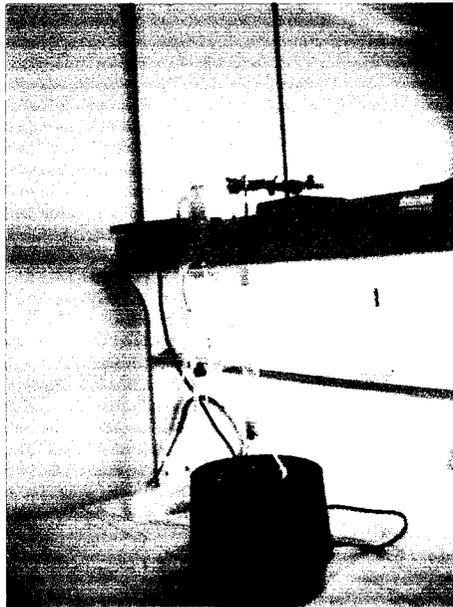


Figure 2 : Appareillage utilisé pendant l'hydrodistillation d'huile essentielle.

(De type Clevenger).

Le principe de cette méthode est donc basé sur un entrainement des constituants volatils d'huile essentielle par la vapeur d'eau. Cette dernière chargée de principes volatils est condensée dans un réfrigérant pour donner des huiles essentielles après décantation. [28]

Les conditions opératoires d'hydrodistillation d'Origan sont présentées dans le tableau suivant :

Tableau 2 : conditions opératoires d'hydrodistillation d'*Origanum glandulosum*.

Conditions	partie utilisée	quantité de matière végétale	q. d'eau	température	temps
<i>Origanum glandulosum</i>	partie aérienne	70,5 grammes	350ml	100C°	3h

Les huiles essentielles ainsi obtenues sont conservées à 4 C° dans un tube fermés, sous abri de la lumière jusqu'à leur usage.



I-2-3. Chromatographie en phase gazeuse

Les huiles essentielles ont été analysées sur un chromatographe de type GMS Sdimandzu QP 2010, équipé d'une colonne capillaire apolaire SE 30 (longueur : 30 m, et de 0,25 μm de diamètre intérieur, l'épaisseur du film est de 25 m) couplé à un spectrographe de masse (SM) de même type chromatographe avec un détecteur à impact d'électrons, 70 eV, et de type EV.

Les conditions analytiques sont les suivantes: température de la colonne 60°C (8 min) à 180°C (3°C/ min), jusqu'à 230°C (20°C/min), mode d'injection, Split, Split ratio 1 :40, volume injecté d'huile essentielle est 0.6 μl , le gaz vecteur est l'hélium (122.2 kpa).

Pour toutes les analyses, on injecte manuellement 0,2 μl d'échantillon d'huile essentielle pure.

I-2-4. Préparations de différentes dilutions d'huile essentielle

L'huile essentielle d'Origan a été diluée dans une quantité de méthanol, en vue d'obtenir des dilutions d'un mélange homogène.

Une série de tubes en verre, numérotés en fonction du chiffre correspondant à la dilution souhaitée (trois dilutions), est disposée sur un plateau de travail.

Comme le montre la figure 3, le premier tube reçoit un volume de 30 μl d'huile essentielle d'Origan, avec le même volume de méthanol, et ce la à l'aide d'une micropipette.

Un volume de ce tube (10 μl), est versé dans le deuxième tube numéroté 02. Puis il est complété à cent en volume de méthanol (90 μl), Pour avoir une concentration de 1/10^e.

À partir de cette solution on prépare une autre dilution, par les mêmes opérations, 10 μl de la deuxième dilution est ajouté à 90 μl de méthanol, la solution ainsi obtenue est la concentration 1/100^e.

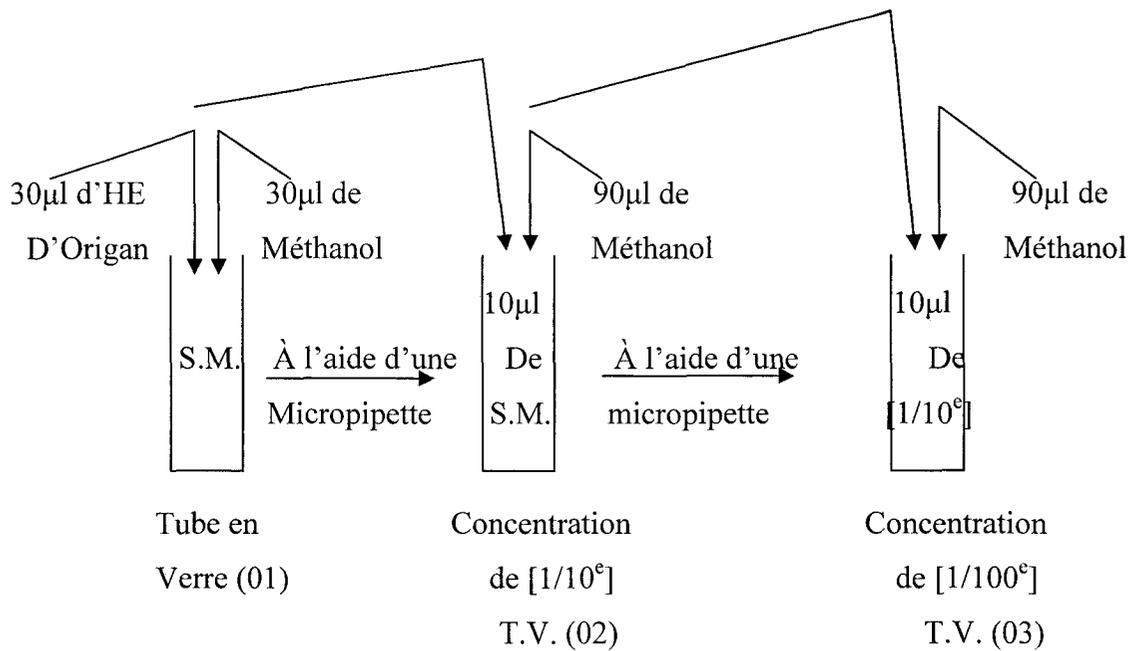


Figure 3 : Les dilutions des huiles essentielles d'Origan.

S.M. : Solution mère.

T.V. : Tube en verre.

I-2-5. Souches fongiques

Les souches fongiques *Aspergillus sp* testées ont été choisies pour leur fréquence élevée à contaminer les denrées alimentaires et pour leur pathogénicité.

Ces souches ont été isolées à partir des arbres atteints du châtaignier (*Castanea sativa*) de la région de Collo à Skikda.

Le prélèvement, la culture et l'identification ont été réalisés au laboratoire de contrôle de qualité de la faculté des sciences.

Les Aspergillus sont des champignons filamenteux, de type moisissure, dont la colonie se présente sous forme duveteuse. Le thalle, hyalin, présente un mycélium cloisonné portant de nombreux conidiophores dressés, terminés en vésicule. [43,42]

Les Aspergillus ont une répartition mondiale. Ils se développent sur la matière organique en décomposition, dans le sol, le compost, les denrées alimentaires, les céréales. Ils sont

présents dans l'environnement humain, notamment dans les plantes, les fruits, la poussière et l'air. On trouve de 1 à 20 spores par mètre cube. Nous inhalons entre 10 à 30 spores par jour.

Certaines espèces d'*Aspergillus* peuvent être pathogènes pour l'Homme, les animaux et les plantes. Les mycoses provoquées par *Aspergillus* sont appelées des aspergilloses. Certaines espèces peuvent aussi produire des mycotoxines comme les aflatoxines (par *Aspergillus flavus*) ou l'ochratoxine (*Aspergillus ochraceus*). *Aspergillus fumigatus* peut produire un grand nombre de composés plus ou moins toxiques. [42]

Leur teinte diffère selon les espèces : *Aspergillus candidatus* est blanc, *Aspergillus ochraceus* est ocre (d'où son nom), *Aspergillus niger* est noir et les autres comme *Aspergillus glaucus* et *Aspergillus flavus* sont dans les tons verts. [42]

Trois espèces de champignons ont été utilisées dans ce travaille : *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus ochraceus*, et *Aspergillus sp.*

I-2-5-1. *Aspergillus fumigatus*

L'*Aspergillus fumigatus* est très fréquent sur les matières organiques humides en décomposition, le compost, le sol, l'air, etc. Il élabore divers métabolites dont plusieurs sont très toxiques (gliotoxine), c'est un agent d'aspergillose aviaire et humaine (représentant 80 à 90% des aspergilloses humaines). [42]

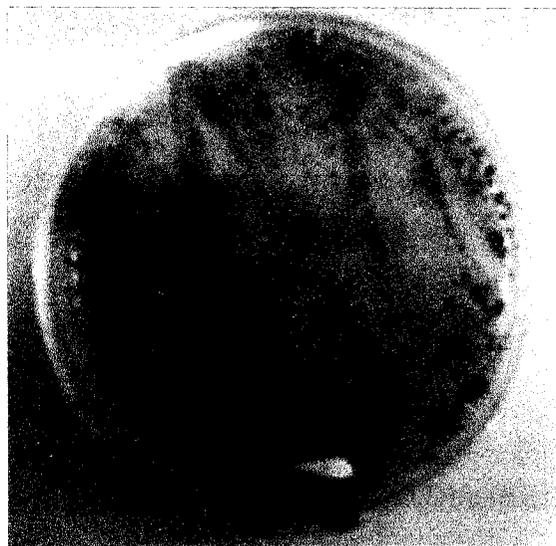


Figure 4 : Colonie d'*Aspergillus fumigatus* après 7 jours d'incubation sur PDA

I-2-5-2. *Aspergillus ochraceus*

L'Aspergillus ochraceus est très largement répandu, dans le sol, sur les végétaux en décomposition. Cette espèce est phytopathogène (pourriture des pommes et des poires). Elle est responsable d'intoxication mortelle d'animaux d'élevage (ochratoxines). Elle peut aussi attaquer des vers à soie, elle est rarement pathogène pour l'Homme. [43]

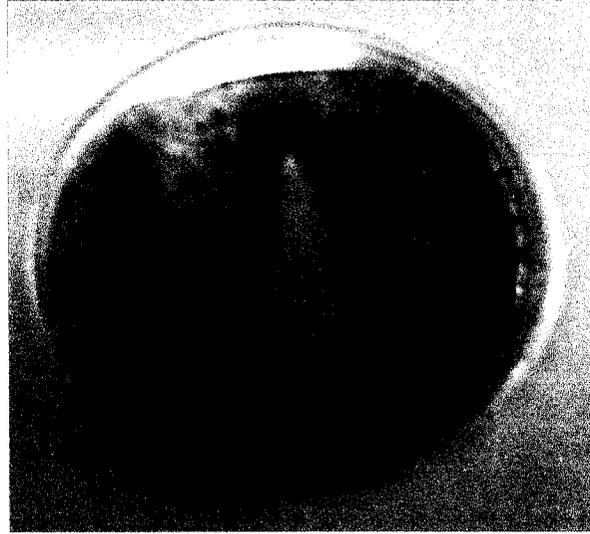


Figure 5 : Colonie d'*Aspergillus ochraceus* après 7 jours d'incubation sur PDA

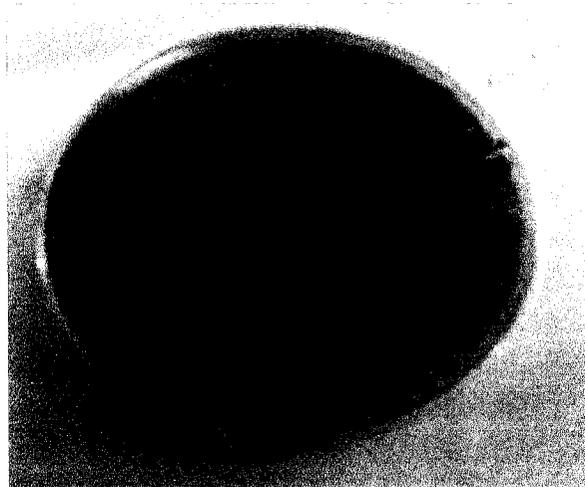
I-2-5-3 *Aspergillus sp*

Figure 6 : Colonie d'*Aspergillus sp* après 7 jours d'incubation sur PDA

I-2-6. Préparation d'un milieu PDA (Potato Dextrose Agar)

Pour préparer un litre de milieu de culture PDA, 200g de pomme de terre ont été, lavées, épluchées et coupées en tranches fines, puis bouillies sur une plaque chauffante dans 500ml d'eau distillée jusqu'à avoir une purée.

Après filtration de cette purée, 20g de glucose et 15 à 20g d'agar ont été ajoutés. Ensuite, le volume a été ajusté à un litre avec de l'eau distillée.

Le milieu a été stérilisé à 120°C pendant 20min dans l'autoclave. Après refroidissement, le milieu a été coulé dans des boîtes de pétris stériles. [35]

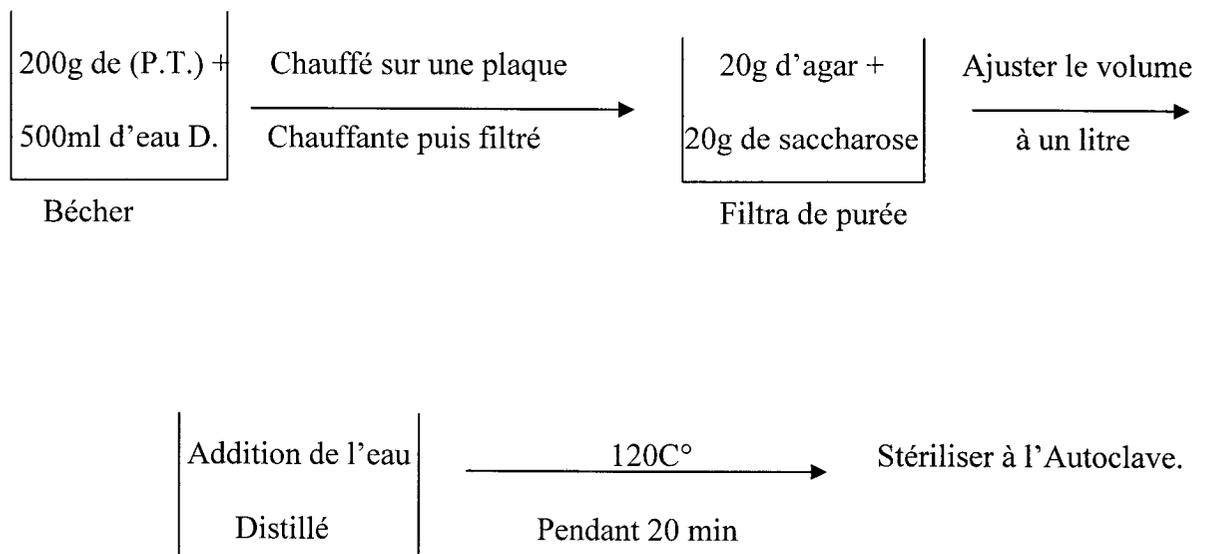


Figure 7 : Organigramme de la préparation de milieu de culture PDA.

(P.T.) : Pomme de terre.

(Eau D.) : Eau distillé.

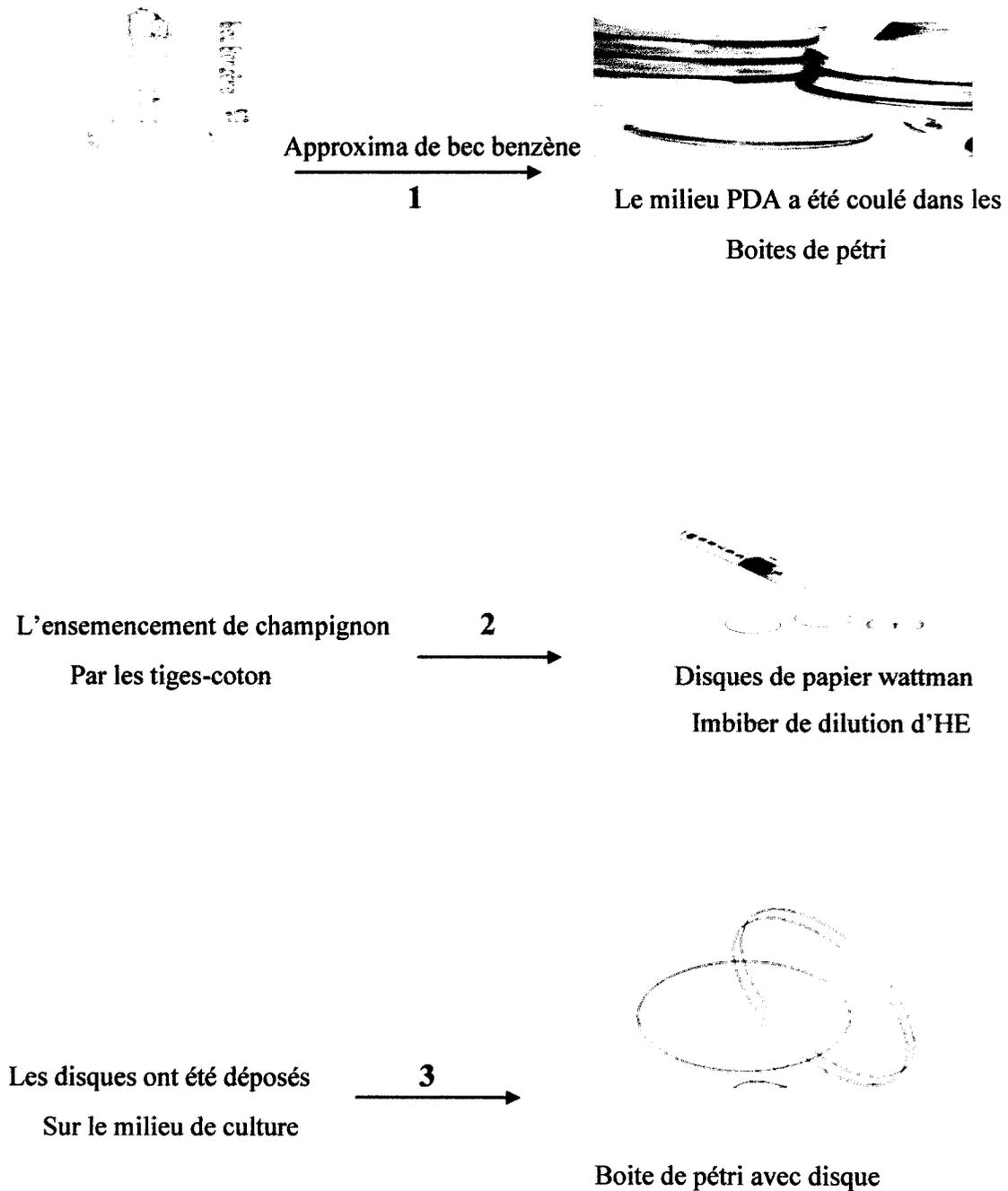


Figure 9 : Organigramme représentatif d'une méthode d'aromatogramme.

Tableau 3 : Le traitement des champignons avec différentes dilutions d'huile *d'Origanum glandulosum*.

	La 1 ^{ère} Boite	La 2 ^{ème} Boite	La 3 ^{ème} Boite	La 4 ^{ème} Boite	La 5 ^{ème} Boite
<i>Aspergillus fumigatus</i>	Disque imbibé de solution Mère d'HE d'Origan	Disque imbibé de concentration 1/10 ^e d'HE	Disque imbibé de concentration 1/100 ^e d'HE	Disque imbibé d'HE pure	Disque de méthanol pur
<i>Aspergillus ochraceus</i>	Disque imbibé de S.M. d'HE d'Origan	Disque imbibé de [1/10 ^e] d'HE	Disque imbibé de [1/100 ^e] d'HE	Disque imbibé d'HE pure	Disque de méthanol pur
<i>Aspergillus sp</i>	Disque imbibé de S.M. d'HE d'Origan	Disque imbibé de [1/10 ^e] d'HE	Disque imbibé de [1/100 ^e] d'HE	Disque imbibé d'HE pure	Disque de méthanol pur

Les boites sont placées dans un incubateur, à 25 °C pendant 7 jours, après le développement du genre à la surface de milieu de culture, on constate autour de certains disques des halos circulaires décolorés, de tailles variables qui caractérisent l'activité germicide de chaque dilution d'huile essentielle. [37, 38]

- Si la zone claire mesuré de 2 a 3 millimètre de diamètre, l'HE possède une bonne action sur le germe testé, on lui attribue deux croix (++).

- Si l'halo d'inhibition mesure plus de trois millimètre de diamètre, l'efficacité d'huile essentielle est excellente il y sera donné trois croix (+++), pour son spectre antimicrobien.

- S'il n'y a pas de zone claire, l'HE ne développe aucune activité sur le germe analysé et elle ne sera pas retenue dans l'établissement de traitement. [35] (voir la figure 8).

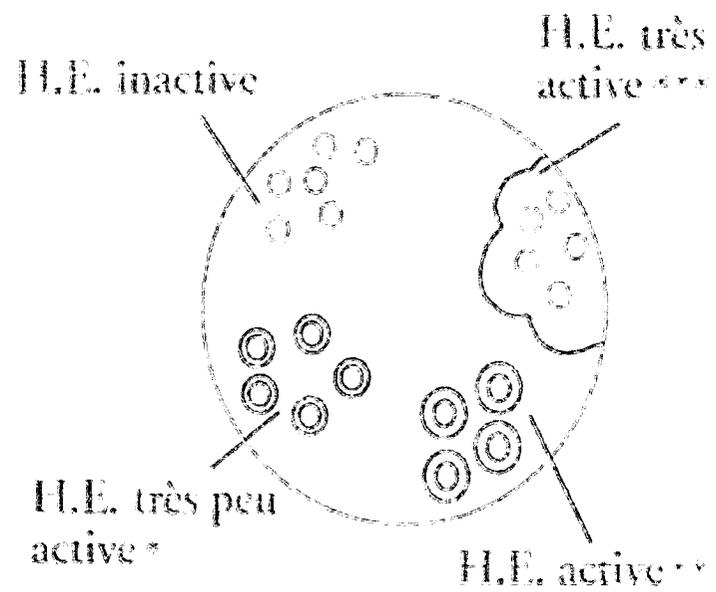


Figure 10 : Représentation schématique d'un chromatogramme. [35]

Résultat et discussion

II- Résultat

II-1. Rendement des huiles essentielles

Trois extractions d'huiles essentielles ont été réalisées sur la plante *d'Origanum glandulosum*, a fin d'estimer le rendement de cette plante.

Le tableau 4 résume le rapport eau / matière végétale des trois extractions.

Tableau 4 : Rapport eau/matière végétale des extractions.

	Quantité de Matière végétale Sèche (g)	Quantité d'eau (ml)	Température (C°)	Temps (h)	Volume d'HE (ml)	Volume d'HE pour 100 g de M. végétale (%)
Extraction 1	70,5	350	100	3	0,3	0,42
Extraction 2	100	500	100	4	0,4	0,4
Extraction 3	80	400	100	4	0,3	0,37
Rendement Moyen (%)						0,4

La distillation est conduite pendant trois ou quatre heures, durée nécessaire à l'épuisement de la matière première (environ 90%) en huile essentielle.

Le volume d'huile essentielle obtenue environ 0,3 ml, il possède une couleur jaune clair avec une odeur agréable.

Le rendement moyen de cette huile essentielle est de 0,4 %.

II-2. Analyse chimique

L'analyse de l'huile essentielle d'*Origan glandulosum* a été réalisée à l'aide d'une chromatographie en phase gazeuse couplée à un spectromètre de masse (CPG-SM), afin d'optimiser la séparation des molécules constituant l'huile essentielle, aussi bien les composés majoritaires que minoritaires.

Les analyses chromatographiques d'huile essentielle d'origan ont permis d'identifier 20 composés. Cette huile essentielle est constituée principalement par le thymol (47,45 %), et le carvacrol (27,31%), accompagné d'autres constituants à des teneurs relativement faibles : Caryophyllene (7,67 %), Cyclohexéne (5,90 %), Caryophyllene oxide (2,85 %), et Caryophyllene (2,40 %), totalisant environ 93,58 %. (Voire le tableau 5).

Tableau 5 : Les composés majoritaires d'huile essentielle d'Origan et leurs pourcentages.



Constituants majeurs	pourcentage %
Thymol	47,45%
Carvacrol	27,31%
Caryophyllene	7,67%
Cyclohexéne	5,90%
Caryophyllene oxide	2,85%

Les résultats représentés dans la figure 9 rassemblent des données expérimentales à savoir le temps de rétention, les pourcentages des différentes molécules, ainsi que le nom de la molécule identifiée.

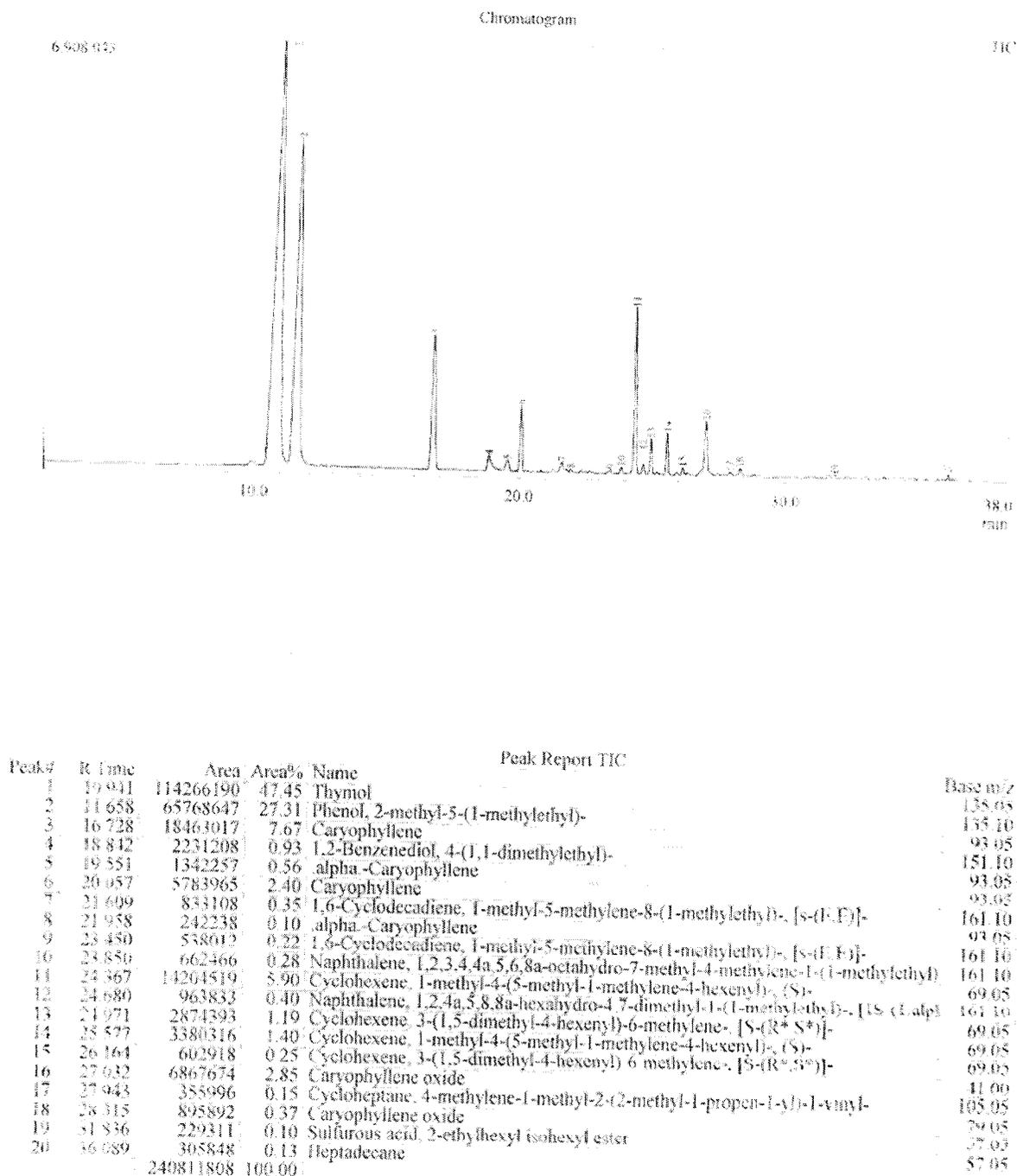


Figure 11 : Résultats de la chromatographie (CPG-SM).

II-3. Résultat de l'activité antifongique

II-3-1. *Aspergillus fumigatus*

Dans les trois concentrations aucun halo n'est présent, ce qui implique qu'il n'existe aucune activité sur le germe testé.

Par contre le témoin d'HE pure montre une activité excellente sur *A. Fumigatus*, on lui attribue trois croix (+++).

Le témoin de méthanol pur ne présente aucune activité chez tous les germes utilisés.

II-3-2. *Aspergillus ochraceus*

L'halo d'inhibition est de 2 mm de diamètre dans la solution mère, donc un bon pouvoir d'inhibition ont lui attribue deux croix (++) .

Dans la concentration 1/10^e, la zone claire mesure 1 mm de diamètre, il y'a une très faible inhibition. La concentration 1/100^e ne présente aucune inhibition.

Le témoin d'HE pure exclu le développement d'*A. ochraceus*, donc un excellent pouvoir antifongique, on lui attribue trois croix (+++).

II-3-3. *Aspergillus sp*

L'halo mesure 1 mm de diamètre dans la solution mère ce qui montre un très faible développement.

Les concentrations 1/10^e et 1/100^e, ne présentent aucune inhibition.

Le témoin d'HE présente un halo de 17 mm de diamètre donc le pouvoir antifongique est excellent, et on lui attribue trois croix (+++).

Le tableau suivant résume les résultats obtenus par le traitement des champignons par les concentrations d'huile essentielle d'Origan après 15 jours d'incubation à l'étuve.

Tableau 6 : Les diamètres des zones d'inhibitions des champignons testés par les concentrations d'HE d'origan après 15 jours d'incubation.

	Diamètre des zones d'inhibitions				
	Solution Mère	1 ^{ère} dilution [1/10 ^e]	2 ^{ème} dilution [1/100 ^e]	Témoin d'HE pure	Témoin de méthanol pur
<i>Aspergillus ochraceus</i>	-	-	-	6 mm	-
<i>Aspergillus fumigatus</i>	2 mm	1 mm	-	40 mm	-
<i>Aspergillus sp</i>	1 mm	-	-	17 mm	-

L'huile essentielle d'Origan a manifesté un bon pouvoir antifongique. Les champignons ont montré une sensibilité accrue à l'augmentation de la concentration d'huile dans les boîtes. Le diamètre des halos augmente à chaque fois qu'on augmente la dose de l'huile jusqu'à une inhibition totale où aucune croissance n'est observée.

- *Aspergillus fumigatus* après 3 jours d'incubation

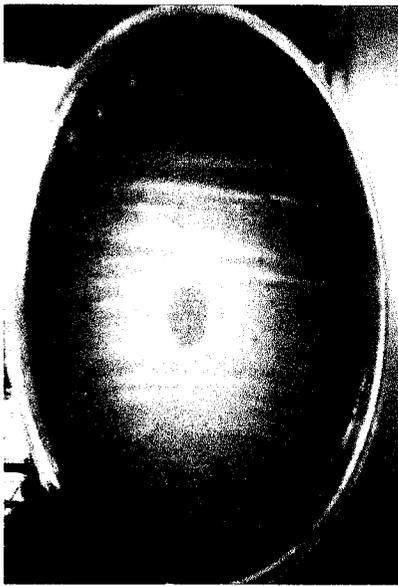


Fig 12: *A.F* avec solution
Mère

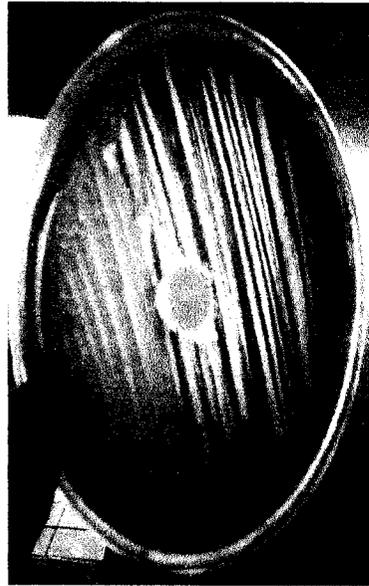


Fig 13: *A.F* avec dilution
[1/ 10^e]

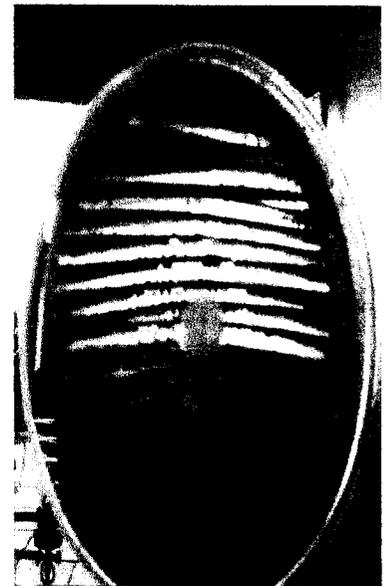


Fig 14: *A.F* avec dilution
[1/ 100^e]



Fig 15: *A. fumigatus* avec méthanol pur.



Fig 16: *A. fumigatus* avec l'HE pure.

- *Aspergillus ochraceus* après 3 jours d'incubation

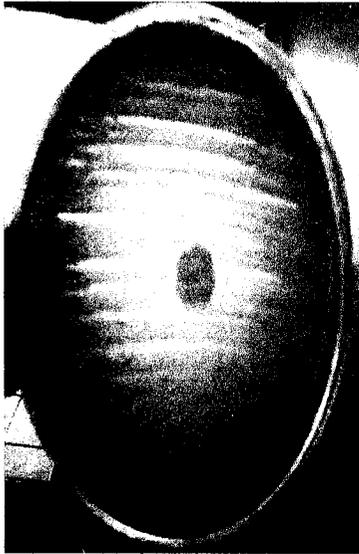


Fig 17 : *A.O* avec solution
Mère



Fig 18 : *A.O* avec dilution
[1/ 10^e]



Fig 19 : *A.O* avec dilution
[1/ 100^e]



Fig 20 : *A. ochraceus* avec méthanol pur.

Fig 21 : *A. ochraceus* avec H.E Pure.

- *Aspergillus sp* après 3 jours d'incubation



Fig 22 : *A. sp* avec solution
Mère

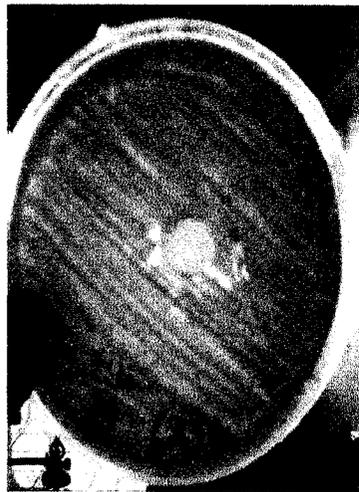


Fig 23 : *A. sp* avec dilution
[1/ 10°]



Fig 24 : *A. sp* avec dilution
[1/ 100°]



Fig 25 : *Aspergillus sp* avec méthanol pur.

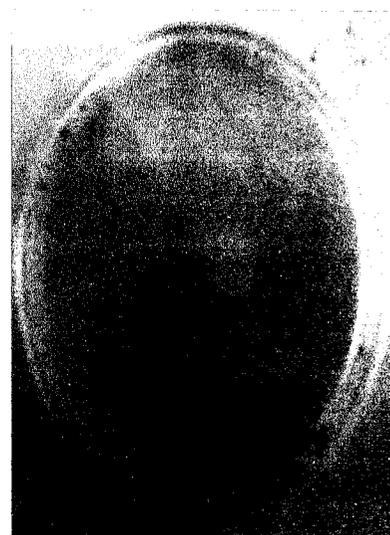


Fig 26 : *Aspergillus sp* avec HE pure.

III- Discussion

Dans le but de l'estimation de la teneur en huiles essentielles d'*Origanum glandulosum* de la région de Jijel, nous avons réalisé une hydrodistillation.

Les résultats obtenus montrent qu'une grande quantité de matière végétale est nécessaire pour en extraire une quantité infime d'HE, malgré le rendement en huile essentielle d'*Origanum glandulosum* obtenu reste le mieux par rapport aux autres types d'HE avec un rendement moyen de 0,4 pour 100 g de matière végétale. Cette espèce est très abondante dans notre région et peut quand même nous fournir cette substance bioactive.

On peut en déduire aussi que les huiles d'Origan à l'état pure ont montré une très bonne activité antifongique par rapport aux 03 champignons étudiés ; ces huiles pouvant remplacer d'autres produits phytosanitaires antifongique portant préjudice à l'environnement. Méritent une étude approfondie pour connaître plus leur activité et / ou leur toxicité par d'autre testes biologique.

L'analyse chromatographique en phase gazeuse a montré que le constituant majoritaire est le thymol qui représente presque 50% des huiles essentielles d'Origan suivi de 27,31% de carvacrol, ces 02 constituants à pour leur propriétés anti-oxydante sont connus pour leurs effets antifongiques. [5]

Les testes de ces huiles essentielles sur 03 espèces de champignons qui s'attaquent au châtaigner (*Castania sativa*), qui pousse spontanément dans la forêt, et après leur culture in vitro et leur traitement par les huiles essentielles d'*Origanum glandulosum*, à différentes dilutions (solution mère, 1/ 10^e, 1/ 100^e et l'huile essentielle non diluées), on note qu'aux dilutions de 1/ 10^e et la solution mère par rapport à *l'Aspergillus fumigatus* et *l'Aspergillus sp* un début de croissance ensuite un arrêt de développement dont l'halo n'a pas dépassé les 2mm.

La dilution 1/ 100^e n'a manifesté aucune activité antifongique.il est de même pour le méthanol.

Pour ce qui est des huiles essentielles d'*Origanum glandulosum* à l'état pur le résultat est spectaculaire où on a mesuré un diamètre d'halo entre 6 mm et 40 mm.

On note une très grande activité antifongique de ces huiles essentielles testées sur tout sur *l'Aspergillus fumigatus*. (Le diamètre d'halo 40 mm).

Ce champignon serait le plus sensible à ces huiles essentielles, suivi par *l'Aspergillus sp* et enfin *l'Aspergillus ochraceus* qui serait le moins sensible.

En effet le thymol comme le carvacrol seraient d'excellents antifongiques *d'Aspergillus fumigatus*.

Conclusion

Conclusion

Le but de notre travail est la détermination de la teneur en huile essentielle par hydrodistillation, cette dernière nous prouve qu'une grande quantité de la matière végétale est nécessaire pour extraire une quantité infime d'huile essentielle.

L'analyse qualitative et quantitative d'huile essentielle *d'Origanum glandulosum* a permis d'identifier 20 constituants, dominés par le Thymol (47,45%), et le Carvacrol (27,31%).

La détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) d'huile essentielle *d'Origanum glandulosum*, pour les trois souches *d'Aspergillus* révèle que ces dernière ont une sensibilité vis-à-vis l'huile essentielle d'origan ceci montre qu'il ya une activité antifongique.

Suivant ces résultats, nous pouvons prédire que les huiles essentielles *d'Origanum glandulosum*, sont des antifongiques biologiques et naturels très efficaces.

Ce grand pouvoir bioactif observé est attribué principalement à la teneur élevée d'huile essentielle d'Origan en phénols terpéniques (carvacrol et thymol).

Les huiles essentielles *d'Origanum glandulosum* peuvent être une source très importante de constituants phytopharmaceutiques, utilisés pour éradiquer les infections d'origine fongique.

Références

Références

- [1]- R. Catherine et C. Roger, (2005), stratégies alternatives et agriculture durable. In Enjeux phytosanitaires pour l'agriculture et l'environnement, Lavoisier, Paris, 644 pages.
- [2]- V. Couderc, (2001), toxicité des huiles essentielles, thèse de docteur vétérinaire, Toulouse, 84 pages.
- [3]- T. Mélanie, (2001), profil des produits forestiers première transformation huiles essentielles, gouvernement du Québec, Canada, 21 pages.
- [4]- A. Zhiri, (2006), aromathérapie un peu d'histoire, Nutra news science, nutrition, prévention, et santé, volume 16, N°12, pp 6 - 7.
- [5]- AFSSAPS, (2008), recommandation relatives aux critères de qualité des huiles essentielles, *s.l.* 18 pages.
- [6]- M. B. Alessandra, (2000), au cœur des huiles essentielles, In grand guide des huiles essentielles santé beauté bien être, hachette pratique, pp 27- 28.
- [7]- A. Zhiri et D. Baudoux, *s.d.* les huiles essentielles les chémotypées et leurs synergies, Inspir Développement, Luxembourg, 6 pages.
- [8]- A.V. Prabhu K. khelfane et S. bekal, (1992), compilation des maladies fongiques des plantes en Algérie, office de la publication universitaire, Alger, pp 6-35.
- [9]- L. Philippe, (2000), les champignons phytopathogènes, In phytopathologie, de Boeck, Belgique, pp 289-297.
- [10]- M. Philippe, (2004), les problèmes phytosanitaires, Adalia des coccinelles plutôt que des pesticides, volume 42 N°1, pp 3-4.
- [11]- H. Defranco, (1984), les principes maladies bactériennes et cryptogamiques des pommes de terre, F.A.O en protection des végétaux, *s.l.* 82 pages.
- [12]- A. Claud, (2007), microorganismes utilisés en agriculture, académies d'agriculture, Paris, pp 3-4.
- [13]- C. Vincent, (1992), la lutte biologique, Gaëtane Morin éditeur, *s.l.* 671 pages.
- [14]- N. Hawlitzky et P. Zagatti, (1987), concept et méthodes de la lutte biologique, Fabuleux insectes, N° hors série, pp 70-73.
- [15]- P. Grison, (2004), la lutte biologique un aperçu historique, Inothèque francophone, volume 13, N°15, pp 10-11.
- [16]- P. Lepoivre, (2003), Phytopathologie, De Boeck, Bruxelles, 427 pages.
- [17]- J. Clément, (1978), écologie des champignons forestiers, bordas, paris, 78pages.
- [18]- P. Bye C. Descoins et A. Deshayes, (1991), pytosanitaires protection des plantes biopesticides, INRA, paris, 460 pages.

- [19]- D. Bernadette et M. Jean, (1983), les antagonismes microbiens mode d'action et application de la lutte biologique contre les maladies des plantes, INRA, paris, pp 8-40.
- [20]- C. Rémi, (1997), identifier les champignons transmis par les semences, INRA, paris pp 154-359.
- [21]- D. Blancard, (1988), maladies de la tomate : observer, identifier et lutter, INRA, paris, 232 pages.
- [22]- D. Blancard H. Lecoq et M. Pitrat, (1991), maladies des cucurbitacées : Observer, identifier et lutter, INRA, paris, 320 pages.
- [23]- P. Bondoux, (1992), maladies de conservation des fruits à pépins : pomme et poires, INRA –DHM, paris, 228 pages.
- [24]- C. Roger, (1990), principe de phytopathologie et de lutte contre les maladies des plantes, presse polytechniques et universitaire romandes, Suisse, pp 11-29.
- [25]- N. Jean et C. Michel, (2004), stratégies de protection des cultures, In expertise scientifique collective ; pesticide, agriculture et environnement, INRA, Paris, 20 pages.
- [26]- P. Quezel et P. S. Santa, (1963), nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales, Tome II, Centre National de la Recherche Scientifique, Paris.
- [27]- L. Burrous, (1990), la nature comestible, Delachaux et Niestlé, paris, pp 60.
- [28]- M. Hmamouchi, (1996), plante alimentaires, aromatiques, condimentaires, et toxiques au Maroc, unité de recherche : plantes médicinales et aromatiques, Rabat, pp 94-96.
- [29]- L. Boussouf, (2006), effet de certaines plantes aromatiques sur les germes pathogènes isolés à partir de produits pathologiques des animaux domestiques, magister en biologie, université de Jijel, 84 pages.
- [30]- P. Arpino A. Prévôt J. Serpinet J. Tranchant A. Vergnol et P. Witier, (1995), manuel pratique de chromatographie en phase gazeuse, Masson, paris.
- [31]- E. Constantin, (1996), spectrométrie de masse, Lavoisier Tec & Doc, paris, PP 1-14.
- [32]- E. Kovats, (1995), Gas chromatographic characterization of organic substances in the retention index system, in advances in chromatography, chap, pp 229- 247.
- [33]- P. Longevialle, (1981), spectrométrie de masse des substances organiques, Masson, Paris, pp 3-14 et 83- 98.
- [34]- P. Julien, (2005), caractérisation des huiles essentielles par CPG/Ir, CPG/SM-(IE et IC) et RMN du carbone-13 de *Cistus albidus* et de deux astéraceae endémiques de corse: *Eupatorium cannabinum* subsp. *corsicum* et *Doronicum corsicum*, docteur en Chimie Organique et Analytique, université de Corse Pascal Paoli, 342 pages.

- [35]- H. O. Leon Raul, (2005), substitution de solvants et matières actives de synthèse par un combine « solvant/actif » d'origine végétale, Docteur en Sciences des Agroressources, université Toulouse, 224 pages.
- [36]- A. Ben hassena, (2009), induction de la réaction de défense chez les plantes pour lutter contre les maladies, Ingénieur, Institut national agronomique de Tunisie, Tunis, 189 pages.
- [37]- V. Jean C.H. Durafford et J.C.L. Lapaz, (1979), une médecine nouvelle, phytothérapie et aromathérapie, presse de la renaissance, paris, 12 pages.
- [38]- V. Jean, (1990), aromathérapie : traitement des maladies par essences des plantes, 11^e édition : Malonie, Paris.
- [39]- I. Paul, (1997), l'action des plantes médicinales, In encyclopédies des plantes médicinales : identification, préparations, soins, paris, Larousse Bordas, 335 pages.
- [40]- T. Raymonde D. Marie et D. Françoise, (1994), huiles douces et plantes à parfums. Ed sud, Paris.
- [41]- F. M. Roquebert, (2002), les contaminants biologiques des biens culturels, muséum national, paris.

Sites d'internet

- [42]-[www. Image/m. Aspergillus _ fumigatus. Jpg](#)
- [43]-[www. Beauteetnature.com](#)

Présenté par : Denni nabila

Date de soutenance : 03 juillet 2011.

*Thème : Effet fongicide des huiles essentielles
d'Origanum glandulosum*

Résumé:

Dans le cadre d'une estimation des effets fongiques d'huiles essentielles obtenues par hydrodistillation à partir de la plante *Origanum glandulosum*.

Les champignons sur lesquels on a effectué les tests ; appartiennent au genre *Aspergillus* et qui sont *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus ochraceus*, *Aspergillus sp.* Ces champignons attaquent l'arbre de châtaignier (*Castania sativa*). Les résultats obtenus après le traitement de chaque champignon par différentes dilutions d'huiles essentielles identifiées d'*Origanum glandulosum* montrent que ces champignons présentent une sensibilité à ces huiles de différentes manière ; le champignon avéré le plus sensible à cette huile essentielle est *Aspergillus fumigatus*, en suite *Aspergillus sp* et enfin *Aspergillus ochraceus*, qui est le moins sensible.

Mots clés : les huiles essentielles, effet fongicide, *Origanum galndulosum*.



Summary:

As part of the estimated effects of fungal essential oils obtained by hydrodistillation from the plant *Origanum glandulosum*.

Fungi on which the tests were conducted, the genus *Aspergillus* and which are: *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus ochraceus*, *Aspergillus sp.* These fungi attack the chestnut tree (*Castania sativa*). The results obtained after treatment of each mushroom with different dilutions of essential oils of *Origanum glandulosum* identified show that these fungi are sensitive to these oils in different ways, the fungus proved most sensitive to the essential oil is *Aspergillus fumigatus* in *Aspergillus sp* later and finally *Aspergillus ochraceus*, which is the least sensitive.

Keywords: essential oils, effects of fungal , *Origanum galndulosum*.

ملخص

في إطار دراسة فعالية الزيوت الأساسية لزيت الزعتر في منطقة جيجل و المستخلصة بطريقة التقطير البخاري على مستوى مخبر العلوم بجامعة جيجل على الفطريات التي تهاجم شجرة الكستناء. تمكنا من عزل ثلاثة أنواع من الفطريات حيث بينت التجارب التي قمنا بها و المتضمنة معالجة هذه الفطريات بتخفيف الزيت الأساسي للزعتر بأن لها فعالية ضدها.

الكلمات المفتاحية: الزيوت الطيارة, التأثير الفطري, الزعتر.