

Faculté des sciences de la nature et de la vie  
Département des sciences de l'environnement et des  
sciences agronomiques



كلية علوم الطبيعة والحياة  
قسم علوم المحيط و العلوم الفلاحية

جامعة محمد الصديق بن يحيى  
كلية علوم الطبيعة والحياة  
المكتبة  
رقم الجرد : ..... 2016

### Mémoire de fin d'études

En vue de l'obtention du diplôme de Master académique en Biologie

Option : *Phytopharmacie et gestion des agrosystèmes*

### Thème

**Evaluation de l'activité antifongique des huiles essentielles issues de deux plantes aromatiques (Romarin et Eucalyptus), contre le *Botrytis cinerea* agent causal de la pourriture grise des fraisiers**

#### Jury :

Président : M<sup>r</sup> Sebti M.

Examinatrice : M<sup>me</sup> Bouziane Z.

Encadreur : M<sup>r</sup> Bouldjedri M.

#### Présenté par :

➤ Sakhri Wafa

➤ Bouchair Ourida

Session : **Juin 2016**

Numéro d'ordre : .....

Année universitaire 2015/2016

## Remerciements

*Avant tout nous adressons nos remerciements à ELLAH, le tout puissant pour la volonté, la santé et la patience qu'il nous a donné durant toutes ces longues années d'études et pour la réalisation de ce travail que nous espérons être utile.*

*Il est agréable au moment de présenter ce travail d'adresser nos remerciements à nos encadreur M<sup>r</sup>. Bouldjadri. M, qui ont bien voulu dirigés ce travail, pour tous leurs conseils et leurs encouragements. Qu'ils trouvent ici l'expression de nos profondes reconnaissances.*

*Nous remercions très sincèrement, les membres de jury M<sup>me</sup> Bouziane. Z et M<sup>r</sup> Sebti. M d'avoir accepter de faire partie de la commission.*

*Nous remercions toutes les personnes qui nous ont aidés de près ou de loin ne serait-ce que par le simple signe d'encouragement, et nos vifs remerciements aux Direction des Services Agricoles surtout M<sup>me</sup> Boukhdana. N et tout l'équipe de l'SRPV surtout M<sup>r</sup> Chaabi. A et M<sup>me</sup>*

*Bougurra. A*

# SOMMAIRE

Page

LISTE DES ABREVIATIONS.....	v
LISTE DES TABLEAUX.....	vii
LISTE DES FIGURES.....	viii
INTRODUCTION.....	01

---

## 1<sup>ère</sup> Partie

## Synthèse bibliographique

---

### Chapitre I

#### Propriétés botaniques et écologiques des plantes utilisées

---

I. Propriétés botaniques et écologiques .....	2
I.1. Romarin ( <i>Rosmarinus officinalis</i> ) .....	2
I.1.1. Origine du nom.....	2
I.1.2. Description botanique.....	2
I.1.3. Distribution géographique .....	2
I.1.4. Classification .....	3
I.1.5. Principes actifs .....	3
I.1.6. Composition chimique de romarin.....	3
I.2. <i>Eucalyptus radiata</i> .....	4
I.2.1. Origine du nom .....	4
I.2.2. Description botanique.....	4
I.2.3. Distribution géographique.....	4
I.2.4. Classification .....	5
I.2.5. Composition chimique de <i>Eucalyptus Radiata</i> .....	5

### Chapitre II

#### *Botrytis cinerea* (agent pathogène de la pourriture grise)

---

II.1. Position taxonomique.....	6
II.2. Description morphologique.....	7
II.3. Cycle biologique .....	8
II.4. Importance économique de la maladie .....	9

**Chapitre III**  
**Généralité sur les huiles essentielles**

---

III.1. Définition.....	11
III.2. Répartition et localisation.....	12
III.3. Caractéristiques physico-chimiques des huiles essentielles.....	12
III.4. Composition des huiles essentielles.....	13
III.4.1. Composition chimique.....	13
III.5. Fonction Biologique.....	14
III.6. Mode d'action des huiles essentielles.....	14
III.6.1. Cytotoxicité.....	14
III.6.2. Phototoxicité .....	15
III.7. Intérêt des huiles essentielles en phyto-protection.....	15
III.8. Propriétés médicinales.....	15
III.8.1. Antibactérienne.....	15
III.8.2. Antivirale.....	15
III.8.3. Antifongique.....	15
III.8.4. Antiparasitaire.....	16
III.8.5. Antiseptique.....	16
III.9. Méthodes d'extraction.....	16
III.10. Conservation des huiles essentielles.....	17

---

2<sup>ème</sup> Partie

Partie pratique

---

**Chapitre IV**

**Matériel et méthodes**

---

IV.1. Présentation et situation de la zone d'étude.....	18
IV.2. Matériel végétal.....	18
IV.2.1. Préparation des extraits.....	18
IV.2.1.1. Séchage et Broyage.....	18
IV.2.1.2. Processus d'extraction des huiles essentielles.....	19
IV.2.1.3. Détermination des rendements en huiles essentielles.....	20
IV.3. Matériel fongique.....	20

IV.3.1. Prélèvements des échantillons.....	20
IV.3.2. Isolement des champignons phytopathogènes des fraises.....	21
IV.3.2.1. Isolement sur le milieu PDA (Potato Dextrose Agar) .....	21
IV.3.2.1.1. Préparations des précultures.....	21
IV.3.2.1.2. Isolement des microorganismes... ..	22
IV.3.2.1.3. Purification des isolats fongiques.....	22
IV.3.2.1.4. Identification des isolats fongiques.....	23
IV.4. Tests antifongiques.....	23
IV.4.1. Principe de la méthode de contact direct.....	24
IV.4.1.1. Préparation de la gamme de dilutions.....	24
IV.4.1.2. Ensemencement et incubation des boîtes de Pétri.....	24
IV.4.1.3. Paramètres étudiés.....	25
IV.4.1.3.1. Evaluation de la croissance mycélienne.....	25
IV.4.1.3.2. Taux d'inhibition (TI%).....	25
IV.4.1.3.3. Détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI) .....	26
IV.4.1.3.4. Détermination de la vitesse de croissance mycélienne (VC) .....	26
IV.5. Technique d'Aromatogramme pour la détermination de l'activité antifongique des H.E.....	26
IV.5.1. Préparation de différentes dilutions des huiles essentielles.....	27
IV.5.2. Expression des résultats.....	27
IV.5.3. Lecture des résultats.....	27

## Chapitre v

### Résultats et discussion

---

V.1. Résultats.....	28
V.1.1. Examen organoleptique.....	28
V.1.2. Rendements d'extraction.....	29
V.1.3. Identification de <i>Botrytis cinerea</i> .....	29
V.1.4. Résultats des tests antifongiques.....	30
V.1.4.1. Méthode de contact direct.....	30
V.1.4.1.1. Evaluation de la croissance mycélienne.....	30
V.1.4.1.2. Taux d'inhibition (TI%).....	34

V.1.4.1. 3. Détermination des concentrations inhibitrices (CMI) .....34  
V.1.4.1.4. Détermination de la vitesse de croissance mycélienne (VC) .....35  
V.1.4.2. Méthode de l'Aromatogramme.....35  
V.2. Discussion.....37

---

Conclusion.....39

---

Références bibliographiques.....40

---

**Annexes**

---

## Liste des abréviations

---

**B. cinerea** : *Botrytis cinérea*

**CCM** : Chromatographie sur Couche Mince

**cm** : centimètre

**CMI** : Concentration Minimale Inhibitrice

**DL<sub>50</sub>** : Dose Létale Médiane

**ha** : hectare

**H.E.** : Huile essentielle

**Ex** : Exemple

**g** : gramme

**kg** : kilogramme

**m** : mètre

**MC** : Milieu de culture

**ml** : millilitre

**mm** : millimètre

**n°** : numéraux

**Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>** : sulfate de sodium

**ONM** : Office National de Météorologie

**PDA** : Potato Dextrose Agar

**pH** : Potentiel hydrogène

**R<sub>HE</sub>** : Rendement d'huile essentielle

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

**SRPV** : Station Régional Protection des Végétaux

**TI**: Taux d’Inhibition

**UV** : Ultra Violet

**μl** : microlitre

**VC** : Vitesse de Croissance

**%** : Pourcentage

**°C** : Degrés Celsius

## Liste des tableaux

---

<b>Tableau 01</b> : Les parties de certaines plantes riches en huiles essentielles.....	12
<b>Tableau 02</b> : Identification et transformation des échantillons des deux plantes étudiées .....	19
<b>Tableau 03</b> : Valeurs des dilutions utilisées pour déterminer les CMI .....	24
<b>Tableau 04</b> : Propriétés organoleptiques des l'huiles essentielles.....	28
<b>Tableau 05</b> : Rendement en huile essentielle pour les deux plantes étudiées.....	29
<b>Tableau 06</b> : Descriptions des caractères macroscopiques et microscopiques de <i>Botrytis cinérea</i> .....	29
<b>Tableau 07</b> : Evaluation de la croissance mycélienne de l'espèce fongique / 7jours. ....	32
<b>Tableau 08</b> : Les diamètres des zones d'inhibitions dans les différentes boîtes testées.....	36

## Liste des figures

---

<b>Figure 01</b> : Aspect morphologique de <i>Rosmarinus officinalis</i> L .....	03
<b>Figure 02</b> : Aspect morphologique de <i>Eucalyptus radiata</i> .....	05
<b>Figure 03</b> : Cycle de développement de la pourriture grise chez <i>Botrytis cinerea</i> .....	09
<b>Figure 04</b> : Symptômes causés par l'agent pathogène <i>Botrytis cinerea</i> sur différents hôtes .....	10
<b>Figure 05</b> : Formule chimique de l'isoprène.....	13
<b>Figure 06</b> : Les étapes de l'obtention d'une huile essentielle .....	16
<b>Figure 07</b> : Carte de localisation et limites de la wilaya de Jijel .....	18
<b>Figure 08</b> : Processus d'extraction des H.E, A : dispositif (Clevenger), B : Extraction (H.E + Hydrolat) (Photos présent au niveau du laboratoire N°11 de la faculté SNV-Jijel).....	20
<b>Figure 09</b> : A : champ de fraises à El-Kennar ; B : fruits de fraise attaqué par le Botrytis .....	21
<b>Figure 10</b> Photo des fruits de fraise envahit par le Botrytis.....	22
<b>Figure 11</b> : Schéma d'un aromatoigramme résumant les différentes formes de résultats.....	26
<b>Figure 12</b> : (A) Huile essentielle de romarin et (B) eucalyptus obtenue par hydrodistillation .....	28
<b>Figure 13</b> : Histogramme présentant les rendements en huile essentielle des deux espèces Etudiée.....	29
<b>Figure 14</b> : Observation microscopique de <i>Botrytis cinérea</i> sous microscope .....	30
<b>Figure 15</b> : Schéma présentant les résultats obtenus après l'application de l'H.E. d'Eucalyptus sur le <i>B.cinérea</i> par la méthode de contact direct.....	31
<b>Figure 16</b> : Schéma présentant les résultats obtenus après l'application de l'H.E. de Romarin sur le <i>B.cinérea</i> par la méthode de contact direct .....	31
<b>Figure 17</b> : Histogramme présentant effet des huiles essentielles sur le <i>Botrytis cinérea</i> (dilution 0,50%).....	32

<b>Figure 18:</b> Histogramme présentant effet des huiles essentielles sur le <i>Botrytis cinérea</i> (dilution 0,25%).....	33
<b>Figure 19:</b> Histogramme présentant effet des huiles essentielles sur le <i>Botrytis cinérea</i> (dilution 0,05%).....	33
<b>Figure 20:</b> Histogramme présentant le taux d'inhibition des H.E. des deux plantes étudiées .....	34
<b>Figure 21:</b> Histogramme présentant la vitesse de croissance mycélienne de <i>B. cinérea</i> à la présence des H.E. des deux plantes étudiées.....	35
<b>Figure 22:</b> schéma représentant l'effet des huiles essentielles de Romarin et Eucalyptus sur le <i>botrytis cinérea</i> (Aromatogramme) incubation à 25°C.....	36
<b>Figure 23:</b> représentation graphique des résultats de l'activité antifongique (Méthode d'Aromatogramme).....	37



*Introduction*

## Introduction

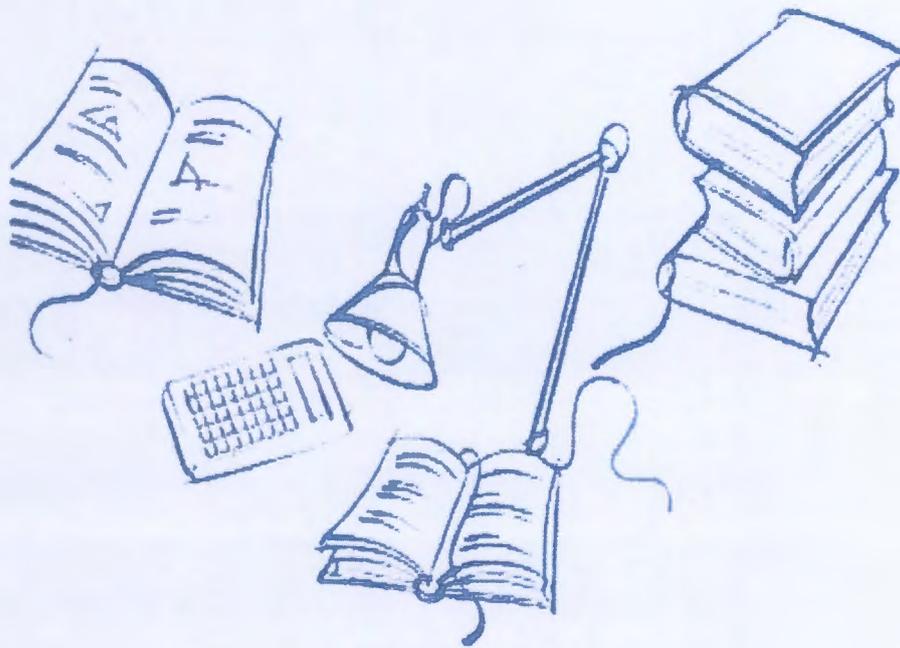
Le *Botrytis cinerea* Pers., est un champignon phytopathogène ubiquiste qui provoque des dégâts importants sur des plantes hôtes d'une grande importance économique. Il est responsable de la pourriture grise, est capable d'infecter un grand nombre de plantes cultivées (haricots, fraises, tomates, raisins, etc...) aussi bien en stockage qu'à n'importe quel stade de leur développement. L'expression de la pourriture durant la maturation des fruits est favorisée par des conditions humides et chaudes qui peuvent être à l'origine d'importantes pertes économiques durant les semaines précédant la récolte. En absence de variétés résistantes à ce pathogène, le contrôle de cette maladie est basé sur l'usage répété de fongicides, principalement des Benzimidazoles et des Dicarboximides, néanmoins l'efficacité de ces produits chimiques est limitée car ça n'empêche pas des pertes considérables de rendement, surtout en cultures sous serre. D'autre part le *B. cinerea* montre une grande résistance vis-à-vis de certaines substances chimiques de la famille des carbamates comme le Bénomyl et le Méthylthiophanate (Besri et Diatta, 1985).

La culture de fraisier est l'une des vocations de la région de Jijel, chaque saison le rendement de cette culture est menacé par le *B. cinerea*. L'utilisation de fongicides chimiques tels qu'employés en agriculture conventionnelle n'est pas la solution idéale contre cette pourriture grise et ce, pour plusieurs raisons : (1) Le champignon responsable de la maladie développe facilement une résistance aux fongicides chimiques. (2) L'efficacité de plusieurs fongicides homologués contre cette moisissure est douteuse (Besri et Diatta, 1985). (3) Les problèmes de résidus sur les fruits préoccupent un grand nombre de consommateurs.

Pour toutes ces raisons nous allons étudier l'effet des huiles essentielles de deux espèces de plantes (*Rosmarinus officinalis* et *Eucalyptus radiata*) sur la croissance d'un isolat du champignon *B. cinerea* à partir des fruits de fraises récoltés dans la région d'El-Kennar ; dans l'optique de proposer un biopesticide à base d'huiles essentielles qui peut constituer un outil de choix dans les programmes de gestion de la résistance de ce ravageur aux pesticides conventionnels, cette problématique a fait l'objet du sujet de ce mémoire dont l'étude se structure en deux parties interdépendantes :

- La première partie consacrée à une synthèse bibliographique, constituée de trois chapitres. Le premier chapitre abordera des généralités sur les deux plantes, et le deuxième portera sur le champignon et le troisième sur les huiles essentielles.
- Une seconde partie consacrée au travail pratique, constituée de deux chapitres, le premier traitera le matériel et les méthodes utilisées et le deuxième est réservé aux résultats et discussion. Enfin on termine par une conclusion et des perspectives.

*Partie I :*  
*Synthèse Bibliographique*



# *Chapitre I :*

*Propriétés botaniques et  
écologiques des plantes  
utilisées*

## I. Propriétés botaniques et écologiques des plantes utilisées

### I.1. Romarin (*Rosmarinus officinalis*)

#### I.1.1. Origine du nom

Le mot romarin (*Rosmarinus*) dérive du latin

- «Ros» : rosée
- «Marinus» : marin ou de marin (Madjour, 2014)

#### I.1.2. Description botanique

Le romarin est un arbrisseau de la famille des labiées (*Lamiacées*), peut atteindre jusqu'à 1,5 mètre de hauteur, il est facilement reconnaissable en toute saison à ses feuilles persistantes sans pétiole, coriaces beaucoup plus longues que larges, aux bords légèrement enroulés, vert sombre luisant sur le dessus, blanchâtres en dessous. La floraison commence dès le mois de février (ou janvier parfois) et se poursuit jusqu'aux mois d'avril - mai. La couleur des fleurs varie du bleu pâle au violet, elles sont groupées en grappe à l'extrémité des rameaux. Le calice velu à dents bordées de blanc, elles portent deux étamines ayant une petite dent vers leur base. Comme pour la plupart des *Lamiacées*, le fruit est un tetrakène. A une forme ovoïde, entourée par un calice brun et persistant (Madjour, 2014).

La reproduction peut se faire par voies sexuée (graine) et asexuée (bouture et éclat de touffes). Les modes de dissémination qui lui sont propres sont : la gravité, le vent, l'eau, les animaux (mammifères, oiseaux, insectes, etc.) et l'homme (Chafai et al., 2014).

#### I.1.3. Distribution géographique

C'est une plante indigène du sud de l'Europe, elle se trouve dans toutes les contrées mondiales de l'Europe, plus particulièrement sur le pourtour méditerranéen; elle pousse en abondance dans les terrains calcaires, sur les pentes montagneuses arides et ensoleillées, notamment en Espagne, en Dalmatie, en Tunisie, au Maroc et dans le sud de la France. Le prix de l'essence de Romarin n'ayant jamais été très élevé, la plante n'est pas cultivée, sauf à des fins ornementales (UNESCO, 1960).

En raison de leur saveur aromatique, les feuilles sont employées à des fins culinaires en Europe. On leur attribue aussi des propriétés emménagogues et légèrement stimulantes. L'essence de Romarin est utilisée surtout comme carminatif (en combinaison avec d'autres drogues) pour préparer des liniments rubéfiants et comme parfum (UNESCO, 1960).

## I.1.4. Classification

### I.1.4.1. Classification classique



**Règne :** Plantae

**Division :** Magnoliopta

**Classe :** Magnoliopsida

**Ordre :** Lamiales

**Famille :** Lamiaceae

**Genre :** *Rosmarinus*

**Espèce :** *Rosmarinus officinalis*

Figure 01 : Aspect morphologique de *Rosmarinus officinalis* L (Quezel et Santa, 1963)

### I.1.5. Principes actifs

Les principaux constituants du romarin responsables des différentes propriétés sont :

- **Les acides phénoliques :** acide vanillique, acide caféique (Ibañez et al., 2003).
- **Les flavonoïdes :** genkwanine, cirsimaritrine, ériocitrine, hespéridine, diosmine, lutéoline, apigénine (Ibañez et al., 2003 ; Okamura, 1994 ; Yang, 2008).

### I.1.6. Composition chimique de romarin

Le Romarin fournit de 1 à 2 % d'une essence volatile contenant 0,8 à 6 % d'esters, calculés en acétate de bornyl, et 8 à 20 % d'alcools, considérés comme étant du bornéol (UNESCO, 1960).

L'huile essentielle du romarin (1 à 2% dans la plante) contient : de l' $\alpha$ -pinène (7 à 80%), de la verbénone (1 à 37%), du camphre (1 à 38%), de l'eucalyptol (1 à 35%), du bornéol (4 à 19%), de l'acétate de bornyle (jusqu'à 10%) et du camphène.

En plus de l'huile essentielle on trouve dans le romarin : 2 à 4% de dérivés triterpéniques tels que : l'acide ursolique, l'acide oléanolique, l'acétate de germanicol ; des lactones diterpéniques : picrosalvine, dérivés de l'acide carnosolique, rosmanol, rosmadial, des acides phénoliques, des acides gras hydroxylés surtout des dérivés de l'acide décanoïque, des acides

**gras organiques** : L'acide citrique, glycolique et glycérique, des stérols, de la choline, du mucilage et de la résine (Bellakhdar, 1997 ; Beloued, 1998).

Le criblage phytochimique de l'extrait éthanolique des parties aériennes du romarin a indiqué la présence des flavonoïdes, des tannins et des saponines, et l'absence des alcaloïdes détecté dans l'extrait aqueux. Les flavonoïdes détectés par la chromatographie sur couche mince (CCM) sont la quercétine et le kaempférol (Gonzalez-Trujano et al., 2007).

## **I.2. *Eucalyptus radiata***

### **I.2.1. Origine du nom**

Le nom *Eucalyptus* provient du grec *eu* (bien) et *kaliptos* (couvert). Il évoque l'opercule recouvrant étamines et pistil, dont les variations au sein du genre permettent de classer les espèces. Le genre *Eucalyptus* comprend 7 sous-genres et environ 700 espèces. Leur nombre précis évolue au fil des études taxonomiques. Il appartient à la famille des myrtacées qui compte 90 genres et environ 3000 espèces (Laclau, 2001).

### **I.2.2. Description botanique**

*L'Eucalyptus radiata* est un bel arbre du genre *Eucalyptus*. Il est l'un de quelques 800 dans le genre. Il est proche de l'*Eucalyptus globulus*, qui sont des espèces productrices d'huiles essentielles (Mehani et Segni, 2014).

*L'Eucalyptus radiata* est également originaire d'Australie mais s'acclimate moins bien à nos régions c'est pourquoi il est difficile d'en cultiver en Afrique. On peut le trouver sous plusieurs formes : arbre d'une trentaine de mètres de haut (pouvant atteindre 50 mètres), arbrisseaux ou buisson. Le tronc est gris-bleu et l'écorce se détache en longues bandes. Il apprécie particulièrement les sols drainés des hauteurs subtropicales. Les rameaux sont rougeâtres, les feuilles jeunes opposées et sessiles et les adultes pétiolées alternes et falciformes. Le froissement des feuilles va dégager une agréable odeur, cette odeur est la meilleure de tous les *Eucalyptus* fraîche, vivifiante, très agréable (Koziol, 2015).

### **I.2.3. Distribution géographique**

La distribution géographique d'*Eucalyptus* est essentiellement dans les régions équatoriales, subtropicales, tropicales voire tempérées. Les espèces de cette famille présentent un large éventail d'habitats notamment le bassin méditerranéen, l'Amérique du sud et l'Australie où la partie tempérée de ce continent abrite une grande diversité d'espèces (Mehani et Segni, 2014).

## L2.4. Classification



**Règne :** Plantatae

**Sous règne :** Angiospermes

**Classe :** Eudicots

**Ordre :** Myrtales

**Famille :** Myrtaceae

**Genre :** Eucalyptus

**Espèce :** Eucalyptus radiata

**Figure 02 :** Aspect morphologique de l'*Eucalyptus radiata*. (Quezel et Santa, 1963)

## II.2.5. Composition chimique d'*Eucalyptus Radiata*

*Eucalyptus radiata* Cette variété radiata australiana riche en cinéol comme l'*Eucalyptus globulus* est plus douce et plus sucrée. Elle est considérée comme la meilleure en aromathérapie particulièrement indiquée pour les enfants mais aussi chez l'adulte où sa souplesse d'emploi justifie l'usage fréquent de son huile essentielle. Propriétés anti infectieux, l'huile essentielle particulièrement recommandée dans les affections respiratoires aiguës et chroniques, dans les pertes d'énergie (fatigue chronique) et dans les déficits immunitaires (Warot, 2006).

*Chapitre II :*  
*Le Botrytis cinerea*

## II. Le *Botrytis cinerea* (agent causal de la pourriture grise)

*Botrytis cinerea* Pers. [forme imparfaite (anamorphe) du *Botrytis fuckeliana* (de Bary) Whetzel] est le champignon ascomycète responsable de la pourriture grise chez des centaines de plantes hôtes au niveau mondial. Il s'attaque aux fruits (ex : fraise, raisin) et aux légumes (ex : tomate, laitue) de diverses productions végétales, mais aussi aux plantes ornementales (ex : tournesol, rosier) (Leroux et al., 2002 ; Veloukas et al., 2011 ; Yin et al., 2011). Cet agent pathogène peut entraîner la destruction partielle ou totale de la plante hôte, ou même de la récolte engendrant des pertes économiques pré-et post-récolte importantes (Fernandez et al., 2012).

En plus d'être considéré comme un champignon nécrotrophe, *B. cinerea* se caractérise principalement par son ubiquité, son saprophytisme, sa grande variabilité génétique et sa capacité de s'adapter facilement à son environnement (De Miccolis et al., 2010 ; Kretschmer et Hahn, 2008 ; Martinez et al., 2005). Certains suggèrent que cette capacité d'adaptation, résulte entre autres d'un cycle de vie très court ainsi que d'une reproduction prolifique (Brent et Hollomon, 2007 ; Yin et al., 2011).

### II.1. Position taxonomique

Le *Botrytis* a été reconnu comme un genre par Micheli en 1729 où il a été répertorié dans son livre « *Nova Plantarum Genera* ». Au début il a été parfois confondu avec *Sclerotinia spp.* Mais des précisions ont été apportées par Smith en 1900 et la confusion a été dissipée par Whetzel en 1945. Le genre, redéfini en 1973 par Hennebert, comprend 22 espèces dont la plupart ont un spectre d'hôtes restreint comme par exemple *B. tulipae* sévissant sur les tulipes, *B. fabae* sur les légumineuses ou *B. squamosa* sur les oignons (Hennebert, 1973). Au contraire, *B. cinerea* est ubiquiste et on dénombre de nombreuses espèces de plantes sur lesquelles il peut engendrer des dégâts sérieux avant et après la récolte. Le nom *Botrytis cinerea* a été donné par Persoon en 1801 à un agent pathogène de la fraise. Ce champignon comme beaucoup d'autres connaît une double classification:

- une forme parfaite (téléomorphe), *Botryotinia fuckeliana* (de Barry) Wetz. C'est un Ascomycète, de la classe des Discomycètes, de l'ordre des Léotiales, famille des Sclerotiniaceae.
- une forme imparfaite (anamorphe), *Botrytis cinerea* Pers. C'est un Deutéromycète de la classe des Hyphomycètes, de l'ordre des Moniliales, famille des Moniliaceae. C'est De Barry (1866) qui a établi une relation génétique entre *Botrytis cinerea* Pers, organisme asexué, et *Botryotinia fuckeliana* appelé au départ *Peziza fuckeliana*, organisme sexué.

(Groves et Drayton 1939) observent pour la première fois, *in vitro*, la formation d'apothécies par *B. cinerea* confirmant le lien systématique entre les deux formes du champignon. C'est cependant le nom de *B. cinerea*, largement connu par les mycologistes et phytopathologistes qui fut retenu alors que généralement le nom scientifique d'un champignon est donné par sa forme sexuée.

## II.2. Description morphologique

Le champignon phytopathogène *Botrytis cinerea* peut se présenter ou survivre sous différentes formes telles que le sclérote, le mycélium, les macroconidies, les microconidies et les ascospores.

**Le sclérote :** Il se développe dans les tissus morts de son hôte et est considéré comme la principale structure de survie du champignon durant l'hiver. Il est formé par une masse mycélienne dense plutôt arrondie, entouré d'un cortex rigide contenant des pigments de mélanine. Ces caractéristiques le protègent de la dessiccation, des rayons ultra-violets et des attaques de microorganismes sur de longues périodes (Williamson et al., 2007).

**Le mycélium :** Il est aussi une structure qui peut survivre dans les tissus morts de son hôte et est constitué d'hyphes septés et perforés d'un pore central. Il comprend des filaments articulés, grisâtres ou olivâtres, cylindriques, quelque fois vésiculeux au niveau de la cloison médiane, dont le diamètre varie considérablement suivant les conditions de développement des hyphes (Ajouz, 2009).

**Les macroconidies :** Elles ont la particularité d'être des cellules uniques, multinucléées, différenciées (stade final de développement) et au stade de dormance (fonctionnement du métabolisme limité pour sa survie) (Agrios, 2005). Le fait que les macroconidies possèdent la caractéristique d'être hétérocaryotiques est très avantageux. Cette caractéristique confère au champignon *B. cinerea* une plus grande variabilité génétique et donc la possibilité de s'adapter plus rapidement aux conditions du milieu, par exemple aux fongicides (Williamson et al., 2007 ; Leroux, 2004).

**Les microconidies (spermaties) :** Ce sont des gamètes mâles uninucléés jouant un rôle dans la reproduction sexuée du champignon.

**Les ascospores :** Au nombre de huit par asque, elles sont oblongues à elliptiques. Un asque contient huit ascospores binucléés qui germeront pour produire un mycélium (Williamson et al., 2007). Les asques sont produits sur des apothécies, fructifications d'ascomycètes assurant la reproduction sexuée.

### II.3. Cycle biologique

*Botrytis cinerea* est un champignon à dissémination aérienne. Les lésions présentes sur les tiges où les feuilles des plantes témoignent de la présence du champignon. Lorsque les conditions sont favorables, celui-ci va former de nombreuses spores (conidies) par mitose. En une semaine, 1 g de tissus comportant des lésions peut produire jusqu'à 20 millions de spores, ce qui explique une propagation rapide du champignon (Nicot et Baille, 1996). Les courants d'air transportent ces conidies ainsi que des fractions de mycélium et les dispersent plus ou moins loin, vers de nouveaux hôtes. Dans la région d'Avignon, des études ont montré que des conidies de *B. cinerea* sont présentes dans l'air tout au long de l'année (Leyronas et Nicot, 2013). Lorsqu'une spore arrive sur une plante, quelques heures suffisent pour que la germination ait lieu. Cette germination est favorisée si le pourcentage d'humidité est élevé (Elad et al., 2004). Une fois que *B. cinerea* est installé, il se développe et forme des conidiophores, qui portent les nouvelles conidies. Ces conidiophores sont ramifiés et se forment à partir du mycélium quand le champignon est suffisamment mature. Les spores se forment 3 jours après l'installation du champignon, et peuvent assurer une nouvelle dissémination aérienne. Ainsi, le cycle de *B. cinerea* (figure 3) en conditions favorables peut durer 4 jours, ce qui est relativement rapide. A la fin de la saison culturale, *B. cinerea* peut également former des petits sclérotés dans les débris végétaux. Ce sont des amas mycéliens, ovoïdes et noirs, qui lui assurent une forme de conservation dans le sol pour plusieurs années. A la saison suivante, les sclérotés forment du mycélium ou des apothécies qui sont capables d'attaquer la nouvelle culture. Les apothécies interviennent dans la reproduction sexuée du champignon (Elad et al., 2004).

Une autre voie de développement de la pourriture grise qui est très rare, même quasi inexistante en conditions environnementales est la reproduction sexuée. Elle se produit en hiver et est le résultat de la fusion entre les microconidies (spermaties) produites par le mycélium et les gamètes femelles (asques) produits dans les sclérotés. Dans ce cas-ci, le sclérote produit des structures qu'on nomme « apothécies » qui sont des fructifications sexuées. Tous les détails cellulaires de la plasmogamie ainsi que l'initiation des apothécies n'ont pas encore été décrits dans la littérature. En revanche, les apothécies contiennent les asques qui sont les cellules reproductrices des champignons ascomycètes. Chacune de ces asques contient 8 ascospores haploïdes. Lorsqu'il y a germination, les ascospores produisent un mycélium sur lequel se différencient des conidiophores qui produisent les macroconidies (Williamson et al., 2007).

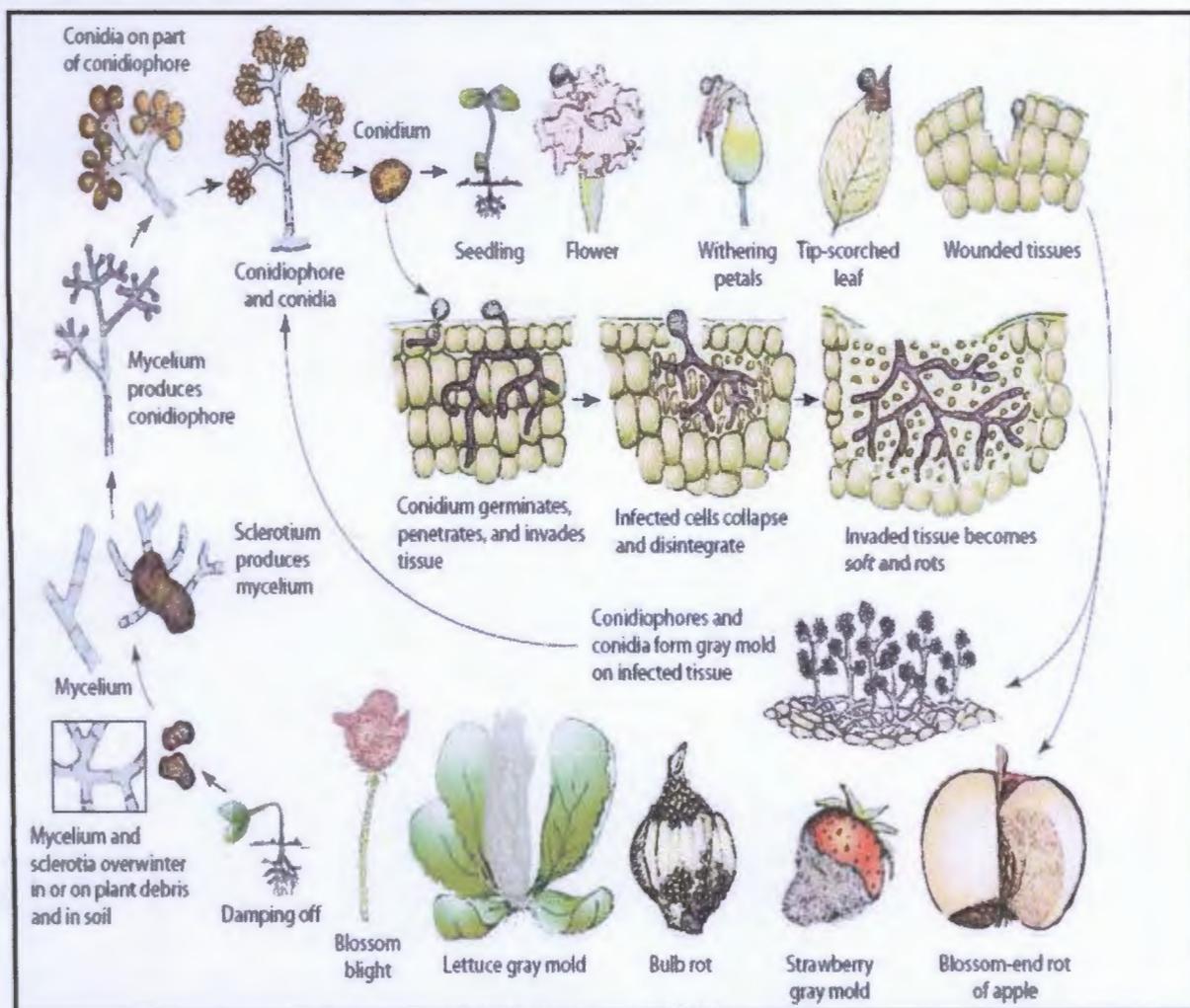


Figure 03 : Cycle de développement de la pourriture grise chez *Botrytis cinerea* (Agrios, 2005)

#### II.4. Importance économique de la maladie

*Botrytis cinerea* peut entraîner la destruction partielle ou totale de la plante hôte, et dans certains cas de la récolte. Sur le plan économique, ce champignon est par exemple considéré comme un problème phytosanitaire majeur en viticulture dans le monde (Martinez et al., 2005). Il peut s'attaquer à différents stades de développement et l'infection par les conidies peut se produire durant toute la saison de croissance: début d'inflorescence, floraison, véraison, stade végétatif et fruits (Kretschmer et al., 2007). On estime les pertes mondiales dues à *B. cinerea* sur vigne à 2 milliards par an (Elmer et Michailides, 2004). De plus, le développement rapide et insidieux de *B. cinerea* engendre chaque année la destruction de récoltes sur des centaines d'hectares de cultures viticoles (Bolay et Pezet, 1987). Les pertes estimées pour la vigne en France correspondent à 15-40% des récoltes selon les conditions climatiques (Cilindre et al., 2007). En cultures sous abris, les risques d'attaque par ce champignon pathogène sont permanents sur par exemple, la fraise, la tomate, le poivron ou la laitue (Jarvis, 1992). Dans une étude effectuée sur 15 serres du sud de la France, (Nicot et

Baille, 1996) ont montré que l'incidence de *B. cinerea* entre mai et juin 1991 variait de 32 à 100%, et que la mortalité des plantes atteignait 46% dans certaines serres. Dans une enquête de plus grande envergure menée dans la même région à la fin avril 1993, (Terrentroy, 1994) a montré que les attaques de *B. cinerea* ont été trouvées dans 58 des 73 serres de tomates étudiées et une mortalité partielle des plantes par le champignon a été enregistrée dans 31 de ces serres. Le pathogène attaque les feuilles en provoquant des lésions brunes avec des bordures jaunes qui se propagent vers le nœud des tiges végétatives pour augmenter la taille des lésions. Ces pertes sont estimées à 20-25% des récoltes de fraises en Espagne et à 20% des fleurs coupées aux Pays-Bas (site web1).

Pour combattre la maladie, l'utilisation de fongicides entraîne des coûts financiers importants. Le marché mondial des produits de contrôle de *B. cinerea* est estimé à 15-25 millions de dollars par an (Elad et Stewart, 2004).



Figure 04 : Symptômes causés par l'agent pathogène *Botrytis cinerea* sur différents hôtes

(Ajouz, 2009)

*Chapitre III:*  
*Généralité sur les huiles*  
*essentielles*

### III. Généralité sur les huiles essentielles

#### III.1. Définition

Plusieurs définitions sont disponibles des huiles essentielles.

Selon sa profession, chacun répondra à la question d'une manière différente. Une huile essentielle peut être un ensemble de molécules pour un chimiste. Un arôme pour un parfumeur. 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. 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. En général, les principes aromatiques des plantes sont des gouttes minuscules qui se forment dans les chloroplastes des feuilles, c'est-à-dire les organites dans lesquels s'effectue la photosynthèse. Elles se combinent par la suite avec du glucose et sont transportées dans toutes les parties de la plante. Une huile essentielle est donc une sécrétion naturelle qui s'effectue dans une partie du végétal : la feuille, l'écorce ou la fleur (Buronzo, 2008).

La définition donnée par (AFNOR, 2000), est la suivante : les huiles essentielles sont des produits obtenus à partir d'une matière première d'origine végétale, soit par entraînement à la vapeur d'eau, soit par des procédés mécaniques à partir de l'épicarpe des Citrus, soit par distillation sèche.

Les huiles essentielles sont des extraits végétaux volatiles et odorants appelés également substances organiques aromatiques liquides, qu'on trouve naturellement dans diverses parties des arbres, des plantes et des épices, elles sont volatiles et sensibles à l'effet de la chaleur, elles ne contiennent pas de corps gras (Yahyaoui, 2005). La teneur en huile essentielle d'une plante aromatique se situe entre 0.01 et 10% (Koul *et al.*, 2008).

Une huile essentielle est une substance complexe comportant généralement entre 20 et 60 composants. Elle est caractérisée par deux ou trois constituants majeurs en termes de concentration qui lui confèrent ses propriétés (odeur, couleur, activité...). Il faut savoir que la composition des produits d'extractions des plantes aromatiques peut varier selon divers facteurs. En effet, le produit d'extraction d'une même espèce de plante peut varier en qualité, en quantité et en composition selon le climat, le type de sol, le type d'organe de la plante utilisée pour l'extraction ainsi que son âge. Cette identité chimique particulière est appelée le chémotype. L'huile essentielle est séparée de la phase aqueuse par des procédés physiques (voir Figure 06) (Bakkali *et al.*, 2008).

### III.2. Répartition et localisation

On rencontre les huiles essentielles dans divers familles botaniques elles se localisent dans toutes les parties vivantes de la plante et forment dans le cytoplasme de cellules spécialisées (Degryse et al., 2008).

Les huiles essentielles n'existent quasiment que chez les végétaux supérieurs. Elles sont produites dans le cytoplasme des cellules sécrétrices et s'accumulent en générale dans des cellules glandulaires spécialisées. Ensuite, elles sont stockées dans des cellules dites cellules à huiles essentielles (Lauraceae), dans des poiles sécréteurs (Lamiaceae), dans des poches sécrétrices (Myrtacée), dans des canaux sécréteurs (Astraceae). Elles peuvent être stockées dans divers organes végétaux : les fleurs (bergamotier, rose,..) les feuilles (citronnelle, eucalyptus,...), les racines (vétiver), les rhizomes (curcuma, gingembre,...), les fruits (anis, badiane,...), le bois (bois de rose, santal,...), ou graines (muscade,...) (Oussala, 2006).

**Tableau 01** : Les parties de certaines plantes riches en huiles essentielles

Partie de plante	Exemple
Feuilles	Romarin, sauge
Feuilles de confères	Sapin, cèdre
Tiges	Citronnelle, lemongrass
Écorces	Cannelier
Racines	Angelica, vetiver
Rhizomes	Acorus, gingembre
Bulbes	Oignon
Bois	Santal
Fruits	Bleuet, citron
Fleurs	Jasmin, rose
Graines	Aneth

(Garneau, 2001)

### III .3. Caractéristiques physico-chimiques des huiles essentielles

En ce qui concerne les propriétés physico-chimiques, les huiles essentielles forment un groupe très homogène (Bruneton, 1993), Les principales caractéristiques sont :

- Liquides à température ambiante.
- Volatiles et très rarement colorées.
- Une densité faible pour les huiles essentielles à forte teneur en monoterpènes.

- Un indice de réfraction variant essentiellement avec la teneur en monoterpènes et en dérivés oxygénés (une forte teneur en monoterpènes donnera un indice élevé, cependant une teneur élevée en dérivés oxygénés produira l'effet inverse).
- Solubles dans les alcools et dans la plupart des solvants organiques mais peu solubles dans l'eau.
- Douées d'un pouvoir rotatoire puisqu'elles sont formées principalement de composés asymétriques.
- Très altérables, sensibles à l'oxydation et ont tendance à se polymériser donnant lieu à la formation de produits résineux, il convient alors de les conserver à l'abri de la lumière et de l'humidité (Zabeirou et Hachimou , 2005).

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) (AFSSAPS, 2008).

### III.4. Composition des huiles essentielles

#### III.4.1. Composition chimique

Les huiles essentielles sont des mélanges complexes et variables de constituants qui appartiennent, de façon quasi exclusive, à deux groupes :

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

D'après (Guenter, 1975) La structure des composés des huiles essentielles est constituée d'un squelette hydrocarboné, constituant une chaîne plus ou moins longue. Sur ce squelette de base est souvent présent un ou plusieurs sites fonctionnels semblables ou différents. La majorité des sites fonctionnels sont des sites oxygénés avec un ou plusieurs atomes d'oxygène, pour quelques groupes fonctionnels azotés ou soufrés.

Les huiles essentielles sont avant tout des composés terpéniques. Du strict point de vue chimique, les terpènes apparaissent comme des polymères d'un carbure d'hydrogène diéthylénique ; l'isoprène.

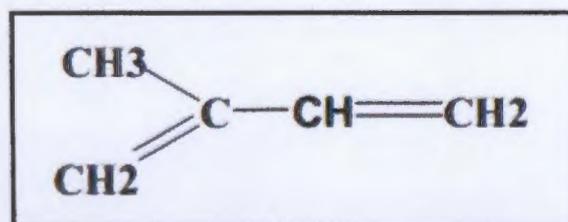


Figure 05 : Formule chimique de l'isoprène (Benayad, 2008)

Selon (Bruneton, 1993), cette structure varie en fonction :

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

Les huiles essentielles des plantes ont trouvé leur place en aromathérapie, en pharmacie, en parfumerie, en cosmétique et dans la conservation des aliments. Leur utilisation est liée à leurs larges spectres d'activités biologiques reconnues (Amarti, 2009).

### III.5. Fonction Biologique

Les huiles essentielles permettent aux plantes de s'adapter à leur environnement et assurer leur ultime défense, elles jouent plusieurs rôles écologiques:

- Interaction plante-plante (inhibition de la germination et de la croissance).
- Interaction plante animale, pour leur protection contre les prédateurs (Ormeno et al., 2007; Fouché et al., 2008).

### III.6. Mode d'action des huiles essentielles

#### III.6.1. Cytotoxicité

La toxicité des huiles essentielles vis-à-vis des cellules est principalement due à la présence de phénol, d'alcool et d'aldéhydes. De plus, au vu de leurs nombreux constituants elles semblent ne pas avoir de cibles cellulaires spécifiques (elles peuvent attaquer simultanément les membranes et divers organites) ce qui limite fortement le risque d'apparition de résistance (Bakkali et al., 2008).

### III.6.2. Phototoxicité

La plupart des composés phototoxiques absorbent de l'énergie des rayons UV présents dans la lumière. Des dérivés de ces substances peuvent alors être activés et induire des dommages au niveau des cellules (Dijoux *et al.*, 2006). Cependant, en absence de lumière, ces molécules restent parfaitement inoffensives (Bakkali *et al.*, 2008).

### III.7. Intérêt des huiles essentielles en phyto-protection

Les huiles essentielles ont un large spectre d'activité contre les insectes nuisibles des récoltes et contre les champignons pathogènes. Il est déjà connu que certains composés tels que le thymol et le carvacrol ont des propriétés antifongiques (Koul *et al.*, 2008).

De plus, les huiles essentielles sont faiblement toxiques pour les mammifères, une étude recense des valeurs de DL50 de 2-3g/kg pour le rat ce qui est 15000 fois moins toxiques que les pesticides (Isman, 2000).

En outre, les HE étant composées d'un complexe de molécules et leur mode d'action portant sur plusieurs cibles, les pathogènes auront plus de difficultés à développer une résistance contre celles-ci.

### III.8. Propriétés médicinales

#### III.8.1. Antibactérienne

Puisque les phénols (carvacrol, thymol) possèdent le coefficient antibactérien le plus élevé, suivi des monoterpénols (géraniol, menthol, terpinéol), aldéhydes (néral, géraniol) (Belkou, 2005).

#### III.8.2. Antivirale

Les virus donnent lieu à des pathologies très variées dont certaines posent des problèmes non résolubles aujourd'hui. Les huiles essentielles constituent une aubaine pour traiter ces fléaux infectieux, les virus sont très sensibles aux molécules aromatiques (Belkou, 2005).

#### III.8.3. Antifongique

Les mycoses sont d'une actualité criante, car les antibiotiques prescrits de manière abusive favorisent leur extension, avec les huiles essentielles on utilisera les mêmes groupes que ceux cités plus haut, on ajoutera les sesquiterpéniques et les lactones sesquiterpéniques (Belkou, 2005).

### III.8.4. Antiparasitaire

Le groupe des phénols possède une action puissante contre les parasites (Benayad, 2008).

### III.8.5. Antiseptique

Les aldéhydes et les terpènes sont réputés pour leurs propriétés désinfectantes et antiseptiques et s'opposent à la prolifération des germes pathogènes (Benayad, 2008).

### III.9. Méthodes d'extraction

Différentes méthodes sont mises en œuvre pour l'extraction des essences végétales. En général le choix de la méthode d'extraction dépendra de la nature du matériel végétal à traiter (graines, feuilles, ...), de la nature des composés (par exemple, huiles lourdes...), le rendement en huile et la fragilité de certains constituants des huiles aux températures élevées ; Les principales méthodes d'extraction existent sont :

1. Distillation à vapeur saturée
2. Entraînement à la vapeur d'eau
3. Hydro diffusion
4. Expression à froid
5. Extraction par solvants
6. Hydro distillation
7. Extraction par les corps gras
8. Extraction par micro- ondes

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

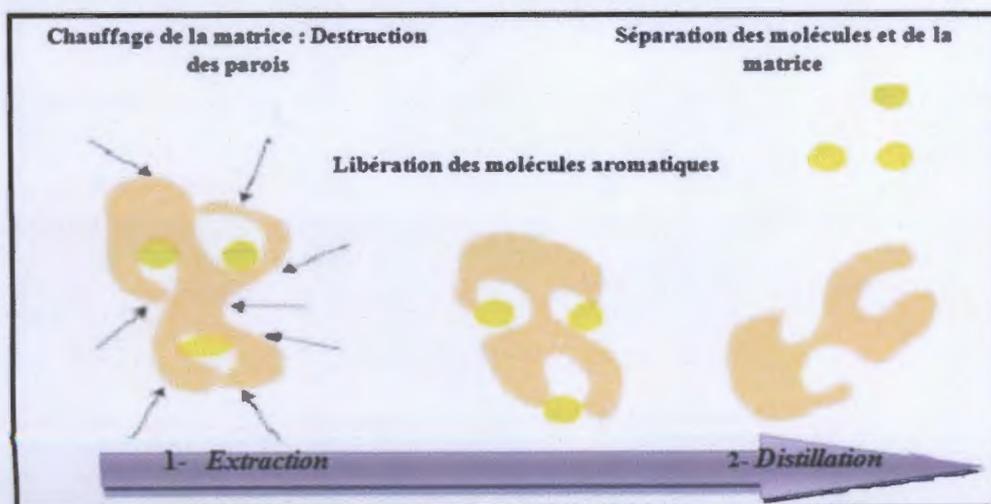
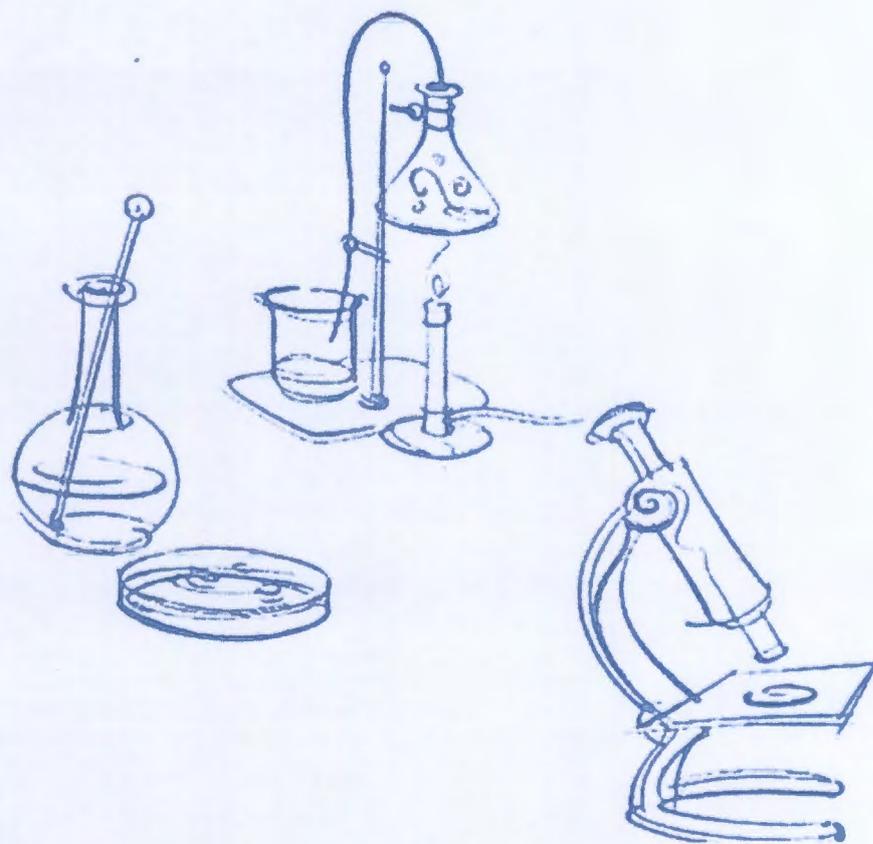


Figure 06 : Les étapes de l'obtention d'une huile essentielle (Marie, 2005)

**III.10. Conservation des huiles essentielles**

Il est recommandé de stocker les huiles essentielles dans des flacons en verre ambre ou foncé, de manière à les protéger de la lumière, il faut éviter les forts écarts de température et le contact avec l'air (pas d'ouverture prolongée des flacons). Dans ces conditions, les huiles essentielles se conservent plusieurs années.

*Partie II :*  
*Partie pratique*



*Chapitre IV :*  
*Matériel et méthodes*

## IV. Matériel et méthodes

### IV.1. Présentation et situation de la zone d'étude

La wilaya de Jijel est connue pour être une wilaya à vocation agricole, touristique, pêche et forestière mais également touristique et de pêche vu sa façade maritime. Elle est située au nord-est de l'Algérie à 5°47 de longitude Est, et 36°49 de la latitude nord. Elle est bordée au nord par la mer Méditerranée, limitée au sud par les wilayas de Sétif et de Mila, à l'est par la wilaya de Skikda et à l'ouest par la wilaya de Bejaia.

La wilaya de Jijel s'étend sur 2400 km<sup>2</sup> ; 82% de cette superficie sont situés dans les zones montagneuses dont l'altitude varie entre 0 à 500 m ; 54% de cette superficie se présente sur une pente de 25% (DSA, 2016).

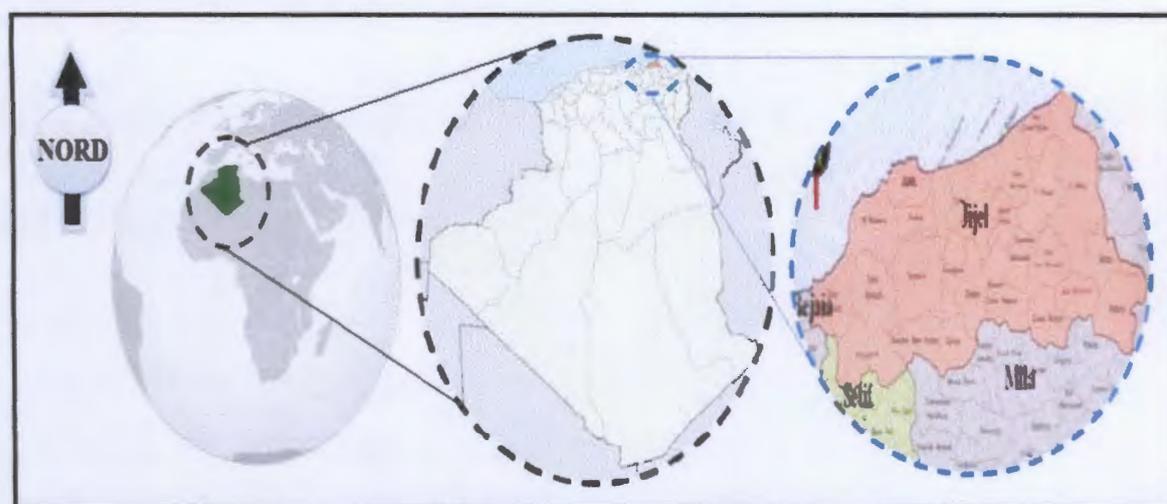


Figure 07: Carte de localisation et limites de la wilaya de Jijel

### IV.2. Matériel végétal

Les échantillons d'Eucalyptus et Romarin ont été récoltés durant le mois d'Avril 2016. Seule la partie aérienne (feuilles et tiges) ont été collectées en début de matinée afin que le matériel végétal soit le plus frais possible.

L'identification des plantes est basée sur l'aspect morphologique des feuilles (forme) et de la tige,...etc; en comparaison avec des ouvrages et des travaux; tels que (Hélène, 2013 ; Koziol, 2015 ; GAC, 1998).

#### IV.2.1. Préparation des extraits

##### IV.2.1.1. Séchage et Broyage

Le séchage de nos plantes se fait au niveau de laboratoire à l'air libre et à l'abri de la lumière et de l'humidité les échantillons sont étalés sur la paillasse du laboratoire pendant 7 jours pour l'Eucalyptus et 15 jours pour Romarin.

Les matières séchées ont été en suite broyées dans un broyeur électrique. Au préalable la plante entière a été concassée. Les échantillons ont été conservés jusqu'au moment de l'utilisation dans des bouteilles en verre à l'abri de la lumière. La poudre des deux échantillons est de couleur verte vive et d'odeur aromatique forte.

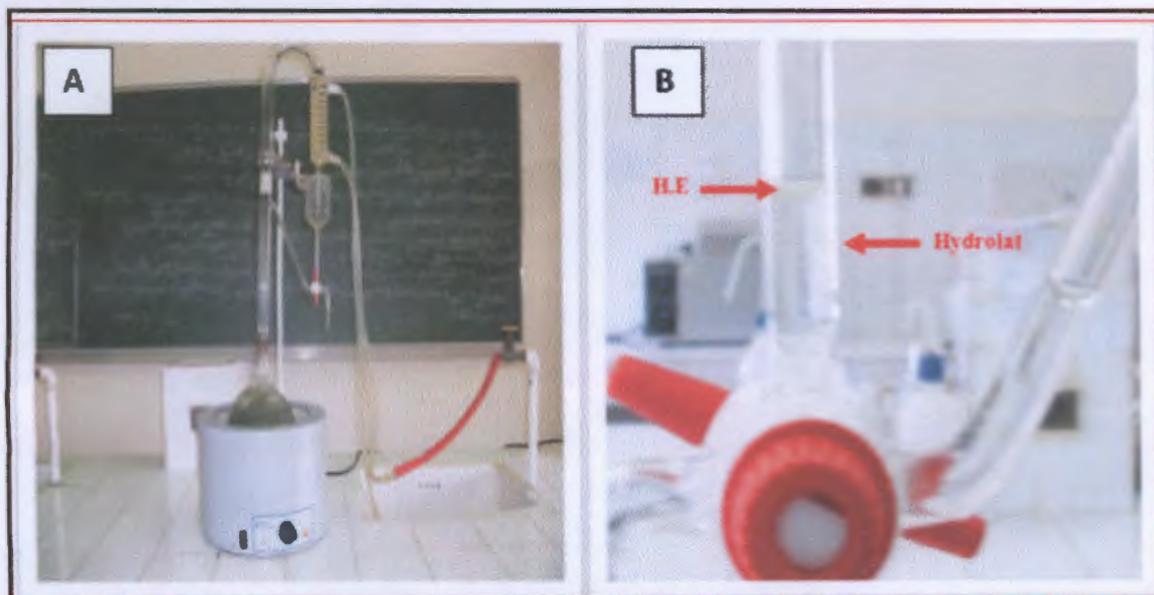
**Tableau 02 : Identification et transformation des échantillons des deux plantes étudiées**

Nom scientifique	Nom vernaculaire	Etat frais des échantillons	Etat sec	Lieu et date de récolte	Photos des plantes
<i>Eucalyptus radiata</i>	Eucalyptus			Direction de l'Algérienne Des Eaux Jijel le 8/4/2016	
<i>Rosmarinus officinalis</i>	Romarin			Campus université- Jijel le 20/4/2016	

#### IV.2.1.2. Processus d'extraction des huiles essentielles

L'extraction des huiles essentielles a été effectuée par l'hydro distillation à l'aide d'un appareil de type Clevenger (**photo A de la figure 08**) d'une capacité de 300g de matériel végétal sec, la durée de distillation est de 2 heures et 30 minutes.

Le milieu réactionnel constitué par la matière végétale et l'eau distillée, est porté à ébullition grâce à un chauffe-ballon. Une fois, l'ébullition s'effectue les cellules éclatent et commencent à dégager leurs contenu en huiles essentielles, qui par la suite transportée avec la vapeur d'eau jusqu'au réfrigérant, et après la condensation dans ce dernier, l'huile se rassemble dans une ampoule à décantation. L'eau et l'huile se séparent par différence de densité (**photo B de la figure 08**). L'huile séparée de l'eau est séchée par le sulfate de sodium ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ) et conservée à + 4°C dans des tubes en verre à l'abri de la lumière jusqu'à leur usage (Chanthaphon *et al.*, 2008 ; Ayoughi *et al.*, 2011).



**Figure 08 : Processus d'extraction des HE, A : dispositif (Clevenger), B : Extraction (H.E + Hydrolat) (Photos prises au niveau du laboratoire N°11 de la faculté SNV-jijel)**

#### IV.2.1.3. Détermination des rendements en huiles essentielles

Selon AFNOR, 2000, le rendement est défini comme étant le rapport entre la masse de l'huile essentielle obtenue et la masse du matériel végétal utilisé pour cent. Après récupération des huiles essentielles, le rendement est exprimé en pourcentage (%), il est calculé par la formule suivante :

$$R_{HE}\% = (m_h / m_v) \times 100$$

$R_{HE}$  = Rendement en huile essentielle en %.

$m_h$  = Masse d'huiles essentielles récupérées en gramme (g).

$m_v$  = Masse d'essai du matériel végétal en gramme (g) (Selvakumar et al., 2012).

### IV.3. Matériel fongique

#### IV.3.1. Prélèvements des échantillons

La collecte des échantillons de fraise pour l'isolement du champignon responsable de la pourriture grise (*Botrytis cinerea*), s'est faite à partir d'un champ d'une ferme située à El-Kennar à 20 km du Chef-lieu de wilaya. L'échantillonnage est réalisé selon la procédure classique du choix aléatoire des fruits atteints présentant des symptômes de pourriture grise (voir photo B de la figure 09).



**Figure 09** : A : champ de fraises à El-Kennar ; B : fruits de fraise attaqué par le Botrytis (photos prise le 16 /05/2016).

### IV.3.2. Isolement des champignons phytopathogènes des fraises

#### IV.3.2.1. Isolement sur le milieu PDA (Potato Dextrose Agar)

##### IV.3.2.1.1. Préparations des précultures

###### ➤ Méthode de Préparation du milieu PDA

Pour préparer un litre de milieu de culture PDA, on a besoin de 200 g de pomme de terre, 20 g d'Agar-agar, 20 g de Glucose et 1000 ml d'eau distillée. Les tubercules de la pomme de terre ont été lavés à l'aide de l'eau de robinet, épluchés et coupés en tranches fines, puis bouillis sur une plaque chauffante dans 500 ml d'eau distillée pendant 30 mn jusqu'à avoir une purée. Après filtration de cette purée on obtient un jus, et le mettre dans un bécher de 1000 ml, après on ajoute 20 g de glycose et 20 g d'Agar. Ensuite, le volume a été ajusté à un litre avec de l'eau distillée et agité bien pour obtenir une solution homogène de pH varie entre (5,5 et 6). En fin le milieu a été stérilisé dans l'autoclave (à 120°C, 1 atmospher) pendant 20 min.

##### IV.3.2.1.2. Isolement des microorganismes

Après 2 jours au laboratoire les échantillons de fruits attequés par le Botrytis sont complètement envahit par la moisissure en question et d'autres espèces de moisissures (Figure 10).

Dans une première étape nous avons procédé à un isolement des conidies et fragments mycélien à partir de la surface des fruits infectées en utilisant la technique du ruban adhésif stéril, et l'ensemencement en strie par l'anse de platine, plusieurs boites de Pétri sont ainsi ensemencées. Après 7 jours d'incubation, on a obtenu plusieurs colonies de champignons présentant des différences sur le plan aspects morphologiques, texture et couleurs, ce qui

nous révèle la présence d'un mélange de plusieurs moisissures ; parmi lesquelles il y'a le *Botrytis*.



**Figure10** : Photo des fruits de fraise envahit par le *Botrytis*

#### **IV.3.2.1.3. Purification des isolats fongiques**

Les isolats obtenus sont purifiés par un repiquage successif, qui consiste à transférer aseptiquement le *Botrytis* sur un milieu stérile pour l'isoler ou le maintenir en culture pure. Cette technique consiste à faire un prélèvement avec une anse stérile de quelques spores ou un fragment mycélien de la colonie du champignon et le transférer dans un milieu neuf (**Botton et al., 1990**).

#### **IV.3.2.1.4. Identification des isolats fongiques**

L'identification est réalisée dans le but de classer les espèces fongiques par genres et espèces. Donc elle fait appel à des critères d'identification des moisissures, qu'ils sont basés sur deux aspects :

##### **A : Aspects macroscopiques**

L'analyse des boîtes s'effectue à l'œil nu, se basant sur des caractères morphologiques des colonies on note:

- La vitesse de croissance : en mesurant le diamètre de la colonie.
- La texture de colonie : velouté, laineux, poudreux, etc.
- La couleur : du recto et du verso de la boîte de pétrie.
- La pigmentation : présence ou l'absence d'un pigment diffusible dans le milieu.
- La forme de colonie : régulier, irrégulier, dentelé, filamenteux, etc.

- L'exsudat : présence ou absence des gouttelettes.

### **B : Aspects microscopiques**

L'examen microscopique est basé sur des caractères plus loin de l'aspect morphologique, on mentionne les organes de reproduction, aspect du thalle (cloisonné ou non cloisonné), types de spores, disposition des spores,...etc. La préparation du matériel fongique pour l'observation microscopique est réalisée dans des conditions stériles comme suit :

- Prendre un fragment du thalle de la colonie à l'aide d'une anse de platine stérile, puis on le dispose dans une goutte de bleu de coton sur une lame stérile.
- Dilacérer le fragment mycélien avec l'anse de platine pour le rendre moins dense et mieux observable les différents détails.
- Recouvrir la préparation à l'aide d'une lamelle, puis la mise à l'observation sous le microscope optique.

Les espèces isolées ont été identifiées en se basant sur une bibliographie spécialisées à l'identification des moisissures qui établit des clés de détermination complètes à partir des caractères cultureux macro et microscopiques (Botton et al., 1990).

### **IV.4. Tests antifongiques**

Les méthodes du laboratoire qui permettent d'estimer les propriétés d'un produit *in vitro* sont nombreuses, mais reposent toutes sur le même principe, celui de confronter la substance antimicrobienne (fongicide, bactéricide, insecticide...) et l'agent pathogène (champignons, bactéries, insectes...) sur un support artificiel. Le Botrytis est l'espèce fongique choisie sur la base de ses implications fréquentes dans la pourriture grise des fraises.

#### **IV.4.1. Principe de la méthode de contact direct**

La difficulté rencontrée pour l'utilisation des H.E. dans des milieux de culture à base d'eau, c'est leur faible solubilité. Selon la littérature plusieurs substances ont été utilisées pour cette fin: éthanol (Beuchat, 1976 ; Marino et al., 2001) ; méthanol (Onawunmi, 1989), acétone en combinaison avec Tween-80 (Prudent et al., 1995), Tween-20 (Kim et al., 1995 ; Hammer et al., 1999 ; Mann et Markham, 1998), DMSO (Firouzi et al., 1998) ; propylène-glycol (Negi et al. 1999), n-hexane (Senatore et al., 2000), le polyéthylène glycol (Pintore et al., 2002), Tween-80 (Bassole et al., 2003), et l'agar (Mann et Markham, 1998 ; Delaquis et al., 2002 ; Gill et al., 2002 ; Burt et Reinders, 2003) ( Hellal, 2011).

La méthodologie qu'on a suivi pour l'évaluation de l'effet antifongique (fongistatique ou fongicide) des huiles essentielles extraites de l'Eucalyptus et Romarin, est la méthode de contact direct (Fandohan, 2004). Cette méthode consiste à préparer quatre concentrations

pour chaque type d'huile. De la manière suivante : on prépare 4 flacons contenant chacun 100ml de PDA dans lesquels on ajoute successivement 750, 500, 250, et 50  $\mu$ l d'huiles essentielles et 0,5 ml Tween 20 (voir tableau 3). Après l'agitation des flacons pour homogénéisation et incorporation des huiles dans le milieu de culture, on verse l'homogénat dans des boîtes de Petrie de 8cm de diamètre.

Pour le témoin on a utilisé deux boîtes de Petri dans l'une on verse 15 ml du milieu PDA plus 0,5 ml de Tween 20 et dans l'autre boîte on ne verse que le milieu de culture PDA.

#### IV.4.1.1. Préparation de la gamme de dilutions

La détermination de la CMI est réalisée par la méthode de dilution en milieu gélosé. Des dilutions de demi en demi ont été effectuées dans une gamme de concentration de 750  $\mu$ l / ml à 50  $\mu$ l / ml de l'HE à tester (Tableau 03).

**Tableau 03:** Valeurs des dilutions utilisées pour déterminer les CMI

dilution (HE/H <sub>2</sub> O) %	0,75	0,50	0,25	0,05
$\mu$ l HE/ml	750	500	250	50

#### IV.4.1.2. Ensemencement et incubation des boîtes de Pétri

Le mélange de chaque milieu dans des boîtes de Pétri. A l'aide d'un embout stérile, nous découpons des disques d'environ 0,4cm de diamètre du tapis mycélien âgée de 7 jour, ces disques sont déposés au centre de la boîte de pétri. Nous opérons de la même façon pour chaque concentration d'huile essentielle, les boîtes de Pétri sont ensuite fermées hermétiquement par le para-film et incubées à 25°C, pendant 7 jours. Pour chaque concentration, cinq répétitions sont préparées de la même façon, afin de minimiser l'erreur expérimentale.

#### IV.4.1.3. Paramètres étudiés

##### IV.4.1.3.1. Evaluation de la croissance mycélienne

Dans cette étude, on a tenté de comparer l'influence des deux huiles essentielles produites par deux plantes de familles botaniques différentes (Myrtaceae et Lamiaceae), sur la croissance mycélienne. L'estimation de la croissance mycélienne est basée sur la mesure du diamètre de la colonie du champignon.

Cette lecture est toujours réalisée en comparaison avec celles des témoins. Toute pousse même légères de chaque champignon sera considérée comme action négative c'est-à-

dire que l'huile essentielle en question n'est pas inhibitrice vis-à-vis de la croissance fongique.

#### IV.4.1.3.2. Taux d'inhibition (TI%)

Pour cette méthode, la technique consiste à mesurer les diamètres des différentes colonies de champignons après le temps d'incubation requis (7jours), puis résoudre l'équation (Kordali et *al.*, 2003).

$$TI (\%) = 100 \times (dC - dE) / dC$$

TI(%) = Taux d'inhibition exprimé en pourcentage

dC = Diamètre de colonies dans les boîtes « témoins positifs » – ddi (mm).

dE = Diamètre de colonies dans les boîtes contenant l'extrait de plante – ddi (mm).

ddi = Diamètre de disc initiale (04 mm).

L'huile essentielle est dite :

- Très active lorsqu'elle possède une inhibition comprise entre 75 et 100 % ; l'espèce fongique est dite très sensible ;
- Active lorsqu'elle possède une inhibition comprise entre 50 et 75 % ; l'espèce fongique est dite sensible ;
- Moyennement active lorsqu'elle possède une inhibition comprise entre 25 et 50% ; l'espèce fongique est dite limitée;
- Peu ou pas active lorsqu'elle possède une inhibition comprise entre 0 et 25% ; l'espèce fongique est dite peu sensible ou résistante (Kordali et *al.*, 2003).

#### IV.4.1.3.3. Détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI)

La CMI correspond à la plus faible concentration en huiles essentielles pour laquelle on n'observe pas de pousse visible à l'œil nu sur le milieu solide (Ouraïni et *al.*, 2005). Elle mesure donc un effet fongistatique et ne renseigne pas sur l'état de la population du champignon, ne permettant notamment pas de préciser si elle a été tuée en partie ou totalement ou si elle a seulement cessé se multiplier (Bérézin et Brograd, 1999). Les boites de Pétri dont les concentrations ayant montré une absence totale de la croissance mycélienne; ont été sélectionnées pour déterminer les concentrations minimales inhibitrices (CMI) (Debillerbeck et *al.*, 2002; Bassole et *al.*, 2001).

Selon (Cahagnier et Molard, 1998) la vitesse de la croissance mycélienne de chaque concentration est déterminée par la formule :

$$VC = [D1/Te1] + [(D2-D1)/Te2] + [(D3-D2)/Te3] + \dots + [(Dn-Dn-1)/Ten]$$

**D** = Diamètre de la zone de croissance du chaque jour (mm).

**Te** = Temps d'incubation (Heure).

#### IV.5. Technique d'Aromatogramme pour la détermination de l'activité antifongique des H.E

L'aromatogramme est basée sur une technique utilisée en microbiologie, appelée antibiogramme ou méthode par diffusion en milieu gélosé ou encore méthode des disques. Cette méthode a l'avantage d'être d'une grande souplesse dans le choix des H.E testées. Il s'agit d'une méthode en milieu gélosé à l'agar et réalisée dans une boîte de Pétri. L'activité antifongique de l'huile testée est basée sur le diamètre de la zone d'inhibition qui constitue le halo (voir figure 11).

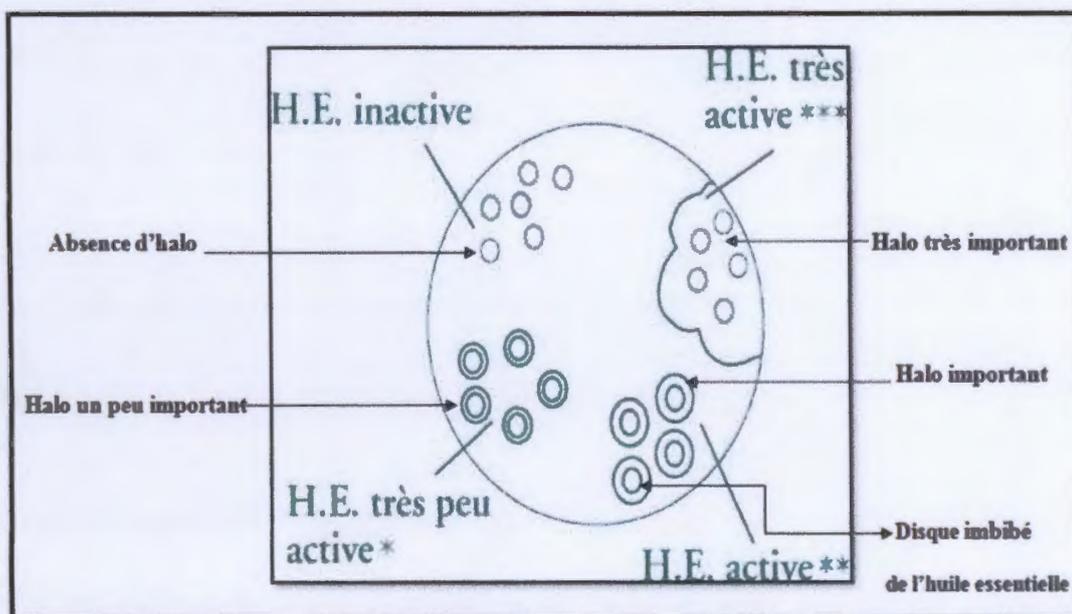


Figure 11: Schéma d'un aromatochrome résumant les différentes formes de résultats (Site web 03)

##### IV.5.1. Préparation de différentes dilutions des huiles essentielles

Les huiles essentielles ont été diluées dans une quantité de méthanol, en vue d'obtenir des dilutions d'un mélange homogène. Les tubes en verre étiquetés correspondant à la dilution souhaitée (75%, 50%, 25 %).

##### IV.5.2. Expression des résultats

L'activité antifongique a été déterminée en mesurant à l'aide d'un pied à coulisse la zone d'inhibition ou le halo d'inhibition qui constitue une zone claire.

### IV.5.3. Lecture des résultats

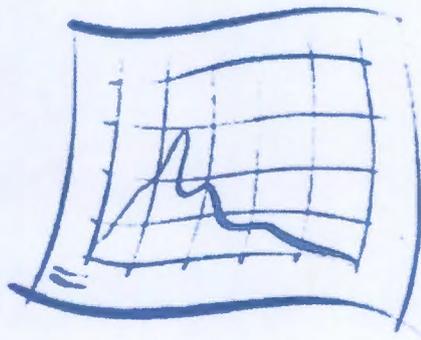
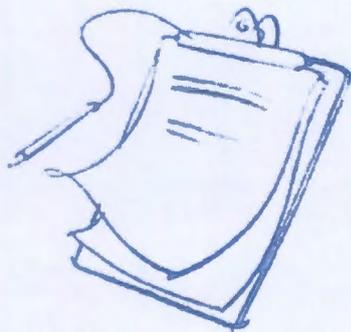
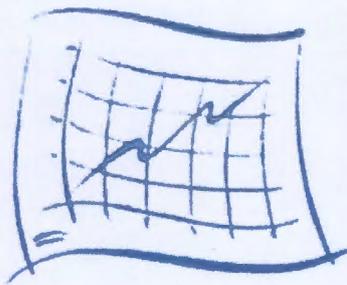
L'activité antifongique se manifeste par l'apparition d'un halo d'inhibitions de la croissance mycélienne autour des disques en papier contenant l'extrait de l'huile à tester.

Le résultat de cette activité est exprimé par le diamètre de la zone d'inhibitions et peut être symbolisés par des croix (Ponce *et al.*, 2003).

- Si le diamètre de la zone claire ou de l'halo d'inhibition mesure de 2 à 3 millimètre, l'HE possède une bonne action sur le champignon testé, on lui attribue deux croix (++) .
- Si le diamètre de la zone claire mesure plus de 3 millimètre, l'efficacité d'huile essentielle est excellente elle sera dotée de trois croix (+++), pour son spectre antifongique.
- 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.

# *Chapitre V :*

## *Résultats et discussion*



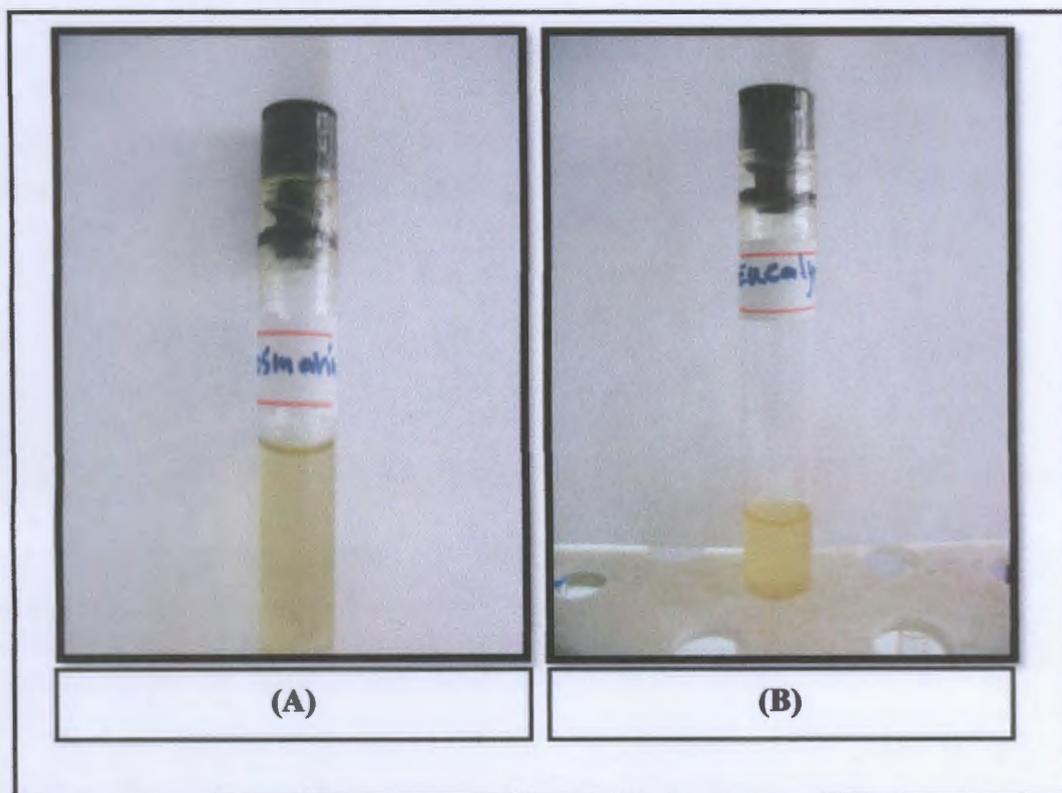
## V.1. Résultats

### V.1.1. Examen organoleptique

Les caractères organoleptiques des deux huiles essentielles obtenues par l'hydrodistillation sont présentés dans le tableau 04.

**Tableau 04** : Propriétés organoleptiques des huiles essentielles

Origine d'HE	Caractères organoleptiques		
	Couleur	Odeur	Aspect
<i>Eucalyptus radiata</i>	Jaune pâle	Forte odeur rappelant l'odeur des feuilles et fruits (agréable)	Liquide limpide
<i>Rosmarinus officinalis</i>	Jaune foncé	Forte odeur rappelant l'odeur des feuilles et tiges (agréable)	Liquide limpide



**Figure 12** : (A) Huile essentielle de romarin et (B) eucalyptus obtenue par hydrodistillation  
(Photos prises au niveau du laboratoire N°11 de la faculté SNV-jijel)

### V.1.2. Rendements d'extraction

Tableau 05 : Rendement en huile essentielle pour les deux plantes étudiées (Rapport eau /matière végétale des extractions)

Espèce botanique	Quantité de la biomasse (en g)	Quantité d'huile essentielle (en g)	Rendement (%)
<i>Eucalyptus radiata</i>	500g	14,8g	2,96%
<i>Rosmarinus officinalis</i>	500g	8,10g	1,62%

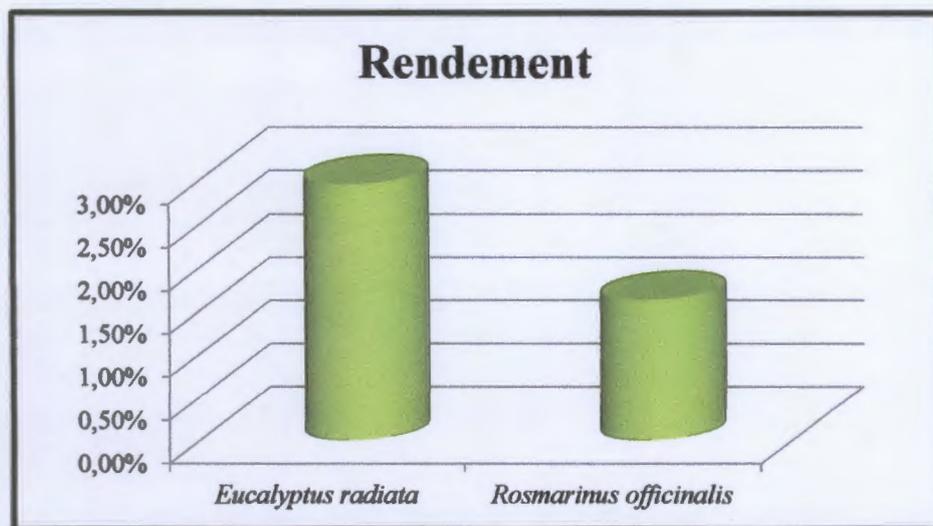


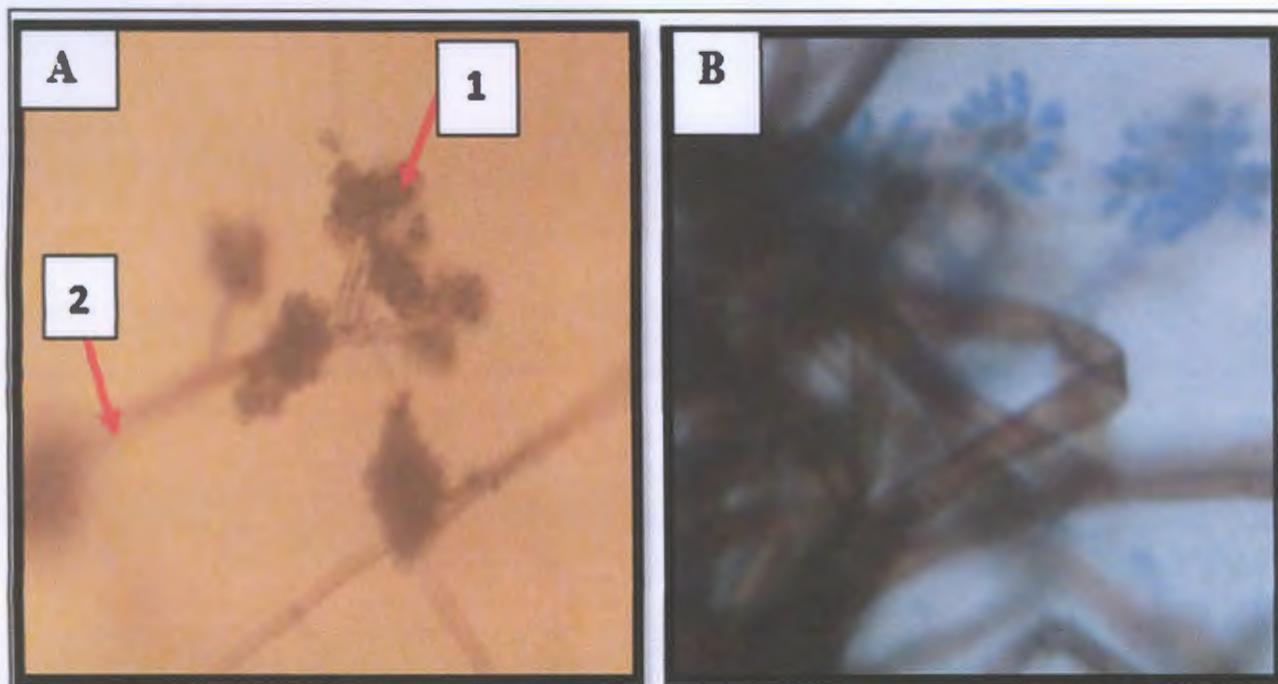
Figure 13 : les rendements en huile essentielle des deux espèces étudiée.

### V.1.3. Identification de *Botrytis cinerea*

L'observation macroscopique et microscopique nous a permis d'établir les caractéristiques de la structure morphologique indiquées dans le tableau 06 et figure 14.

Tableau 06: Descriptions des caractères macroscopiques et microscopiques de *B. cinerea*.

Champignon	Aspect macroscopique		Aspect microscopique	
	Couleur	Texture	Mycélium	Conidies et spores
<i>Botrytis cinerea</i>	Grise	Cotonneuse	Cloisonné	Lisse



**Figure 14 :** Observation microscopique de *Botrytis cinerea* sous microscope (A) : fructification du champignon (1) Conidies, (2) conidiophore ; (B) : mycélium du champignon

#### V.1.4. Résultats des tests antifongiques

L'activité antifongique est révélée par l'absence ou la présence de la croissance mycélienne.

##### V.1.4.1. Méthode de contact direct

###### V.1.4.1.1. Evaluation de la croissance mycélienne

Dans un premier temps on remarque que la croissance mycélienne du témoin est très normale, par contre pour les autres boîtes traitées par les différentes concentrations d'H.E des deux espèces de plantes (**Eucalyptus** et **Romarin**), l'évolution de ce paramètre est variable en fonction de l'origine du H.E, de sa concentration et de la durée d'incubation.

Les diamètres de la croissance mycélienne en mm (y compris le diamètre de disque qui est 4mm). Les résultats obtenus pour les deux types d'H.E sont résumés dans les figures suivantes (Figure 15 et 16) après 7 jours d'incubation.

A- Résultats des observations de la croissance mycélienne sur boîtes

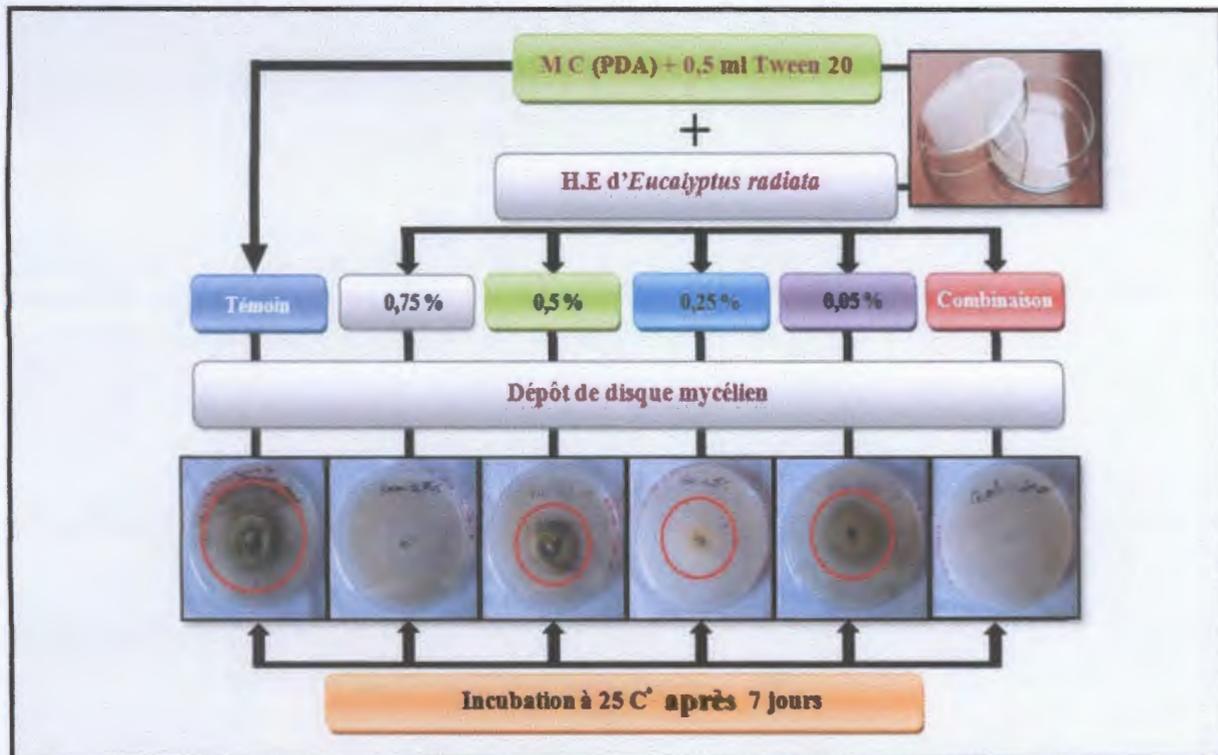


Figure 15 : Schéma présentant les résultats obtenus après l'application des différentes concentrations de l'H.E. d'Eucalyptus sur le *B.cinérea* par la méthode de contact direct.

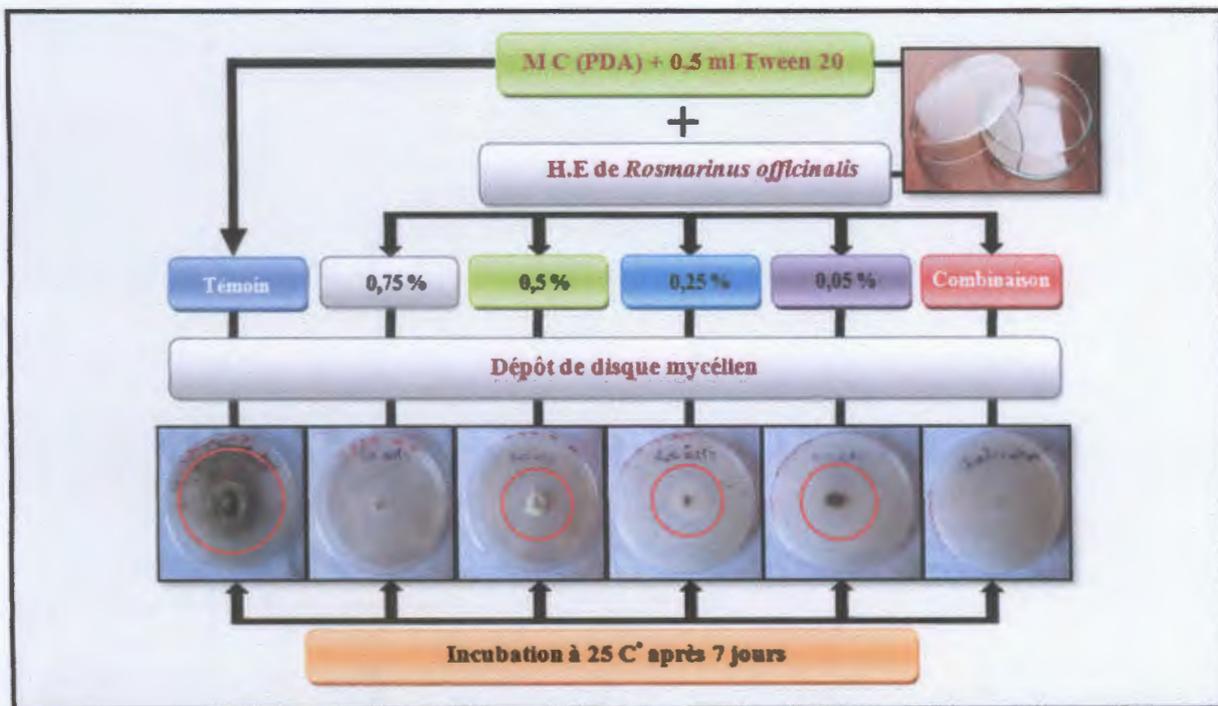


Figure 16 : Schéma présentant les résultats obtenus après l'application des différentes concentrations de l'H.E. de Romarin sur le *B.cinérea* par la méthode de contact direct.

## B- Résultat de lecture

### • Témoin

Tableau 07: Evaluation de la croissance mycélienne pendant 7 jours.

Jours	Témoin (PDA+Tween)						
	1 <sup>er</sup> jour	2 <sup>eme</sup> jour	3 <sup>eme</sup> jour	4 <sup>eme</sup> jour	5 <sup>eme</sup> jour	6 <sup>eme</sup> jour	7 <sup>eme</sup> jour
Témoin Croissance mycélienne (mm)	8	18	31	43	56	61	69

En premier temps, la croissance mycélienne du témoin était normale, elle évolue progressivement jusqu'à atteindre 69 mm.

### • Dilution 0,75%

Pour cette concentration (0,75%) on remarque une inhibition totale de la croissance mycélienne de *B. cinérea* et ce -ci pour les deux H.E. (voir Annexe n°2).

### • Dilution 0,50%

Pour cette concentration la variation de la croissance mycélienne n'est pas la même pour les deux types d'H.E, les résultats de lecture sont présentés dans le tableau de l'annexe ... et par les histogrammes de la figure suivant :

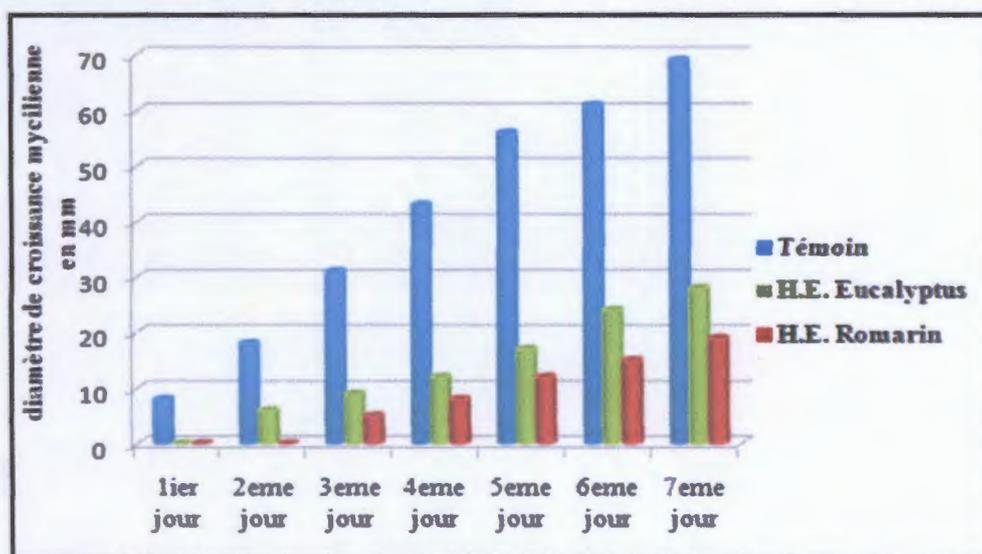


Figure 17: L'effet de la dilution 0,50% des huiles essentielles sur le *Botrytis cinérea*

La croissance mycélienne de *B. cinérea* en présence de H.E. d'Eucalyptus a débuté à partir du deuxième jour progressivement jusqu'à atteint 28 mm de diamètre, par ailleurs en présence

de H.E. de Romarin, la croissance a débuté après 48h d'incubation, pour atteindre à la fin 19 mm ce qui exprime une grande différence avec le témoin (69 mm).

• Dilution 0,25 %

La croissance mycélienne de *B. cinérea* pour cette dilution en présence de H.E. d'Eucalyptus a débuté à partir du premier jour progressivement jusqu'à atteindre 30 mm de diamètre, par ailleurs en présence de H.E. du Romarin, la croissance a commencé après 48h d'incubation, pour atteindre 25mm au 7em jour.

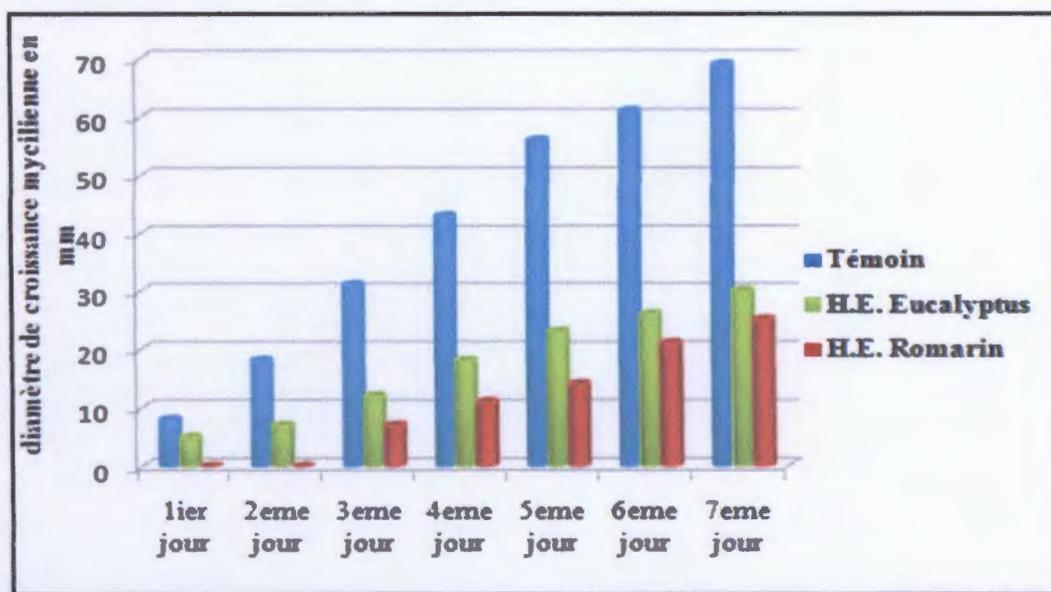


Figure 18 : L'effet de la dilution 0,25% des huiles essentielles sur le *Botrytis cinérea*

• Dilution 0,05 %

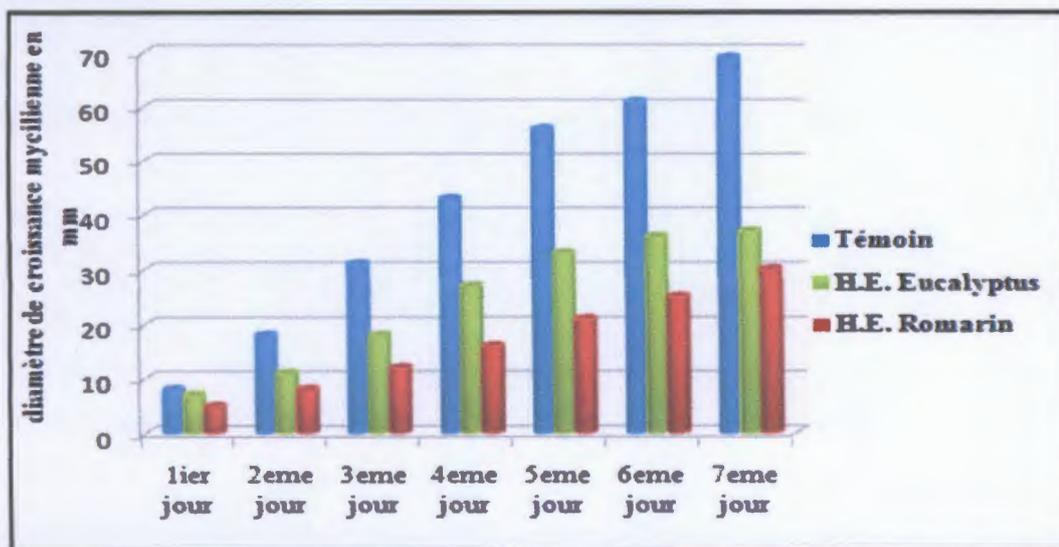


Figure 19: L'effet des huiles essentielles sur le *Botrytis cinérea* (dilution 0,05%).

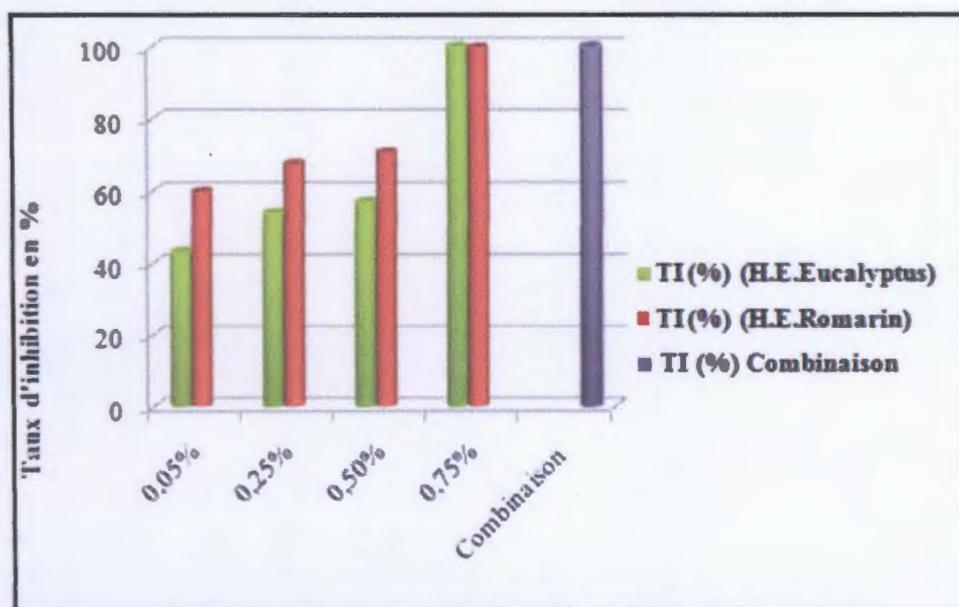
La croissance mycélienne de *B.cinérea* en présence de H.E. d'Eucalyptus débute progressivement à partir du premier jour jusqu'à atteindre 37 mm de diamètre au 7<sup>ème</sup> jour. Cependant on remarque que pour l'H.E. du Romarin la seule dilution qui permis à la croissance de commencer dès le premier jour pour atteindre un diamètre de 30 mm au 7<sup>ème</sup> jour.

- **Effet combiné des deux H.E.**

Les résultats de lecture de ce test sont enregistrés dans le tableau de l'annexe l'Annexe n°2, ces résultats nous révèlent une inhibition totale de la croissance mycélienne de l'espèce fongique testée.

#### V.1.4.1.2. Taux d'inhibition (TI%)

Les taux d'inhibition des deux huiles essentielles sont consignés dans la figure ci-dessous :



**Figure 20** : Le taux d'inhibition des H.E. des deux plantes étudiées.

On remarque qu'il y'a toujours une inhibition de la croissance quelle que soit la dilution pour les deux types d'huiles.

#### V.1.4.1.3. Détermination des concentrations inhibitrices (CMI)

A partir des résultats enregistrés dans la figure ci-dessus (n°20), on trouve que la concentration minimale inhibitrice d'Eucalyptus et du Romarin est 0,75% pour le *B.cinérea*, il s'agit de la concentration qui inhibe totalement la croissance du champignon.

#### V.1.4.1.4. Détermination de la vitesse de croissance mycélienne (VC)

Les résultats de la figure 21 montrent que la vitesse de la croissance mycélienne est inversement proportionnelle à la concentration des deux huiles.

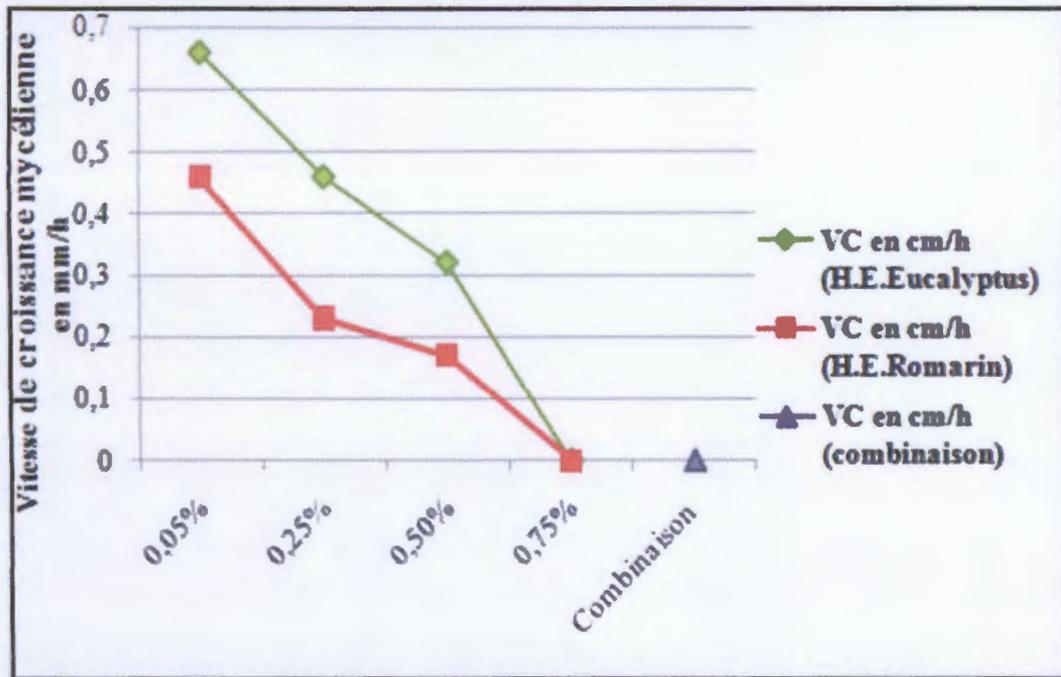


Figure 21 : La vitesse de croissance mycélienne de *B. cinérea* en présence des H.E. des deux plantes étudiées.

La plus grande vitesse de croissance mycélienne (1,03 mm/h), est enregistré en absence d'huiles essentielles, cette vitesse décroît jusqu'à 0 cm/h à la concentration (0,75%) des deux H.E. et à l'Etat combiné.

#### V.1.4.1.2. Méthode de l'aromatogramme ✓

La méthode d'aromatogramme est la technique la plus répandue de l'évaluation de l'activité antifongique des huiles essentielles.

##### A- Résultats des observations des halos d'inhibition sur boîtes

Nous avons procédé au test du méthanol pur afin d'écartier son éventuelle activité antifongique, les résultats sont négatifs, pour les autres dilutions méthanoliques et la combinaison des deux huiles, on enregistre la formation d'un halo d'inhibition dont le diamètre varie en fonction du pouvoir antifongique de chaque concentration. Les résultats sont illustrés par les photos de la figure 22.

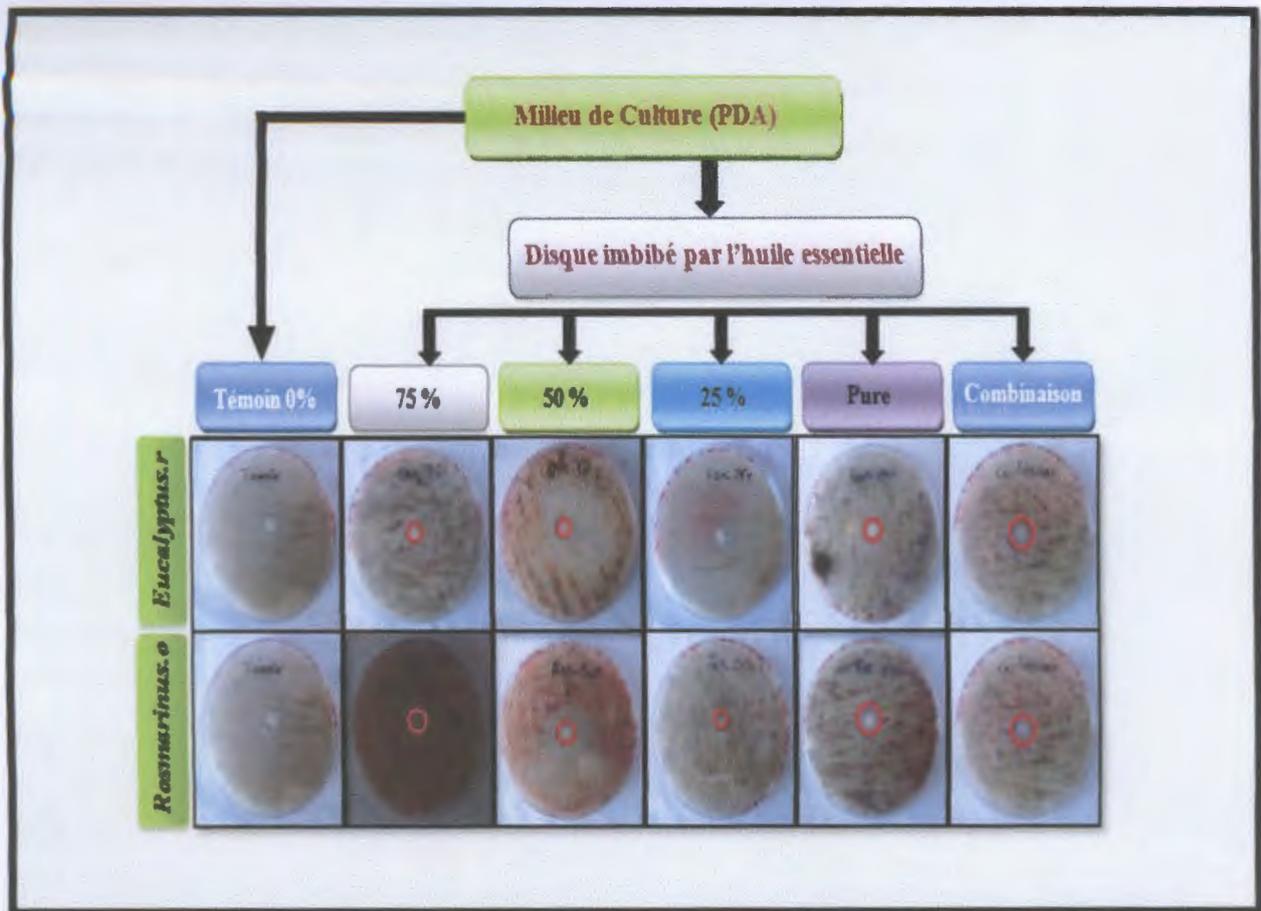


Figure 22 : Schéma représentant l'effet des huiles essentielles de Romarin et Eucalyptus sur le *Botrytis cinerea* (Aromatogramme) incubation à 25°C.

### B- Résultat de lecture

La méthode de l'aromatogramme repose sur la diffusion en gélose à partir des disques imprégnés d'H.E., après 7 jours d'incubation il se produit un gradient de concentration de l'H.E. autour de chaque disque ce qui permet la formation d'un halo, la mesure des diamètres de ces halos sont enregistrés dans le tableau 08.

Tableau 08 : Les diamètres des zones d'inhibitions dans les différentes boîtes testées

Espèce fongique	Huile essentielle	Pure	Combinaison (H.E. Eucalyptus + H.E. Romarin)	Dilutions			Méthanol
				75%	50%	25%	
<i>Botrytis cinerea</i>	<i>Eucalyptus radiata</i>	4	8	3	2	-	-
	<i>Rosmarinus officinalis</i>	7	8	5	4	2	-

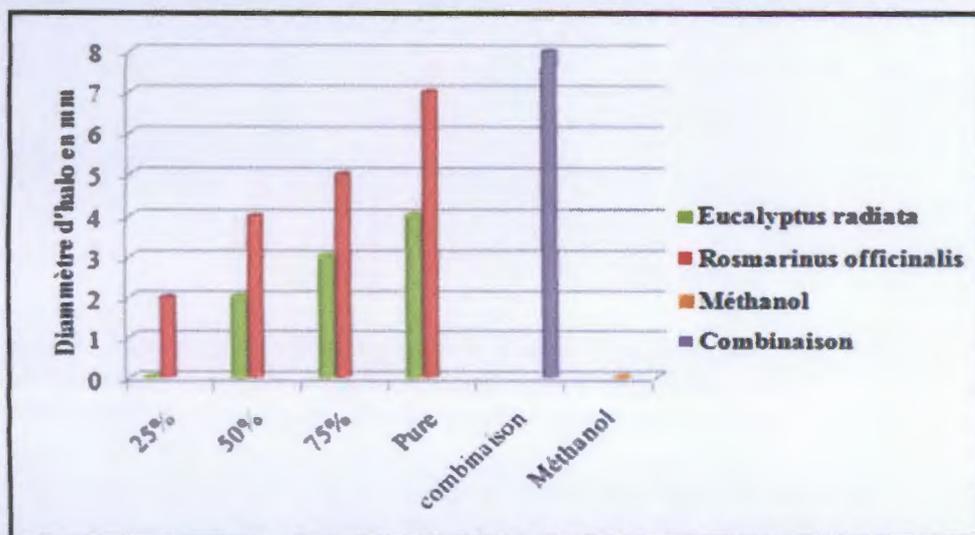


Figure 23 : Les résultats de l'activité antifongique (Méthode d'Aromatogramme).

## V.2. Discussion

Traditionnellement, l'identification des moisissures repose sur l'observation de critères morphologiques (aspect macroscopique du mycélium et observation microscopique des structures reproductrices) (Pitt et Hocking, 1999). Parmi les critères macroscopiques, on prend en compte la couleur, la texture et la taille de la colonie sur différents milieux de culture. Les colonies peuvent être duveteuses, laineuses, cotonneuses, poudreuses ou granuleuses. Tenant compte de toutes ces critères et après étalement entre lame et lamelle l'observation microscopique nous a permis d'identifier et isolé le *B. cinérea* à partir de fruits de fraise ensuite on a procédé aux différents tests aux huiles essentielles qui sont préalablement préparés.

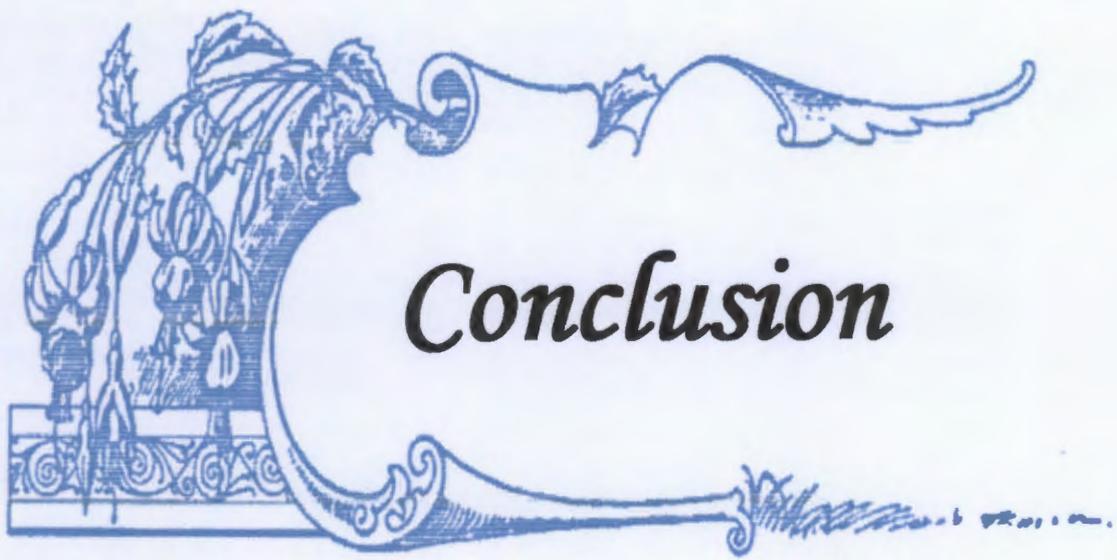
Pour la question de rendements en H.E. les deux plantes n'ont le même rendement soit, 1,62% pour le Romarin d'ailleurs ce rendement est proche à celui cité par El-Bastawesy et al.,2009 (1,79%), il est supérieure à celui cité par les auteurs : karimi et al. 2005 (1,5%); Hilan et al.,2006 (1,52%); Biljana et al., 2007 (1,18%) et Atik Bekkara et al., 2007 (0,8%). Il faut signaler que la variabilité du rendement est probablement liée à la variation des facteurs suivants : le stade de croissance, les conditions pédoclimatique, la période du récolte, le temps du récolte, séchage... Pour l'Eucalyptus le rendement est de 2,96%. D'un autre coté les caractéristiques organoleptiques les deux H.E. présentent sont conformes aux caractéristiques répertoriés dans les normes AFNOR, 1992.

Concernant le pouvoir antifongique, les résultats par contact direct et ceux de l'Aromatogramme montrent que l'huile essentielle de Romarin est plus active que celle d'Eucalyptus. Le mélange des deux huiles donne un effet plus important, on déduit qu'il y'a un effet synergique et manque d'antagonisme entre les deux huiles.

En revanche pour la croissance mycélienne et à la dilution 0,50% : on remarque qu'elle débute après 48h pour le Romarin et après 24h pour l'Eucalyptus et à 0,25% : on remarque une inhibition totale de la croissance mycélienne pour le Romarin pendant les premières 24h ; par contre pour l'HE d'Eucalyptus la croissance débute dès les premières heures ; ce déphasage dans le temps de démarrage de la croissance mycélienne est due au fort pouvoir inhibiteur de l'huile en question et de la phase de latence du champignon exposé à l'huile.

La vitesse de croissance mycélienne enregistrée pendant les 7 jours d'expérimentation ; est maximale pour le témoin (1,03 mm/h) et décroissante avec l'utilisation des différentes concentrations d'H.E, donc elle diminue avec l'augmentation des dilutions jusqu'à l'inhibition totale à 0,75 % où elle devient nulle et qui représente la CMI de l'huile testée, et à la combinaison des deux H.E. Sur la base de tout ce qui a été exposé et les méthodes utilisées on peut faire un classement de nos H.E. comme suit :

- ❖ A partir de la méthode du contact direct : on peut classer le pouvoir antifongique des huiles testées en trois catégories de doses :
  - **Dose très active représentée par :** La combinaison des deux H.E. à l'état pure et la dilution 0,75% de chaque huile : elle possède une inhibition totale, et dans cette situation l'espèce fongique est dite **très sensible**.
  - **Dose active représentée par :** les dilutions 0,50% , 0,25% et 0,05% pour le **Romarin** et **Eucalyptus** : on a un taux d'inhibition, compris dans l'intervalle 50 - 75 % , donc l'espèce fongique est dite **sensible**.
  - **Dose moyennement active :** la dilution 0,05% **ce taux est compris** entre 25 et 50% donc l'espèce fongique est dite **limitée**.
- ❖ A partir de la méthode de l'aromatogramme: on peut classer le pouvoir antifongique des huiles testées en plusieurs catégories :
  - **Pour les différentes concentrations d'H.E d'*E. radiata***
    - **Excellent pouvoir d'inhibition (+++)** : Le halo est de 4mm en présence le H.E pure
    - **Bon pouvoir d'inhibition (++)**: En présence des deux concentrations (75% et 50%) le halo est respectivement de (3 et 2 mm) .
    - **Aucun pouvoir antifongique** : pour la dilution 25%, car il y'a un manque de l' halo d'inhibition (aucune activité antifongique à cette dilution).
  - **Pour les différentes concentrations d'H.E de *R. officinalis***
    - **Excellent pouvoir d'inhibition (+++)** : en présence de la combinaison des deux H.E ; le H.E pure ; et les dilutions 75% et 50%, où on a relevé le diamètre du halo d'inhibition est respectivement de 8, 7, 5 et 4 mm.
    - **Bon pouvoir d'inhibition** : pour la dilution 25%, le halo d'inhibition est de 2mm.



*Conclusion*

## Conclusion

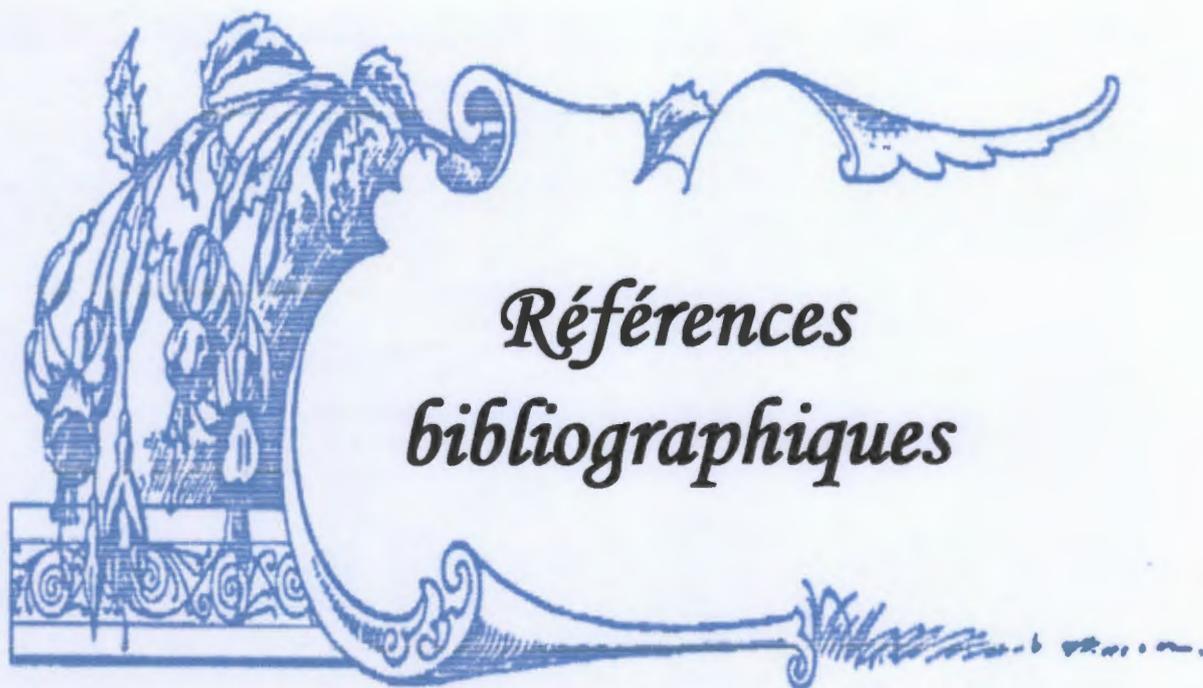
L'activité antimicrobienne des H.E. a fait l'objet d'un grand nombre de travaux de recherche à l'échelle internationale (Ouraïni et al., 2005 a et b; Giordani et Kaloustian, 2006; Warnke et al., 2007 ; Kaloustian et al., 2008 ; Amarti et al., 2009 ; Bssaibis et al., 2009). Dont plusieurs ont spécifiquement noté la forte activité des H.E. sur les champignons filamenteux, en comparaison de celle qu'exercent vis-à-vis les bactéries et les levures (Inouye et ABE, 2007). Ces résultats ont été confirmés dans le présent travail ; une bonne activité des H.E. est témoignée contre la moisissure responsable de la pourriture grise des fraises (*Botrytis cinerea*).

Le travail est mené au niveau des laboratoires de biologie de la faculté des sciences de l'université de Jijel ensuite au laboratoire de mycologie de l'SRPV a porté sur l'évaluation de l'activité antifongique des huiles essentielles extraites de deux plantes aromatiques l'*Eucalyptus radiata* et le *Rosmarinus officinalis* par l'hydro distillation à l'aide d'un appareil de type Clevenger. Le test effectué contre le *B. cinerea* de fraisier, qui a montré une résistance grandissante aux principaux produits chimiques commercialisés.

Les méthodes adoptées dans notre travail sont la méthode de contact direct et la méthode d'Aromatogramme elles reposent sur le même principe ; celui de confronter la substance (huile essentielle) et l'agent pathogène (champignons) sur un support artificiel (le milieu PDA) ensuite on détermine la sensibilité du champignon en se basant sur le diamètre de l'halo d'inhibition et la croissance mycélienne.

Les résultats enregistrés pour l'extraction des huiles montrent que le plus fort rendement est celui de l'Eucalyptus par rapport au Romarin, par contre l'activité antifongique est de loin plus importante pour l'H.E du Romarin que l'Eucalyptus, avec une CMI de 0,75 % pour les deux huiles. la combinaison des H.E donne encore une grande activité.

En fin et en perspective et en se basant sur les résultats fort encourageants de notre travail, il serait important d'intensifier les tests antifongiques et d'approfondir les connaissances concernant les phénomènes de résistance des champignons vis-à-vis des produits chimiques, afin de proposer des biofongicides à base d'huiles essentielles chémotypées comme alternatif et ce ci pour protéger les cultures et les consommateurs.



*Références  
bibliographiques*

## Références bibliographiques

### A

**Ajouz S., 2009.** Estimation du potentiel de resistance de *Botrytis cinerea* a des biofongicides. Sciences agricoles. Universite d'Avignon, Française, P : 213.

**AFNOR. 1992.** Recueil des normes françaises ; huiles essentielles.

**AFNOR. 2000.** Huiles essentielles. Echantillonnage et méthodes d'analyse monographies relatives aux huiles essentielles Tome 2. 6<sup>ième</sup> édition. Paris.

**AFSSAPS. 2008.** Agence française de sécurité sanitaire des produits de santé. Recommandations relatives aux critères de qualité des huiles essentielles. Contribution pour l'évaluation de la sécurité des produits cosmétiques contenant des huiles essentielles. France. P :18.

**Agrios G.N., 2005.** Plant pathology. Elsevier Academic Press, Oxford, UK. p: 922.

**Amarti F., Satrani B., Ghanmi M., Farah A., Aafi A., Aarab L., El Ajjouri M et Chaouch A., 2009.** Composition chimique et activité antimicrobienne des huiles essentielles de *Thymus algeriensis* Boiss. & Reut. Et *Thymus ciliatus* (Desf.) Benth. du Maroc. Biotechnologie, Agronomie, Société et Environnement. 14 : 141-148.

**Atik bekkara F., Bousmaha L., Taleb bendiab S.A., Boti J.B., et Casanova J., 2007.** Composition chimique de l'huile essentielle de *Rosmarinus officinalis* L poussant à l'état spontané et cultivé de la région de Tlemcen. Biologie & Santé. 7: 6-11.

**Ayoughi F., Barzegar M., Sahari M.A., et Naghdibadi M., 2011.** Chemical compositions of essential oils of *Artemisia dracunculus* L. and *Matricaria chamomile* and evaluation of their antioxidative effect. Journal of Agricultural Science and Technology.13: 79-88.

### B

**Bakkali F., Averbeck S., Averbeck D., et Idaomar M., 2008.** Biological effects oils. A review Science Directe. Food and Chemical Toxicology. Vol 46 : 446-475.

**Bassole I. H. N., Ouattara A. S., Nebie R., Ouattara C. A. T., Kabore Z., Traore S.A. 2001.** Composition chimique et activités antibactériennes des huiles essentielles des feuilles et

des fleurs de *cymbopogon proximus* (stapf.) et *d'ocimum canum* (sims). Pharm. Méd. Trad. AF, Vol.II, pp :37-51.

**Belkou H., Beyoud F., et Taleb A., 2005.** Approche de la composition biochimique de la menthe vert (*Mentha spicata* L) dans la région de ouargla, mémoire DES, univ ouargla. P : 2-61.

**Bellakhdar J., 1997.** La pharmacopée marocaine traditionnelle. Ibis Press (Ed). Paris. P : 764.

**Beloued A., 1998.** Plantes médicinales d'Algérie. 2ème Edition. Office des publications universitaires (Ed). Alger. P : 274.

**Benayad N., 2008.** Les huiles essentielles extraites des plantes médicinales marocaines : moyen efficace de lutte contre les ravageurs des denrées alimentaires stockées, laboratoire des substances naturelles et thermolyse éclair, département de chimie, faculté des sciences de rabat.

**Berezin E-B., et Brogard J-M., 1999.** Bases biologiques de l'antibiothérapie. Masson.

**Besri M., et Diatta F., 1985.** Résistance de *Botrytis cinerea*, agent de la pourriture grise de la tomate aux benzimidazoles, dicarboximides et sulfamides. - Bull. OEPP., 15(3), 379-386.

**Biljana B., Neda M.D., Isidora S., et Emilija J., 2007.** Antimicrobial and Antioxidant Properties of Rosemary and Sage (*Rosmarinus officinalis* L. and *Salvia officinalis* L., Lamiaceae) Essential Oils. Journal of Agricultural Food Chemistry (2007) 55(19), pp : 7879-7885.

**Bolay A., et Pezet R., 1987.** Problèmes actuels de la lutte contre les maladies de la vigne. Revue Suisse de Viticulture, Arboriculture et Horticulture 19: 21-24.

**Botton B., Breton A., Fèvre M., Gauthier S; Guy Ph., Larpent J.P., Reymond P., Sanglier J-J., Vayssier Y., et Veau R., 1990.** Moisissures Utiles Et Nuisibles : Importance Industrielle. Edition Masson, Paris.

**Brent K.J., Hollomon D.W., 2007.** Fungicide Resistance: The Assessment of Risk (Brussels, Belgium: CROPLIFE INTERNATIONAL).

**Bssaibis F., Gmira N., et Meziane M., 2009.** Activité antibactérienne de *Dittrichia viscosa* (L)W. Greuter. Rev Microbiol Ind San et Environn 3, 44-55.

**Bruneton J., 1993.** Pharmacognosie: phytochimie, plantes médicinales. 2ième éd. Tec. et Doc., Lavoisier, Paris, France.

**Buronzo A., 2008.** Grand guide des huiles essentielles: santé, beauté, bien-être., HACHETTE pratique, p : 224.

## C

**Cahagnier B., et Richard-Molard D., 1998.** Moisissures des aliments peu-hydratés, les moisissures. Collection sciences et techniques agroalimentaires. Ed. : Lavoisier. p : 39-41.

**Chafai E.A., Boukil A., Bachar M., Driss L., Guermal A., et Aafi A., 2014.** Manuel des bonnes pratiques de collecte du romarin « *Rosmarinus officinalis* » ; Projet PAM « Intégration de la biodiversité dans les chaînes de valeurs des plantes aromatiques et médicinales méditerranéennes au maroc » p : 12.

**Chanthaphon S., Chanthachum S., et Hongpattarakere T., 2008.** Antimicrobial activities of essential oils and crude extracts from tropical Citrus spp. against food-related microorganisms. Songklanakarin Journal of Science Technology 30(Suppl.1): 125-131.

**Cilindre C., Castro A.J., Clément C., Jeandet P., et Marchal R., 2007.** Influence of Botrytis cinerea infection on Champagne wine proteins (characterized by two-dimensional electrophoresis/immunodetection) and wine foaming properties. Food Chemistry 103: 139-149.

## D

**De Bary A., 1866.** Morphologie und Physiologie der Pilze, Flechten und Myxomyceten. Engelmann, Leipzig.

**De billerbeck V.G., Roques C., Vaniere P., et Marquier P., 2002.** Activité antibactérienne et antifongique de produits à base d'huiles essentielles. Revue hygiène, 10(3) pp: 248- 254.

**Degryse A.C., Delpla L., et Voinier M.A., 2008.** Risques et bénéfices possibles des huiles essentielles. Atelier santé environnement-IGS- EHESP, p : 87.

**De Miccolis Angelini R.M., Habib W., Rotolo C., Pollastro S., et Faretra F., 2010.** Selection, characterization and genetic analysis of laboratory mutants of Botryotinia Fuckeliana (*Botrytis cinerea*) resistant to the fungicide boscalid. Eur.J.Plant.Pathol.128,185-199.

**Dijoux N., Guingand Y., Bourgeois C., Durand S., Fromageot C., Combe C., et Ferret P.J. 2006.** Assessment of the phototoxic hazard of some essential oils using modified 3T3 neutral red uptake assay. Toxicol *in Vitro*; 20:480-489.

**DSA. 2016.** Direction des services agricoles. Service OPAT, Jijel.

## E

**Elad Y., et Stewart A., 2004.** Microbial control of *Botrytis* spp, p. 223-241, in: *Botrytis: biology, pathology and control*. Y. Elad, B. Williamson, P. Tudzynski and N. Delen, eds. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.

**Elad Y., Williamson B., Tudzynski P., et Delen N., 2004.** *Botrytis* spp. and diseases they cause in agricultural systems - an introduction, p. 1-6, in: *Botrytis: biology, pathology and control*. Y. Elad, B. Williamson, P. Tudzynski and N. Delen, eds. Kluwer Academic Press, Dordrecht, The Netherlands.

**Elmer P.A.G., et Michailides T.J., 2004.** Epidemiology of *Botrytis cinerea* in orchard and vine crops, p. 243-272, in: *Botrytis: biology, pathology and control*. Y. Elad, B.

**El-Bastawesy AM., Zekry ZK., Al-Mehdar HA., Al-Said MG., et El-Merzabani MM ., 2009.** The role of *Curcuma longa* against doxorubicin (Adriamycin)-induced toxicity in rats. *Journal of Medicinal Food.*;12(2):394-402.

## F

**Fandohan P., Gbenou D.J., Gnonlonfin B., Hell K., Marasas W.F.O., et Wingfield M.J., 2004.** Effect of essential oils on the growth of *Fusarium verticillioides* and fumonisin contamination in corn. *J. Agric. Food Chem.*, **52**, pp : 6824-6829.

**Fernández-Ortuño D., Chen F., et Schnabel G., 2012.** Resistance to Pyraclostrobin and Boscalid in *Botrytis cinerea* isolates from strawberry fields in the Carolinas. *Plant Dis.*96,1198-1203.

**Fouché J.G., Marquet A., et Hambuckers A., 2008.** Les Plantes Médicinales De La plante Au médicament conception et Réalisation .

## G

**GAC. 1998.** Le petit herboriste illustré. Plantes médicinales, Herboristerie, Phytothérapie. P : 727.

**Garneau F.X., 2001.** Notes du cours Produits naturels. Département des Sciences fondamentales, UQAC, Chicoutimi, Québec. p : 17.

**Gonzalez-Trujano M.E., Pena E.L, Martinez A.L., Moreno J., Guevara-Fefer P., Deciga Campos M., et Lopez-Munoz F.J., 2007.** Evaluation of the antinociceptive effect of

Rosmarinus officinalis L. using three different experimental models in rodents. J Ethnopharmacol. 111: 476-482.

**Giordani R., et Kaloustian J., 2006.** Action anticandidosique des huiles essentielles : leur utilisation concomitante avec des médicaments antifongiques J Phytothérapie (2006) Numéro 3,121-124.

**Groves J.W., et Drayton F.L., 1939.** The perfect stage of *Botrytis cinerea*. Mycologia 31: 485-489.

**Guenter., 1975.** The essential oils Vol II, III, IV, V, VI, and D. Van No strand Ed. New York USA.

## H

**Hélène R., 2013.** La diffusion des huiles essentielles. P : 19.

**Hennebert G.L., 1973.** *Botrytis* and *Botrytis*-like genera. Persoonia 7: 183-204.

**Hilan C., Sfeir R., Jawish D., et Aitour S., 2006.** Huiles essentielles de certaines plantes médicinales libanaises de la famille des Lamiceae. Lebanaise Science Journal. Vol.7 ( 2 ) : 13 - 22.

**Hellal Z., 2011.** Contribution à l'étude des propriétés antibactériennes et antioxydantes de certaines huiles essentielles extraites des Cistus. Application sur la sardine (*Sardinia pilchardus*). Thèse de Magister. Université de Mouloud Mammeri de Tizou – Ouzou. P : 120.

## I

**Ibañez E., Kubátová A., Señoráns F. J., Cavero S., Reglero G., et Hawthorne S. B., 2003.** Subcritical water extraction of antioxidant compounds from rosemary Plants. Journal of Agricultural and Food Chem., 51 (2): 375-382.

**Inouye S., Abe S., 2007.** Nouvelle approche de l'aromathérapie anti-infectieuse. Phytothérapie Numéro 1: 2-4.

**Isman M.B., 2000.** Plant essential oils for pest and disease management, Crop Protection. Vol.19: 603-608.

## J

**Jarvis W.R., 1992.** Managing diseases in greenhouse crops. American Phytopathological Society, St Paul, MN, p: 288.

## K

**Kaloustian J., Chevalier J., Mikail C., Martino M., Abou L., et Vergnes MF., 2008.** Etude de six huiles essentielles : composition chimique et activité antibactérienne - Phytothérapie ; Vol. 6 ; PP : 160-164.

**Karimi M., De Meyer B., Hilson P., 2005.** Modular cloning in plant cells. *Trends Plant Sci* 10 103–105.

**Kordali S., Cakir A., Zengin H., et Duru M. E., 2003.** Antifungal activities of the leaves of three *Pistacia* species grown in Turkey. *Fitoterapia*. 74 p: 164-167.

**Koul O., Walia S., et Dhaliwal G.S., 2008.** Essential oils as green pesticides: Potential and constraints. *Biopestic. Int.* 4, 1, 63–84.

**Koziol N., 2015.** Huiles essentielles d'*Eucalyptus globulus*, d'*Eucalyptus radiata* et de *Corymbia citriodora* : qualité, efficacité et toxicité. Thèse de doctorat. Université de Lorraine. P : 117.

**Kretschmer M., et Hahn M., 2008.** Fungicide resistance and genetic diversity of *Botrytis Cinerea* isolates from a vineyard in Germany. *J. Plant Dis. Prot.* 115, 214–219.

**Kretschmer M., Kassemeyer H.H., et Hahn M., 2007.** Age-dependent grey mould susceptibility and tissue-specific defence gene activation of grapevine berry skins after infection by *Botrytis cinerea*. *Journal of Phytopathology* 155: 258-263.

## L

**Laclau J.P., 2001.** Dynamique du fonctionnement minéral d'une plantation d'eucalyptus. Effets du reboisement sur un sol de savane du littoral congolais ; conséquences pour la gestion des plantations industrielles. Thèse de doctorat. Institut national agronomique paris-grignon. P : 146.

**Leroux P., 2004.** Chemical control of *Botrytis* and its resistance to chemical fungicides. In: Y. Elad, et al., Eds., *Botrytis: Biology, Pathology and Control*. Kluwer Academic Press, The Netherlands, pp: 195-222.

**Leroux P., Fritz R., Debieu D., Albertini C., Lanen C., Bach J., Gredt M., et Chapeland F., 2002.** Mechanisms of resistance to fungicides in field strains of *Botrytis cinerea*. *Pest.Manag.Sci.* 58, 876-888.

**Leyronas C., Nicot P., 2013.** Monitoring viable airborne inoculum of *Botrytis cinerea* in the South-East of France over 3 years: relation with climatic parameters and the origin of air masses. *Aerobiologia*, 29 (2), 291-299.

## M

**Madjour S., 2014.** Etude phytochimique et évaluation de l'activité antibactérienne d'une labiée *rosmarinus officinalis*. Université Mouhamed Khider Biskra. P : 122.

**Marie E., 2005.** Extraction Sans Solvant Assistée par Micro-ondes Conception et Application à l'extraction des huiles essentielles : p 17 ; 23,52.

**Martinez F., Dubos B., et Fermaud M., 2005.** The role of saprotrophy and virulence in the population dynamics of *Botrytis cinerea* in vineyards. *Phytopathology* 95: 692-700.

**Mehani M., et Segni L., 2014.** Effet antimicrobien des huiles essentielles de la plante *Eucalyptus camadulensis* sur certaines bactéries pathogènes. Université de Ghardaïa. P : 88.

**Micheli Pier A., 1929.** *Plantarum genera*. PP : 1-19.

## N

**Nicot P.C., et Baille A., 1996.** Integrated control of *Botrytis cinerea* on greenhouse tomatoes, p. 169-189, in: *Aerial plant surface microbiology*.

## O

**Okamura N., Haraguchi H., Hashimoto K., et Y a g h i A., 1994.** Flavonoids in *Rosmarinus officinalis* leaves. *Phytochemistry*, 37 (5): 1463-1466.

**Ormeno E., Fernandez C., et Mévy J.P., 2007.** Plant coexistence Alters terpene emission and content of Mediterranean Species-*Phytochemistry*.68 : 840-852.

**Ouraïni D., Agoumi A., Ismaïli-Alaoui M., Alaoui K., Cherrah Y., Amrani M., et Belabbas M.A., 2005.** Étude de l'activité des huiles essentielles de plantes aromatiques à propriétés antifongiques sur les différentes étapes du développement des dermatophytes, *J Phytothérapie* Numéro 4: 147-157.

**Oussala M., Caillet S., Saucier L., et Lacroix M., 2006.** Antimicrobial activity of selected plant essential oils on the growth of a *Pseudomonas putida* strain isolated from meat. *Meat Science* 73: 236-244.

## P

**Persoon C.H., 1801.** Synopsis methodica fungorum.p : 1-706

**Pitt J. L., et Hocking A.D., 1999.** Fungi and food spoilage, 2nd ed. Gaithersburg: Aspen Publishers.

**Ponce A.G., Fritz R., Del Valle C., et Roura S.I., 2003.** Antimicrobial activity of essential oils on the native microflora of organic Swiss chard. *Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie*, 36, 679-684.

## Q

**Quezel P., et Santa S., 1963.** Nouvelle Flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales, vol. 1-2. C.N.R.S., Paris, p : 1170.

## R

## S

**Selvakumar P., Edhaya Naveena B., et Prakash D.S., 2012.** Studies on the antidandruff activity of the essential oil of coleus amboinicus and eucalyptus globules, asian pacific journal of tropical biomedicine s715-s719.

**Smith R.E., 1900.** *Botrytis* and *Sclerotinia*; their relation to certain plant diseases and to each other. Botanical Gazette 29: 369-407.

## T

**Terrentroy A., 1994.** Tomate serre: enquête sur le *Botrytis* dans les cultures de tomate précoce. APREL Bulletin N°S-641 Chamber of Agriculture of Bouches du Rhône, France.

## U

**UNESCO, 1960.** Recherche sur la zone aride - XIII les plantes médicinales des régions arides. P : 97.

## V

**Veloukas T., Leroch M., Hahn M., et Karaoglanidis G.S., 2011.** Detection and molecular characterization of boscalid-resistant *Botrytis cinerea* Isolates from strawberry. Plant Dis. 95, 1302-1307.

**W**

- Warnke P.H., Sherry E., Russo P.A.J., et Show all., 2007.** Huiles essentielles antibactériennes chez des patients à tumeurs cancéreuses malodorantes *Phytothérapie* (2007-12-01) 5: 276-280 .
- Warot S., 2006.** Les Eucalyptus utilisés en Aromathérapie. Mémoire de fin de formation en Phyto-aromathérapie. PP : 31.
- Whetzel H.H., 1945.** A synopsis of the genera and species of the *Sclerotiniaceae*, a family of stromatic inoperculate discomycetes. *Mycologia* 37: 648-714.
- Williamson B., Duncan G.H., Harrison J.G., Harding L.A., Elad Y., et Zimand G., 1995.** Effect of humidity on infection of rose petals by dry-inoculated conidia of *Botrytis cinerea*. *Mycological Research* 99: 1303-1310.
- Williamson B., Tudzynski B., Tudzynski P., et Van Kan J.A.L., 2007.** *Botrytis cinerea*: the cause of grey mould disease. *Molecular Plant Pathology* 8. P: 561-580.

**X**

**Y**

- Yahyaoui N., 2005.** Extraction, analyse et évaluation de l'effet insecticide des huiles essentielles de *Mentha Spicata L* sur *Rhyzoperlhu dominicu (F .)* (Coleoptera, Kim, Y.K., and Xiao, C.L.,(2011). Stability and fitness of pyraclostrobin and boscalid-resistant phenotypes in field isolates of *Botrytis cinerea* from apple. *Phytopathology* 101,1385-1391.
- Yang R. Y., Lin S., et Kuo G., 2008.** Content and distribution of flavonoids among 91 edibles plant species. *Asia of pacific journal of clinical nutrition*. 17 (S1): 275-279.
- Yin Y.N., Kim Y.K., et Xiao C.L., 2011.** Molecular characterization of boscalid resistance in field isolates of *Botrytis cinerea* from apple. *Phytopathology* 101,986-995.

**Z**

- Zabeirou., et Hachimou., 2005.** Étude comparative entre les Huiles essentielles de la Menthe Verte (*Mentha Spicata L*) et de la Poivree (*Mentha Piperita L*) dans la région d'Ouargla. Mémoire de DES Biochimie —Université de Kasdi Merbbah \_Ouargla p : 16.

*Site internet*

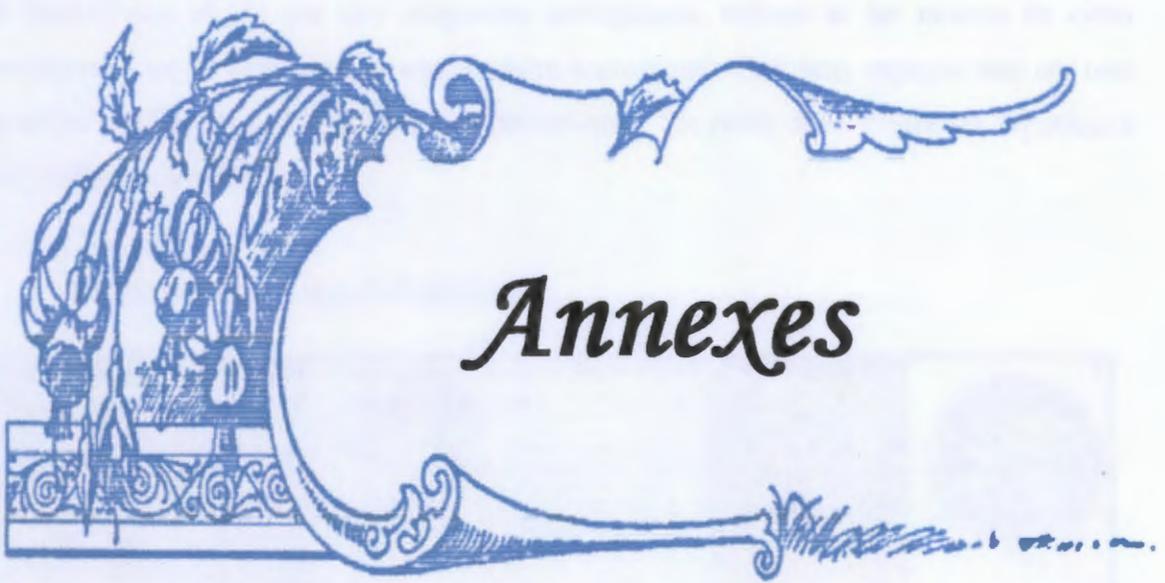
**Site web 1 :** <http://www.genoscope.cns.fr/spip/-Botrytis-cinerea,206-.html>

**Site web 2 :** <http://www.lepetitherboriste.net/copyright.html>

**Site web 3 :** [www.aromabio.fr/aromatherapie\\_bio\\_aromatogramme.htm](http://www.aromabio.fr/aromatherapie_bio_aromatogramme.htm)

[Faint text]

[Faint text]

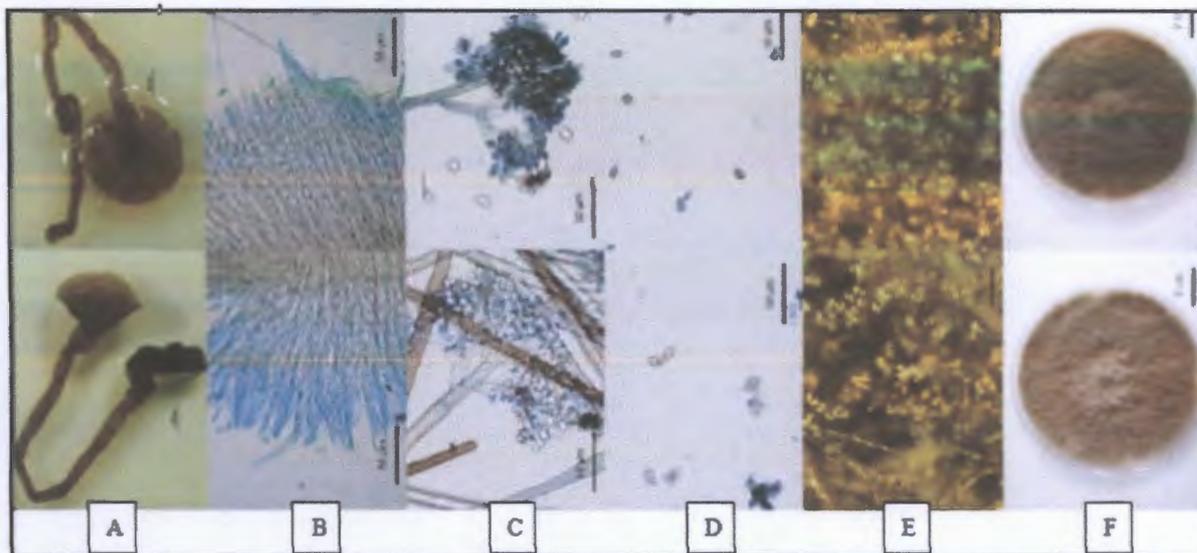


[Faint text]

[Faint text]

**Annexe I**

La pourriture grise de la vigne est causée par un complexe d'au moins deux espèces vivant en sympatrie, *B. cinerea* (espèce dominante) et *B. pseudocinerea* (espèce minoritaire nouvellement décrite). Ces deux espèces sont distinguées (1) par leur position différente dans la phylogénie de l'espèce (critère phylogénétique), (2) par leur incapacité à produire une descendance fertile, et par l'incapacité des populations respectives à échanger des gènes (critère biologique) et (3) par leur exigences écologiques, mêmes si les raisons de cette différenciation n'ont pu être mises au clair (critère écologique). Ces deux espèces sont par non distinguables par leur morphologie (critère phénétique). On parle donc d'espèces cryptiques (Walker et Fournier, 2012).

**I. Caractéristiques morphologiques**

**Figure I :** Caractéristiques morphologiques de *Botrytis pseudocinerea* (en bas) et de *Botrytis cinerea* (en haut). **A :** Apothécies, structures sexuées de *Botrytis* sp. ; **B :** Asques, contenant les ascospores (spores sexuées), observées après dissection des apothécies; **C :** Conidiophores en arbuscule, portant les conidiospores; **D :** conidies (spores asexuées); **E :** mycélium sporulant (10 jours); **F :** culture de 10 jours sur milieu malt-levure (Walker et Fournier, 2012).

**Annexe II : Résultats de l'évaluation de la croissance mycélienne**❖ **Combinaison****Tableau I : Effet des deux huiles essentielles combinées sur le *Botrytis cinérea***

Jour	Combinaison						
	1 <sup>er</sup> jour	2 <sup>eme</sup> jour	3 <sup>eme</sup> jour	4 <sup>eme</sup> jour	5 <sup>eme</sup> jour	6 <sup>eme</sup> jour	7 <sup>eme</sup> jour
Diamètre des colonies mycéliennes (mm)	0	0	0	0	0	0	0

❖ **Résultats des mesures des diamètres des colonies mycéliennes****Tableau II : Effet d'huile essentielle de l'Eucalyptus sur le *Botrytis cinérea***

Jours Dilution	1 <sup>er</sup> jour	2 <sup>eme</sup> jour	3 <sup>eme</sup> jour	4 <sup>eme</sup> jour	5 <sup>eme</sup> jour	6 <sup>eme</sup> jour	7 <sup>eme</sup> jour
0,75 %	0	0	0	0	0	0	0
0,50 %	0	6	9	12	17	24	28
0,25 %	5	7	12	18	23	26	30
0,05 %	7	11	18	27	33	36	37

**Tableau III : Effet d'huile essentielle de Romarin sur le *Botrytis cinérea***

Jours Dilution	1 <sup>er</sup> jour	2 <sup>eme</sup> jour	3 <sup>eme</sup> jour	4 <sup>eme</sup> jour	5 <sup>eme</sup> jour	6 <sup>eme</sup> jour	7 <sup>eme</sup> jour
0,75 %	0	0	0	0	0	0	0
0,50 %	0	0	5	8	12	15	19
0,25 %	0	0	7	11	14	21	25
0,05 %	5	8	12	16	21	25	30

Réalisé par : Sakhri Wafa  
Bouchair Ourida

Membre de jury :  
Président : M<sup>r</sup> Sebti M  
Encadreur : M<sup>r</sup> Bouldjedri M  
Examinatrice: M<sup>me</sup> Bouziane Z

**THEME :** Evaluation de l'activité antifongique des huiles essentielles issues de deux plantes aromatiques (Romarin et eucalyptus), contre le *Botrytis cinerea* agent causal de la pourriture grise des fraisières

### Résumé

L'objectif de la présente étude est d'évaluer l'activité antifongique de l'huile essentielle extraite de deux plantes aromatiques l'*Eucalyptus radiata* et le *Rosmarinus officinalis* contre le *Botrytis cinerea* agent causal de la pourriture grise du fraisier. Le travail est basé essentiellement sur les tests antifongiques par la méthode de contact direct et par la méthode de l'aromatogramme. Les résultats obtenus par les deux méthodes montrent que les deux H.E. possèdent une activité antifongique très efficace. Néanmoins l'efficacité de l'H.E. de *R. officinalis* est beaucoup plus élevée que celle du *E. radiata*. Pour l'utilisation combinée des deux huiles à l'état pure, les résultats obtenus montrent une activité antifongique encore plus importante (effet synergique). Ces résultats nous permettent de proposer sans équivoque l'utilisation de ces huiles comme biofongicide pour faire face aux phénomènes de résistance de ce champignon vis-à-vis les produits chimiques conventionnelles.

**Mots clés:** Activité antifongique, *Botrytis cinerea*, huile essentielle, plantes aromatiques.

### Summary:

The objective of this study is to evaluate the antifungal activity of the essential oil extracted from two aromatic plants *Eucalyptus radiata* and *Rosmarinus officinalis* against *Botrytis cinerea* causal agent of grey rot of strawberry. The work is essentially based on antifungal tests by the direct contact method and the Aromatogramme method. The results obtained by the two methods show that the two H.E. possess very effective antifungal activity. However the effectiveness of the H. E. *R. officinalis* is much higher than that of H.E. *E. radiata*. For the combined use two oils pure, the results obtained show an even more significant antifungal activity (synergistic effect). These results allow us to propose without equivocation the use of these oils as Biofungicide to deal with the phenomena of resistance of this fungus towards conventional chemicals.

**Key words:** antifungal activity, *Botrytis cinerea*, essential oil, aromatic plants.

### ملخص:

الهدف من هذه الدراسة هو تقييم نشاط الزيوت الأساسية كمضادات للفطريات انطلاقا من الزيوت المستخرجة من نباتين عطريتين: *Rosmarinus officinalis* و *Eucalyptus radiata* و دراسة فعاليتها ضد فطر *Botrytis cinerea* العامل المسبب للعفن الرمادي للفراولة. ويستند هذا العمل أساسا على اختبارات مضادات الفطريات بأسلوب الاتصال المباشر وأسلوب أروماتوجرام. وتظهر النتائج التي تم الحصول عليها أن كلا الزيتان يملكان فعالية ضد النشاط الفطري، غير أن فعالية الزيت الأساسي لنبات *R.officinalis* أكبر من فعالية الزيت الأساسي *E. radiata*. ومن أجل استعمال مزيج الزيتان معا في حالتها الصافية فإن النتائج المتحصل عليها تبين أيضا نشاط مضاد فطري أكثر أهمية (الأثر التآزري)، حيث تسمح لنا هذه النتائج بالقتراح دون ريب استخدام الزيوت الأساسية كمضادات فطرية حيوية مساعدة على التعامل مع ظاهرة مقاومة هذا الفطر للمواد الكيميائية التقليدية.

الكلمات المفتاحية: ضد النشاط الفطري ، *Botrytis cinerea* ، الزيوت الأساسية ، النباتات العطرية.

