

RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE

MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR
ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE



UNIVERSITÉ BLIDA 1

FACULTÉ DES SCIENCES DE LA NATURE ET
DE LA VIE

DÉPARTEMENT DES BIOTECHNOLOGIE

Mémoire de fin d'études en vue de l'obtention de Master Académique
en Sciences de la Nature et de la Vie

Spécialité : Biotechnologie végétale

Thème

**Activité antimicrobienne *in vitro* des
extraits de *Rosmarinus officinalis* L.
de la région de Blida**

Réalisé par: STAMBOULI Fatima Ezzahrâa

Devant le jury composé de:

M ^{me} FELIDJ M.	Maitre de conférences B	Universite Blida 1	Présidente
M ^{me} BOUCHENAK F.	Maitre assistante A	Universite Blida 1	Promotrice
M ^{me} AIT SAADI N.	Maitre assistante A	Universite Blida 1	Examinatrice
M ^{me} CHEBATA N.	Maitre assistante A	Universite Blida 1	Examinatrice

Année Universitaire 2013-2014

Remerciements

Mes remerciements s'adressent à ma promotrice, madame **Bouchenak F.** Recevez ici mes sincères remerciements pour la confiance, les conseils que vous m'avez accordés tout le long de ce travail. Merci également pour votre encadrement, votre disponibilité et votre gentillesse. Je vous adresse ma profonde reconnaissance pour vos remarques en vue d'améliorer ce manuscrit.

Mes remerciements vont aussi aux membres de jury: Madame **Felidj M.**, Madame **Ait Saad i N.** et Madame **Chebata N.** Recevez mes plus vifs remerciements pour avoir accepté d'examiner ce travail.

Ma sincère reconnaissance va à Monsieur **Hazenek.**, pour son aide incessante, soyez assuré de mon respect pour m'avoir fait bénéficier de vos expériences et de vos rigueurs scientifiques et professionnelles. Merci pour tout ce que vous m'avez apporté, transmis et appris afin de mener à bien ce travail.

Et à Monsieur le docteur **Ould Rouis H.** pour ses conseils judicieux et ses innombrables encouragements. Je lui témoigne ma profonde gratitude.

Je tiens à vous remercier chaleureusement Monsieur **Toumi M.** pour votre aide technique et scientifique.

Je ne peux omettre d'adresser mes remerciements à Madame **Stambouli A.**, Monsieur **Iddir D.**, Madame **Ammam S.** et Madame **Chabane D.**

Une pensée particulière pour mes parents, mes frères et sœurs, et mes amis. Vous étiez toujours à mes côtés et vous m'avez toujours apporté l'appui et le soutien. Pour cela, je vous remercie chaleureusement.

Enfin, je tiens à remercier tous mes enseignants et toute personne dont le nom n'est pas cité ici mais qui par son aide, sa sympathie et sa gentillesse m'a apporté soutien et réconfort.

Dédicaces

Je dédie ce modeste travail

à, Mes

très chers parents Mes

frères et sœurs

Tous ceux qui m'aiment

Activité antimicrobienne *in vitro* de extraits de *Rosmarinus officinalis* L. de la région de Blida

Cette étude a pour objectif l'évaluation de l'activité antimicrobienne de l'huile essentielle et de l'extrait méthanolique de *Rosmarinus officinalis* L.

L'extraction de l'huile essentielle a été réalisée par hydrodistillation, les extraits méthanoliques ont été obtenus par la méthode d'extraction par solvant en utilisant le Soxhlet. Le rendement, les caractéristiques organoleptiques et chimiques de l'huile essentielle de *Rosmarinus officinalis* L. ont été déterminés.

L'huile essentielle est active *in vitro* contre *Erwinia amylovora* (30 mm), *Pseudomonas syringae* pv. *savastanoi* (16 mm), *Pectobacterium carotovorum carotovorum* (14 mm). Elle possède une efficacité moyennement marquée sur une gamme de champignons phytopathogènes, à savoir : *Sclerotinia* sp. (18 mm), *Phytophthora* sp. (25 mm), *Trichoderma* sp. (15 mm), *Alternaria* sp., *Botrytis* sp. et *Rhizoctonia solani* (12 mm).

Les extraits bruts méthanoliques ont montré une activité antibactérienne positive sur *Erwinia amylovora* (15 mm) et *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* (12 mm). Par contre, leurs activités antifongiques ont été révélées positives seulement sur *Trichoderma* sp. (12 mm).

Mots clés: huile essentielle, extrait méthanolique, activité antibactérienne, activité antifongique, analyses chimiques, *Rosmarinus officinalis* L.

***In vitro* antimicrobial activity of extracts of *Rosmarinus officinalis* L. in the region of Blida**

This study aimed to evaluate the antimicrobial activity of the essential oil and methanol extract of *Rosmarinus officinalis* L.

The extraction of the essential oil was carried out by steam distillation, the methanol extracts were obtained by the solvent extraction method by using the Soxhlet.

Performance, organoleptic and chemical characteristics of the essential oil of *Rosmarinus officinalis* L. were determined.

The essential oil is active *in vitro* against *Erwinia amylovora* (30 mm), *Pseudomonas syringae* pv. *Savastanoi* (16 mm) and *Pectobacterium carotovorum* (14 mm). And processes an average efficiency on a range of phytopathogenic fungi, such as: *Sclerotinia* sp. (18 mm), *Phytophthora* sp. (25 mm), *Trichoderma* sp. (15 mm), *Alternaria* sp., *Botrytis* sp. and *Rhizoctonia solani* (12 mm).

The methanolic crude extracts showed a positive antibacterial activity on *Erwinia amylovora* (15 mm) and *Pseudomonas syringae* pv. *Syringae* (12 mm). Whereas, their antifungal activities were found positive only on *Trichoderma* sp. (12 mm).

Keywords: essential oil, methanol extract, antibacterial activity, antifungal activity, chemical analysis, *Rosmarinus officinalis* L.

النشاط المضاد للجراثيم المخبر لمستخلصات منطقة في *L. officinalis Rosmarinus* البلدية

تهدف هذه الدراسة إلى تقييم سعة النشاط المضاد للجراثيم للزيت الأساسي ومستخلص الميثانول لنبات

L. officinalis Rosmarinus

ستخراج الزيت بطريقة أساسية بالبخار التقطير

تم الحصول على المستخلصات باستخدام طريقة الاستخلاص بالمذيبات باستخدام جهاز كسلتسو

تحديد الخصائص الحسية والكيميائية للزيت الأساسي ل

L. officinalis Rosmarinus

ظهر الزيت الأساسي فعالية ضد البكتيريا الممرضة للنبات

Erwinia amylovora, *Pseudomonas syringae* pv. *savastanoi*, *Pectobacterium carotovorum*
carotovorum.

و ضد فعالية معتدلة للفطريات الممرضة للنبات وهي

Sclerotinia sp., *Phytophthora* sp., *Alternaria* sp., *Trichoderma* sp., *Botrytis* sp., et *Rhizoctonia*
solani

أظهرت مستخلصات الميثانول فعالية ضد بكتيريا

Erwinia amylovora et *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*.

أيخص ما فيم النشاط المضاد للفطريات بـد كاقف ن اعلى طقا فيجاي

Trichoderma sp.

الكلمات الرمز: الزيت الأساسي، مستخلص الميثانول، النشاط المضاد للبكتيريا، النشاط المضاد للفطريات، الخصائص
الكيميائية

Liste des abréviations

CIMAP : Institut National de Plantes Médicinales et Aromatiques. CGMS :

Chromatographie Gazeuse liée à une Spectrométrie de Masse. HPLC :

Chromatographie Liquide à Haute Pression.

CMI: Concentration Minimale Inhibitrice. PDA: P

otato Dextrose Agar

AFNOR: Association Française de Normalisation

Liste des figures

Figure 1: Aspects morphologiques de <i>Rosmarinus officinalis</i> L.	5
Figure 2: la fleur de <i>Rosmarinus officinalis</i> L.	5
Figure 3: Feuilles du romarin	5
Figure 4: Dispositif expérimental d'un extracteur Soxhlet	9
Figure 5: Cycle de développement de la pourriture molle bactérienne	16
Figure 6: Conidies de <i>Fusarium</i> sp.	19
Figure 7: Sporanges et zoospores de <i>Phytophthora</i> sp.	20
Figure 8: Conidies d' <i>Alternaria</i> sp.	21
Figure 9: Conidiophores de <i>Trichoderma</i> sp.	22
Figure 10: Conidies de <i>Botrytis</i> sp.	23
Figure 11: Conidies de <i>Penicillium</i> sp.	23
Figure 12: Conidies de <i>Cladosporium</i> sp.	24
Figure 13: Mycélium de <i>Rhizoctonia solani</i> .	25
Figure 14: Conidies d' <i>Heminthosporium</i> sp.	26
Figure 15: Illustration de la méthode des aromatoigrammes surboîte de Pétri	30
Figure 16: Illustration de la méthode des microatmosphères	30
Figure 17: Dispositif d'extraction à chaud par Soxhlet	35
Figure 18: Dispositif d'hydrodistillation «Clevenger».	36
Figure 19: l'huile essentielle de <i>Rosmarinus officinalis</i> L.	44
Figure 20 : Evaporateur rotatif	
Figure 21: Balance	Annexe
Figure 22: Bain Marie	Annexe
Figure 23: Photos représentatives des zones d'inhibition (mm) des bactéries phytopathogènes vis-à-vis des huiles essentielles de <i>Rosmarinus officinalis</i> L.	Annexe
Figure 24: Photos représentatives des zones d'inhibition (mm) des bactéries phytopathogènes vis-à-vis des extraits méthanoliques de <i>Rosmarinus officinalis</i> L.	Annexe
Figure 25: Photos représentatives des zones d'inhibition (mm) des champignons phytopathogènes vis-à-vis des huiles essentielles de <i>Rosmarinus officinalis</i> L.	Annexe
Figure 26: Photos représentatives des zones d'inhibition (mm) des champignons phytopathogènes vis-à-vis des extraits méthanoliques de <i>Rosmarinus officinalis</i> L.	Annexe

Liste destableaux

Tableau1 : Caractéristiquesetrendementdel'extraitméthanoliquede <i>Rosmarinus officinalis</i> L.	44
Tableau2 : Caractéristiquesorganoleptiquesde l'huileessentiellede <i>Rosmarinus officinalis</i> L.	45
Tableau 3 :Caractéristiqueschimiques de l'huileessentielle de <i>Rosmarinus officinalis</i> L.	46
Tableau 4 : Diamètresdes zones d'inhibitionen(mm) (moyenne± écartype)de l'huile essentielle de <i>Rosmarinus officinalis</i> L.	47
Tableau 5 : Diamètresdes zones d'inhibitionen(mm) (moyenne±ecartype)del'extrait méthanolique de <i>Rosmarinus officinalis</i> L.	48
Tableau 6 : Résultatsdupouvoir antifongiquede l'huileessentiellede <i>Rosmarinus officinalis</i> L.	50
Tableau 7 : Résultats dupouvoir antifongique del'extrait méthanolique de <i>Rosmarinus officinalis</i> L.	51

Table des matières

Introduction	1
Chapitre I : <i>Rosmarinus officinalis</i> L.	
I.1. Etymologie	3
I.2. Description botanique	3
I.3. Systematique	4
I.4. Répartition géographique	6
I.5. Culture du romarin	6
I.6. Production mondiale	6
I.7. Divers usages de romarin	7
I.8. Principes actifs du romarin	7
I.9. Méthodes d'extractions des principes actifs	8
I.9.1. Les techniques classiques	8
I.9.2. Les techniques émergentes	10
Chapitre II : Microorganismes phytopathogènes étudiés	
II.1. Les Bactéries phytopathogènes	12
II.1.1. Symptômes provoqués par les bactéries phytopathogènes	12
II.1.2. Les phases d'infection	13
II.1.3. Caractéristiques des souches bactériennes utilisées	13
II.2. Les champignons phytopathogènes	17
Chapitre III : Lutte biologique	
III.1. Lutte biologique	27
III.2. Les métabolites secondaires et les interactions plante-bioagresseurs	27
III.3. Les métabolites secondaires et les réactions de défense	28
III.4. Activité antimicrobienne des composés naturels des plantes	28
III.5. Méthodes d'évaluation de l'activité antimicrobienne	29
III.5.1. Aromatogramme	29
III.5.2. Microatmosphères	30
III.5.3. Méthode de dilution	30
III.5.4. Méthode de diffusion en puits.	31

Table des matières

III.5.5. Détermination de l'effet bactériostatique ou bactéricide	31
---	----

Chapitre IV: Matériel et méthodes

IV.1. Matériel biologique	32
IV.2. Méthodes	33
IV.2.1. Préparation de l'échantillon végétal	33
IV.2.2. Extraction	34
IV.2.2.1. Extraction à chaud par Soxhlet	34
IV.2.2.2. Extraction de l'huile essentielle de <i>Rosmarinus officinalis</i> L	35
IV.2.3. Détermination du rendement en huile essentielle	36
IV.2.4. Caractéristiques organoleptiques	37
IV.2.5. Caractéristiques chimiques de l'huile essentielle	37
IV.2.6. Pouvoir antimicrobien	38
IV.2.6.1. Pouvoir antibactérien <i>in vitro</i> .	39
IV.2.6.2. Pouvoir antifongique <i>in vitro</i>	39
IV.2.6.3. Lecture des résultats	41
	41

Chapitre V: Résultats et discussion

V.1. Rendement en huile essentielle de <i>Rosmarinus officinalis</i> L.	42
V.2. Caractéristiques des extraits obtenus	43
V.3. Caractéristiques organoleptiques	43
V.4. Caractéristiques chimiques de l'huile essentielle	45
V.5. Évaluation de l'activité antimicrobienne de l'huile essentielle et de l'extrait méthanolique de <i>Rosmarinus officinalis</i> L.	45
V.5.1. Evaluation du pouvoir antibactérien de l'huile essentielle par la méthode de diffusion à partir des disques solides	46
V.5.2. Evaluation du pouvoir antibactérien testé par les extraits méthanoliques	47
V.5.3. Evaluation du pouvoir antifongique de l'huile essentielle de <i>Rosmarinus officinalis</i> L.	48
V.5.4. Evaluation du pouvoir antifongique des extraits méthanoliques	49
V.6. Discussion de l'activité antimicrobienne de <i>Rosmarinus officinalis</i> L.	50
V.6.1. L'activité antibactérienne	51

Table des matières

V.6.2. L'activité antifongique	53
Conclusion	54
Références bibliographiques	56
Annexes	

Introduction

Introduction

L'étude de la chimie des plantes est toujours d'une brûlante actualité malgré son ancienneté. Elle tient principalement au fait que le règne végétal représente une source importante d'une immense variété de molécules bioactives (Ferrari, 2002).

Selon la FAO (Food and Agriculture Organization), la lutte intégrée est définie comme étant la conception de la protection des cultures dont l'application fait intervenir un ensemble de méthodes satisfaisant les exigences à la fois écologiques, économiques et toxicologiques en réservant la priorité à la mise en œuvre délibérée des éléments naturels de limitation en respectant les seuils de tolérance.

C'est l'application rationnelle d'une combinaison de mesures biologiques, biotechnologiques, chimiques, physiques, culturales ou intéressant la sélection des végétaux dans laquelle l'emploi de produits chimiques phytopharmaceutiques est limité au strict nécessaire pour maintenir la présence d'organismes nuisibles en dessous d'un seuil à partir duquel apparaissent des dommages ou une perte économiquement inacceptables.

Le principe de l'agriculture intégrée caractérise des pratiques agricoles menant à des aliments de qualité en utilisant des moyens naturels et des mécanismes régulateurs proches de ceux qui existent dans la nature, pour remplacer les apports (intrants) polluants et coûteux, et pour assurer une agriculture visant le développement durable.

Les moyens biologiques, techniques et chimiques sont utilisés de manière équilibrée pour prendre en compte la protection de l'environnement, ainsi que les exigences économiques (rentabilité) et sociales.

Dans cette même optique, et pour des considérations de développement durable, nous avons entrepris ce travail qui porte sur l'étude de l'activité antimicrobienne de ses extraits de *Rosmarinus officinalis* L. de la famille des *lamiacées* connue pour son pouvoir anti-inflammatoire et antimicrobien.

Introduction

LeromarinestunarbustespontanétrèsrépanduenAlgérie,quipoussesurtoutprèsde la Méditerranée, sur un sol calcaire. On peut aussi le cultiver dans les jardins partout à travers le monde. On peut le reconnaître par ses longues et minces feuilles vertes, sans pétioles. À la floraison, le romarin contient des grappes de petites fleurs dont la couleur varie du bleu au violet.

Nous avons fixé comme objectif dans ce travail, l'étude de l'effet antimicrobien de cette plante vis-à-vis des bactéries et des champignons phytopathogènes et ceci par des confrontations *in vitro* en boîtes de Pétri.

Ce travail a pour finalité de permettre l'utilisation du romarin comme agent de lutte biologique.

Chapitre I

Rosmarinus officinalis L.

Le Romarin ou Romarin officinal dont le nom scientifique est le *Rosmarinus officinalis* L., est un arbrisseau de la famille des Lamiacées (ou Labiées), poussant à l'état sauvage sur le pourtour méditerranéen, en particulier dans les garrigues arides et rocailleuses, sur terrains calcaires. Fraîche ou séchée, cette herbe condimentaire se retrouve dans la cuisine méditerranéenne, est une variété améliorée et cultivée dans les jardins. C'est une plante mellifère; le miel de romarin, ou «miel de Narbonne» est réputé (Rameau *et al.*, 2008). C'est également un produit fréquemment utilisé en parfumerie. Enfin, on lui attribue de nombreuses vertus phytothérapeutiques ou phylogénétiques.

Il est employé pour améliorer et stimuler la mémoire encore aujourd'hui en Grèce, les étudiants ne font pas brûler dans leurs chambres en période d'examen (Boullard, 2001).

I.1. Etymologie

Le nom «romarin» viendrait du latin «*rosmarinus*» (rosée de mer) (Scheler, 1862), ou du grec «*rhopomyrinos*» (buisson aromatique) (Genaust, 1996) ou encore du latin «*rhusmarinus*» (sauge de mer) (Rameau *et al.*, 2008). On l'appelle également «herbe-aux-couronnes», en provençal, «encensier» (Max, 2008).

Selon Beloued (2001), plusieurs appellations sont attribuées au *Rosmarinus officinalis* L. :

- ✓ **Les noms arabes:** klil, Hatssa, Loubon, hassalban.
- ✓ **Les noms berbères:** Iazir, Aziir, Ouzbir, Touzala.

I.2. Description botanique

Le romarin peut atteindre jusqu'à 1,50 m de hauteur, voire jusqu'à 2 m en culture (Figure 1). Il est reconnaissable en toute saison à ses feuilles persistantes sans pétiole, coriaces, beaucoup plus longues que larges, aux bords légèrement enroulés (Figure 3), verts sombres dessus, blanchâtres dessous. Leur odeur, très camphrée, évoque aussi l'encens d'où il doit son nom «encensier» en provençal.

La floraison commence dès le mois de février, parfois en janvier, et se poursuit jusqu'en avril-mai. Certaines variétés peuvent fleurir une deuxième fois en début d'automne (McVicar, 2006). La couleur des fleurs, qui se présentent en grappes assez semblables à des épis, varie du bleu pâle au violet. On trouve également, mais plus

rarement, la variété à fleurs blanches *R. officinalis albiflorus*. Leur calice est velu, à dents bordées de blanc. Elles portent deux étamines ayant une petite dent vers leur base. La lèvre inférieure de la corolle est profondément divisée, faisant penser au labelle de certaines orchidées (**Figure 2**). Chez la plupart des Lamiacées, le fruit est un tétrakène. Ce dernier est de couleur brune (**Trujano et al., 2007; Bekkara et al., 2007**).

I.3. Systématique

La classification botanique complète de la famille des lamiacées n'était achevée qu'au début du 20^{ème} siècle en raison de l'extrême variabilité de ses espèces. L'une des plus importantes de la flore d'Algérie, compte plus de 200 genres et 3500 espèces.

Selon **Quezel et Santa (1963)**, le romarin est classé comme suit:

- **Règne** : Plantae.
- **Embranchement** : Spermaphytes.
- **Sous-embranchement** : Angiospermes
- **Classe** : Dicotylédones.
- **Sous-classe** : Dialypétales.
- **Ordre** : Lamiales (labiales).
- **Famille** : Lamiaceae.
- **Genre** : *Rosmarinus*.
- **Espèce** : *Rosmarinus officinalis* L.



Figure 1 : Aspect morphologiques de *Rosmarinus officinalis* L.

(Photo originale, 2014)



Figure 2 : la fleur de *Rosmarinus officinalis* L. (Photo originale, 2014)



Figure 3: Feuilles du romarin (Photo originale, 2014)

I.4. Répartition géographique du romarin

Le romarin est originaire du sud de l'Europe notamment des régions de la mer Méditerranée, on le trouve dans tout le sol algérien (**Quezelet Santa, 1963**), dans l'Espagne, le sud de la France, l'Italie, la Grèce (**Teuscher et al., 2005**). On le trouve principalement dans les terrains arides et ensoleillés, comme les garrigues, les maquis et les rocailles. Il n'apprécie pas une sécheresse trop importante mais se contente de l'humidité du littoral, d'où il pourrait tenir son nom («rosé de mer» en latin).

Il se répend entre le niveau de la mer et 650 mètres d'altitude (**Rameau et al., 2008**). Parfois jusqu'à 1500 mètres d'altitude (**Panda, 2009**).

Le romarin est commun dans toute l'Algérie jusqu'au Sahara (**Beloued, 2001**).

I.5. Culture du romarin

Le romarin se cultive dans un endroit ensoleillé, dans un sol calcaire et bien drainé (**Polese, 2006**). Bien que ce soit une plante aimant les climats chauds, il supporte les gelées si le sol ne conserve pas l'humidité. Il se multiplie facilement au printemps ou à l'automne par bouturage ou marcottage; plus difficilement en été par semis car sa germination est lente (**Polese, 2006**). Le romarin est assez résistant aux nuisibles. Il craint toutefois l'herpicide brun en cas d'humidité trop importante (**Panda, 2009**).

I.6. Production mondiale

Le romarin est cultivé à large échelle en Espagne, en Tunisie, au Maroc, en Italie, en France, en Algérie et au Portugal, principalement pour en extraire de l'huile essentielle (**Panda, 2009**). La production mondiale d'huile essentielle de romarin atteint 200 à 300 tonnes en 2005 (**Farooq et al., 2005**).

En Inde, la CIMAP (*Central Institute of Medicinal and Aromatic Plants*) a introduit la production de romarin à la fin des années 80, qui s'est développée au cours des années 90 (**McVicar, 2006**). Cette production est concentrée dans le sud, dans les Nilgiri et autour de Bangalore (**Farooq et al., 2005**).

I.7. Divers usages de romarin

Le *Rosmarinus officinalis* L. possède des propriétés aromatiques, antioxydantes, antimicrobiennes, anti-tumorales et anti-hépatotoxiques. L'activité antioxydante est liée aux composés phénoliques présents dans le romarin (acide carnosique et carnosol, diterpènes abietanes, acide rosmarinique, ester de l'acide hydroxycinnamique). Ces composés avec d'autres isoprénoides (stéroïdes, isoprène, mono- et diterpènes, tocophérols ou caroténoïdes) jouent le rôle de protection; ils sont considérés comme des constituants bioactifs (Touafek, 2010).

I.8. Principes actifs du romarin

Les principaux constituants du romarin responsables des différentes propriétés sont :

1.8.1. Les acides phénoliques: principalement l'acide carnosique, acide vanillique, carnosol, acide rosmarinique... Ils ont une grande action antimicrobienne qui change d'une variété à une autre du romarin. Ceci témoigne du changement de la teneur en polyphénols (Moreno et al., 2006).

1.8.2. Les flavonoïdes: Cette plante est très riche en flavonoïdes dont 07 sont principaux: la téoline, ériocitrine, hespéridine, diosmine, isoscutellarin 7-O-glucoside, hispidulin 7-O-glucoside, genkwanine. Ces composés sont localisés dans les feuilles, les fleurs, les racines et les tiges. Leur concentration change durant l'évolution de la plante (Del Bano et Castillo, 2004), (Okamura et al., 1994).

1.8.3. L'huile essentielle: L'huile essentielle du romarin (1 à 2% dans la plante) contient: le α -pinène (7 à 80%), le l'acétate de bornyl (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, rosmadia, 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 stéroïdes, de la choline, du mucilage (Bellakhdar, 1997) et de la résine (Beloued, 1998).

Le criblage phytochimique de l'extrait éthanolique des parties aériennes du romarin a indiqué la présence de flavonoïdes, de tannins et de saponines, et l'absence de alcaloïdes dans l'extrait aqueux (Gonzalez-Trujano *et al.*, 2007).

Okamura *et al.*, (1994) ont pu isoler de l'extrait hydro-méthanolique des feuilles du romarin trois flavonoïdes glycosylés (lutéoline 3'-O-β-D-glucuronide, lutéoline 3'-O-(4"-O-acétyl)-β-D-glucuronide, et lutéoline 3'-O-(3"-O-acétyl)-β-D-glucuronide), ainsi que l'hespéridine.

18 éléments minéraux ont été identifiés par la spectrométrie d'émission atomique, les plus abondants sont : Al : 146.48 mg/kg; Ca: 7791.80 mg/kg; Fe : 330.16 mg/kg; K: 14916.23 mg/kg; Mg: 1634.55 mg/kg; Na : 2711.87 mg/kg; P : 1474.60 mg/kg; Cr: 97.36 mg/kg; Sr: 74.65 mg/kg (Arslan *et al.*, 2007).

I.9. Méthodes d'extractions des principes actifs

L'extraction est une technique de séparation en génie chimique. Cette technique utilise un moyen d'extraction pour séparer sélectivement un ou plusieurs composés d'un mélange sur la base de propriétés chimiques ou physiques (Mouaset Lachenani, 2010). Elle permet de solubiliser les métabolites de la matière végétale en laissant la matrice cellulaire insoluble. Les produits ainsi obtenus sont des mélanges complexes de métabolites sous forme de liquides, semi-solides ou sous forme de poudres après évaporation du solvant (Handa *et al.*, 2008). On peut classer les techniques d'extraction en deux grands groupes : les techniques « classiques » et les techniques « émergentes ».

I.9.1. Les techniques classiques

Les opérations de l'extraction classiques regroupent plusieurs méthodes différentes énumérées ci-après :

a) Extraction au Soxhlet

L'extraction par Soxhlet, qui a été employée pendant longtemps, est une technique standard et la référence principale pour évaluer la performance d'autres méthodes d'extraction solide-liquide (Figure 4). L'extraction par Soxhlet est une technique générale et bien établie, et qui dépasse en performance les autres techniques conventionnelles d'extraction, excepté dans le cas de l'extraction des composés thermolabiles (Tyler *et al.*, 1881).

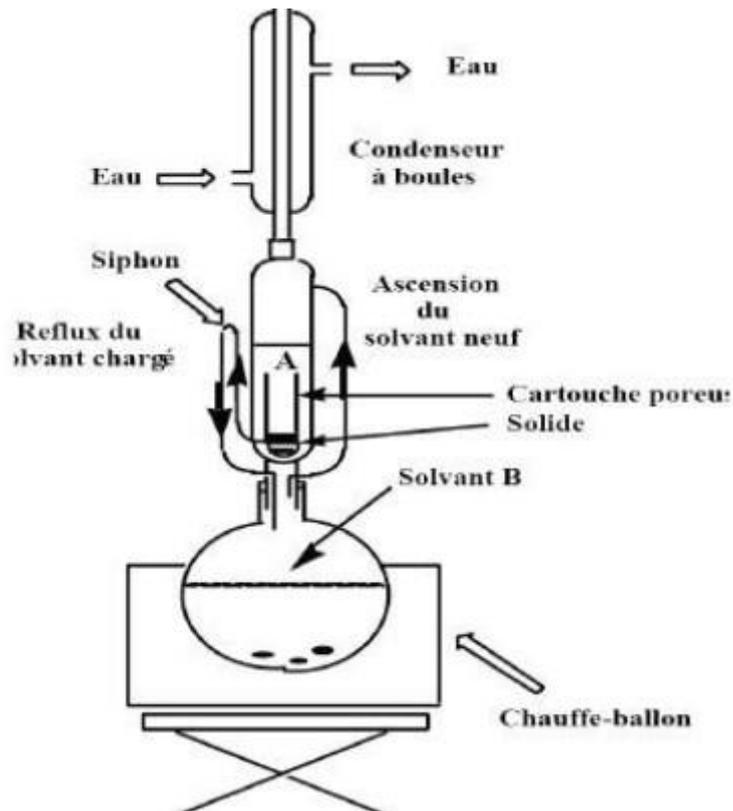


Figure 4: Dispositif expérimental d'un extracteur Soxhlet (Ben Amor, 2005).

b) L'hydrodistillation

L'hydrodistillation est une expérience d'extraction. Elle consiste à extraire le principe actif d'une plante. Son principe consiste à immerger la matière végétale dans un bain d'eau, ensuite l'ensemble est porté à ébullition sous pression atmosphérique. La chaleur permet l'éclatement et la libération des molécules odorantes contenues dans les cellules végétales. Ces molécules aromatiques forment avec la vapeur d'eau un mélange. Sachant que la température d'ébullition d'un mélange est atteinte lorsque la somme des tensions de vapeur de chacun des constituants est égale à la pression d'évaporation, elle est donc inférieure à chacun des points d'ébullition des substances pures (Crouzet, 1996).

c) La macération

La macération est une opération qui consiste à laisser la poudre du matériel végétal en contact prolongé avec un solvant pour en extraire les principes actifs. C'est une extraction qui se fait à température ambiante. La macération ne doit être confondue avec l'infusion ou la décoction (Mellat, 1997).

d) L'infusion

C'est la mise en suspension d'un solide dans un liquide chaud ou l'arrosage du solide, parce que le liquide afin de dissoudre les constituants utiles suivi du refroidissement du mélange.

e) La décoction

C'est l'opération dans laquelle le solide est mis à bouillir dans un liquide en vue d'extraire les parties solubles.

f) L'expression

Cette opération consiste à «faire sortir» un produit en exerçant une pression.

g) L'enfleurage

L'enfleurage à froid, le plus ancien des procédés, est aujourd'hui presque totalement abandonné. Il était principalement utilisé pour les fleurs fragiles (exemple: violette) qui ne supportent pas la chaleur. On dépose les fleurs sur des châssis de verre enduits de graisse. On laisse reposer: la graisse absorbe les molécules odorantes. On renouvelle les fleurs souvent jusqu'à saturation de la graisse (Boussetta et al., 2009).

h) La percolation

L'extraction est obtenue par passage lent et régulier d'un solvant à travers d'une poudre de drogue placée dans un percolateur. Les quantités de drogues et des solvants, la durée et le débit de l'écoulement, la température et l'agitation, la granulométrie de la drogue, le type de l'appareil utilisés sont autant de paramètres de nature à influencer sur l'extraction (Boussetta et al., 2009).

I.9.2. Les techniques émergentes

Parmi les différentes méthodes émergentes on peut citer :

a) Extraction assistée par ultrasons

Cette technique est apparue en 1950, avec des équipements détaillés de laboratoire. Elle représente une adaptation de l'hydrodistillation ou de l'extraction par solvant organique. En effet, la matière première est immergée dans l'eau ou dans le solvant, et dans le même temps, elle est soumise à l'action des ultrasons. Cette technique a été développée pour l'extraction de certaines molécules ayant un intérêt thérapeutique (Besombes, 2008).

b) Extraction assistée par micro-ondes

L'extraction assistée par micro-ondes est une nouvelle technique qui combine l'utilisation des micro-ondes et d'autres méthodes traditionnelles. Dans ces procédés, la matière végétale est chauffée par micro-ondes dans une enceinte clos dans laquelle la pression est réduite de manière séquentielle. Les composés volatils sont entraînés par la vapeur d'eau

formée à partir de l'eau propre à la plante. Ils sont ensuite récupérés à l'aide de procédés classiques comme la condensation, le refroidissement, et la décantation. Des études démontrent que cette technique possède plusieurs avantages tels que le gain de temps d'extraction, l'utilisation de petites quantités de solvant, et un rendement d'extraction élevé (**Hemwimonet *al.*, 2007**).

c) Extraction par fluide supercritique

L'extraction par fluide supercritique (SFE) est une technique alternative dont le but est à la fois de réduire l'utilisation de solvants organiques et d'augmenter le rendement d'extraction. Le point critique d'une substance pure est défini comme le plus haut point de température et de pression au-dessus duquel la substance est à l'état d'équilibre liquide-vapeur. Au-dessus de ce point, un fluide se forme et cet état est appelé l'état supercritique. Ainsi le fluide supercritique possède les caractéristiques à la fois du gaz et du liquide. Le fluide supercritique peut dissoudre une large variété de composés organiques et son pouvoir de solvant peut être modifié autour du point critique en faisant varier légèrement la température ou la pression. Ce fluide possède des propriétés supérieures de transfert de masse en vertu de sa faible viscosité, sa faible tension de surface et son fort coefficient de diffusion. Il peut pénétrer les micropores des matériaux (**Wanget Weller, 2006**).

d) Extraction assistée par induction électromagnétique

La part d'électricité entrant dans la consommation totale nette de l'énergie des industries chimiques est de 42%, celle-ci est utilisée essentiellement pour la force motrice et pour l'électrolyse aqueuse. D'une manière générale, l'industrie chimique évoluera d'autant plus vers les solutions électriques qu'elle trouvera :

- Des techniques fiables, donc des frais d'entretien réduits.
- Une finesse de régulation.
- Des effets positifs sur l'environnement.
- Des adaptations simples pour les procédés déjà en place (**Lucas, 1996**).

Dans ces sens, la conquête de nouveaux marchés a lancé l'induction dans des secteurs nouveaux et, en particulier, vers la chimie et vers le grand public. Grâce à l'apparition de composants de commutation plus rapides, des utilisations à plus haute fréquence ont pu être développées pour des matériaux non métalliques. Ces dernières années ont donc vu émerger des applications nouvelles présentant un fort caractère innovant (**Gérard, 2000**).

Le chauffage par induction est une technique électrothermique permettant de chauffer des matériaux conducteurs d'électricité, sans contact matériel avec une source électrique (**Facheet *al.*, 1995**).

Chapitre
II Microorganism
es
phytopathogènes étudiés

II.1. Les Bactéries phytopathogènes

Les bactéries constituent une division taxonomique regroupant les procaryotes pourvus d'une paroi, partiellement formée de peptidoglycane. On rencontre les bactéries Gram négatif (Gramicutes) et les bactéries Gram positif (Firmacutes) (Semal, 1996).

La plupart des bactéries phytopathogènes *sensu stricto* se développent rapidement sur des milieux de cultures simples, couramment utilisés en microbiologie et leur isolement à partir de tissus végétaux est dès lors aisé. Un certain nombre cependant (dysphagobactéries), nécessitent des milieux très complexes pour croître *in vitro* tandis que dans la plante-hôte, leur développement est généralement limité à l'aurole ou au xylème. Des interactions entre bactéries et végétaux sont établies tout au long de l'évolution et ont mis en place des mécanismes relationnels complexes pouvant aboutir à la pathogénèse (Semal, 1996).

II.1.1. Symptômes provoqués par les bactéries phytopathogènes

Les symptômes provoqués par les bactéries phytopathogènes sont très variés : on connaît des trachéobactérioses, homologues des trachéomycoses, mais pour lesquelles le site infectieux initial peut être plus varié : infection racinaire, comme pour Fusarioses vasculaires ou Verticillioses (ex. : *Pseudomonas solanacearum*), mais aussi transmission par la graine ou les blessures de tiges ou pétioles (ex. : *Corynebacterium michiganense*), transmission par Coléoptères (ex. : *Erwinia tracheiphila*), ou réabsorption par les hydatsodes des gouttes d'eau exsudées au bord des feuilles. Dans ce cas l'infection est descendante et, après l'apparition de lésions en forme de V à la marge des feuilles, on peut avoir migration dans les pétioles et les tiges (ex. : *Xanthomonas campestris* sp. *Campestris*) (Messiaen *et al.*, 1991).

De nombreuses bactéries telles que *Pseudomonas* et *Xanthomonas* peuvent se comporter en parasites foliaires, provoquant soit des pustules noires, soit des taches d'abord « grasseuses » puis nécrotiques en leur centre, souvent entourées d'un halo vert pâle ou jaune, signe de l'émission d'une toxine. Les bactéries provoquant des taches foliaires sont le plus souvent véhiculées d'une feuille à l'autre par le choc et le jaillissement de grosses gouttes d'eau (pluie ou aspersion) qui les font pénétrer dans les chambres sous-stomatiques.

La transmission par graine est fréquente, les bactéries peuvent contaminer seulement les germes, ou envahir les cotylédons. À la germination on peut observer, soit

de lésions sur les plantules, ou seulement un envahissement épiphyte discret des jeunes plantes, jusqu'à un stade sensible survenant plus tardivement (Messiaen *et al.*, 1991).

II.1.2. Les phases d'infection

Pour bénéficier des éléments nutritifs nécessaires à la croissance, les champignons parasites vont se heurter à des barrières physiques efficaces de la plante : la cuticule foliaire, l'écorce des tiges et des racines ou les parois cellulaires. Peu de champignons exercent une action mécanique suffisante pour franchir ces obstacles ; ils pénètrent alors par les ouvertures naturelles (exemple, stomates), ou les blessures, ou après la digestion des structures de surface. Pour coloniser et détruire la plante, ils déploient des armes chimiques très variées parmi lesquelles, les enzymes, les toxines, les hormones et les polysaccharides représentent un arsenal dont l'importance dans la pathogénie varie cependant d'un parasite et d'une plante à l'autre (Strange, 2003; Duhoux et Nicole, 2004).

II.1.3. Caractéristiques des souches bactériennes utilisées

a) *Erwinia amylovora*

Le genre *Erwinia*, fait partie de la famille des *Enterobacteriaceae* qui regroupe les bactéries pathogènes d'animaux, d'insectes ou de plantes (Cornelissen et Harvey, 2012). Ces sont des bactéries à Gram négatif, anaérobies facultatifs, mobiles grâce à des flagelles péritriches (Sharma, 2005).

Erwinia amylovora est une espèce phytopathogène très importante en Algérie, qui provoque chez les plantes des nécroses sèches et des flétrissements ; elles ne produisent ni enzymespectolytiques, ni pigments jaunes (Semal, 1996). C'est la première bactérie identifiée comme responsable d'une maladie chez les plantes. Elle fait partie de l'embranchement des Proteobactérie, la classe des Gamma Proteobactérie, l'ordre des *Enterobacteriales* et la famille des *Enterobacteriaceae* (Julie, 2000). Elle est responsable du feu bactérien, cette maladie tire son nom car l'infection par la bactérie provoque une brûlure et un dessèchement des arbres comme si elles avaient été brûlées par le feu (Abigaïlet Salyers, 2005).

b) *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*

Cette bactérie provoque des nécroses plus ou moins étendues sur les feuilles et les tiges. On la trouve abondamment en Algérie en tant qu'épiphyte, mais elle peut également être pathogène, infectant ses hôtes à l'occasion de blessures ou viades fleurs, lorsque les

conditions climatiques sont froides et humides. Sa gamme d'hôte est très large et les symptômes qu'elle induit sont variés. Sur les arbres fruitiers à noyaux (cerisiers, pruniers, pêchers, abricotiers), elle induit, sur tige et sur tronc, des chancres souvent associés à une exsudation de gomme et qui peuvent causer le dépérissement et la mort de l'arbre. Sur les feuilles, les symptômes de la bactérie apparaissent sous forme de perforations caractéristiques. Cette maladie se transmet notamment par les blessures et peut donc facilement se propager par la taille chez les jeunes arbres, si les précautions ne sont pas prises pour désinfecter les outils (**Semal, 1996**).

c) *Pseudomonas syringae* pv. *Savastanoi*

Ce pathovar induit des galles parenchymateuses sur plusieurs espèces d'*Oleaceae* dont l'olivier. Son mode d'action est associé à la synthèse, par la bactérie, d'une hormone végétale : l'acide indole-acétique (**Semal, 1996**).

Pseudomonas syringae pv. *savastanoi* est considéré comme le seul pathogène responsable de la formation des nécroses bactériennes des oliviers (**Bradbury, 1986**). Cette maladie bactérienne est pratiquement répandue dans tout le bassin Méditerranéen (**Zohary et Spiegel-Roy, 1975**). En France et en Afrique du Nord on lui donne le nom de tuberculose ou chancre bactérien de l'olivier.

La bactérie pénètre dans les tissus du végétal à l'occasion d'une blessure provoquée par le gel, l'impact des grêlons, le gaulage des fruits ou tout simplement les plaies de taille. Cette maladie, très contagieuse sur certaines variétés, peut être également transmise par les techniques de multiplication (greffage, bouturage) à partir de rameaux provenant d'arbres contaminés (**Quesada et al., 2008 ; Young, 2004**).

L'attaque commence timidement sur les brindilles des rameaux et n'épargne pas les charpentes et le tronc. Elle se manifeste par des tumeurs parenchymateuses à forme irrégulière, de couleur verte au début et à surface lisse. Le diamètre de ces tumeurs augmente au fur et à mesure de l'évolution de l'attaque et les fissures deviennent irrégulières. Ensuite, on assiste au brunissement de la surface de ces tumeurs. Cette prolifération cellulaire anarchique traduit la synthèse par les bactéries de l'AIA (acide indole acétique) (**Senhaji, 1999**).

L'impact de la maladie se traduit sous divers aspects :

- Perte de feuilles des brindilles du fait de l'étranglement et de l'anthracnose ;
- Dessèchement du bois par suite d'une photosynthèse défaillante ;
- Réduction de production ;
- Dans une phase ultérieure, réduction même de la taille des arbres par suite d'une végétation désordonnée.

C'est le mucus bactérien qui, en s'écoulant de tumeurs d'arbres malades, propage la maladie en oliveraie. Quels que soient les modes de transmission, l'inoculum provoque l'hyperplasie des tissus de l'hôte, qui se manifeste par l'apparition de tumeurs d'abord sur les jeunes brindilles, puis sur les rameaux et parfois sur les feuilles et les fruits (Surico *et al.*, 1985; Young *et al.*, 2004). Suivant la sévérité de l'attaque, les tumeurs bactériennes peuvent être plus ou moins développées et plus ou moins généralisées sur l'arbre. Il n'y a pas de doute qu'un olivier sévèrement touché par la maladie, voit sa vigueur diminuer, ce qui se traduit par une réduction de la fructification (Hallet *et al.*, 2004; Schroth *et al.*, 2006).

d) *Pectobacterium* sp.

Les bactéries du genre *Pectobacterium*, provoquent des symptômes associés à des maladies de la plante caractérisées par les pourritures molles (Helias, 2008).

La pourriture molle est l'unique symptôme observé au cours de la conservation des tubercules de pomme de terre, dont le développement dépend de la température d'incubation. Sur tubercule, la pourriture molle commence à partir du stolon et se développe jusqu'à une désintégration totale. La capacité de germination du tubercule est altérée. La pourriture peut également se développer à partir de sclérotices hébergeant le pathogène (Lapwood et Hering, 1968; Pérombelon, 1974; Scott *et al.*, 1996) ou à partir de blessures du tubercule envahies par le pathogène (De Boer et Kelman 1975; De Boer 1994).

Le facteur le plus important qui favorise le développement de la jambe noire, est le niveau de l'eau de précipitation et/ou d'irrigation qui entraîne les conditions anaérobies dans les tubercules mères, favorisant la multiplication des bactéries et l'apparition de la pourriture et par la suite de la jambe noire (Pérombelon *et al.*, 1989; Pérombelon, 2002).

aspect vitreux, brunit, se décompose progressivement, et finit par devenir plus ou moins creuse. Dans certaines situations particulièrement favorables, l'écorce de la tige peut être également affectée, révélant alors localement une tache brune à noire (**Blancard, 2009**).

II.2. Les champignons phytopathogènes

Les champignons ou mycètes sont des organismes eucaryotes. Leur paroi est composée principalement d'une substance appelée chitine. Le règne des mycètes renferme des organismes unicellulaires composés de levures et d'organismes pluricellulaires dont les plus typiques sont les moisissures qui forment des masses visibles appelées mycélium, constitués de longs filaments (hyphes) ramifiés et entrelacés (**Tortora, 2003**).

➤ Caractéristiques des souches fongiques utilisées

a) *Sclerotinia* sp.

Les *Sclerotinia* appartiennent aux Héliotiacées. Peu fréquent en plein champ, comme sous abri. Ses symptômes sur la plante se localisent au hasard sur la tige, à partir de blessures et surtout les autres organes aériens. C'est un mycélium cotonneux blanc, portant des scléroties plus ou moins grosses en fonction de l'espèce de *Sclerotinia*. Ces scléroties peuvent germer soit par voie mycélienne, soit en donnant une apothécie en forme de trompette.

Ce champignon est responsable de l'altération humide, marron foncé à brune, couverte parfois d'un feutrage cotonneux blanc et de grosses scléroties noires assez régulières, et les plantes finissent par flétrir et se desséchées (**Blancard, 2009**).

b) *Fusarium* sp.

Les *Fusarium* sp. phytopathogènes ont d'importance économique liée à leur rôle en pathologie végétale. Producteurs de nombreux métabolites (**Armstrong et Armstrong, 1981 ; McLean, 1996**).

Le champignon induit la pourriture du système racinaire: le cylindre central et le cortex des racines brunissent puis se désagrègent. Des jaunissements unilatéraux des folioles et des feuilles apparaissent à la base de la plante. Le collet peut présenter un chancre recouvert d'un mucus rose saumon (fructification sporifères). Le système

racinaire des plantes malades présente une réduction des ramifications secondaires (**Kraft et al., 1994**).

Le cycle infectieux du *Fusarium* débute par la germination des chlamydospores en présence d'une racine de plante, le filament mycélien pénètre dans la racine et se développe dans le système vasculaire. Cette pénétration est facilitée par les blessures ou par des ouvertures naturelles du système racinaire.

Ils peuvent être responsables de fontes de semis, de pourritures de racines et du collet, ou de maladies vasculaires. La plupart vivent dans le sol; ils parasitent de nombreuses variétés de plantes, en particulier des céréales. Certaines espèces sont productrices de toxines potentiellement pathogènes pour l'homme et les animaux (**Hennequin et Lavarde, 2006**).

Ces champignons se développent sur milieu PDA (Potato-Dextrose-Agar). Leur température optimale de croissance est comprise entre 22 et 37°C (**Chermette et Bussieras, 1993**).

Ils provoquent la fusariose et ils'attaquent à certains cultivars. Au départ, les symptômes sont visibles que sur une seule moitié de la surface des feuilles, des branches ou des plantes, avant de se propager à l'ensemble de la plante (**Messiaen et al., 1993**).

Lorsque la maladie est assez évoluée, une lésion humide et brune, légèrement déprimée et bien délimitée, apparaît sur la portion de la tige située au niveau du substrat ou du sol. Ce chancre a une configuration particulière lorsqu'il ceinture le collet : son développement plus important sur un côté de la tige lui confère la forme d'une flamme (**Blancard, 2009**).

Les conidies sont hyalines et variables, les macroconidies sont fusiformes pluricellulaires, les microconidies sont unicellulaires et ovales, les conidiophores sont ramifiés ethyalins (**Figure 6**) (**Barnett, 1972**).

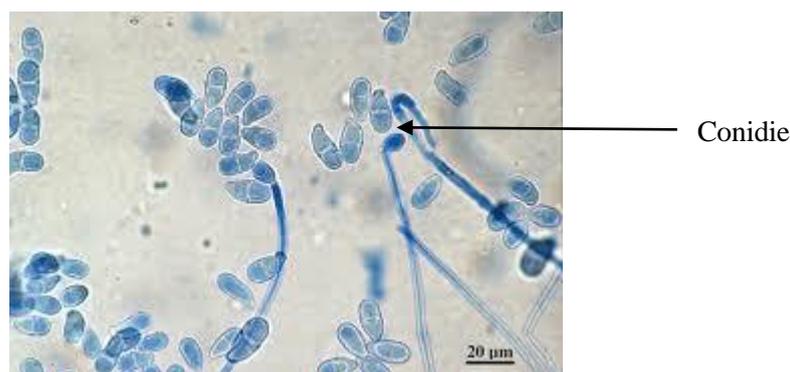


Figure 6: Conidies de *Fusarium* sp. (Barnett, 1972)

c) *Phytophthora* sp.

Ce champignon est responsable de la maladie du mildiou qui peut dévaster les cultures durant les périodes fraîches et pluvieuses. Le mildiou peut s'attaquer à tous les organes aériens de la plante. Il se manifeste par des taches nécrotiques, irrégulières, d'extension rapide, entourées d'un margeli vide. Sur les tiges on voit des plages brunes pouvant les ceinturer. Les fruits mildioués sont bruns marbrés, irrégulièrement bosselés en surface (Blancard, 1991).

C'est un agent de fonte de semis bien connu à l'origine de dégâts importants en pépinière. En plus d'empêcher les graines de germer, il s'attaque aux plantules aussi bien en pré- qu'en post-émergence. Des symptômes assez divers peuvent être constatés en fonction du stade de développement des plantules et des espèces végétales :

- Des lésions humides et brunes sur les racines, gagnant parfois le collet, entraînant leur décomposition ;
- Des altérations humides et molles apparaissant sur le collet et pouvant s'étendre sur quelque centimètres. Dans ce cas, celui-ci donne l'impression d'avoir été plus ou moins pincé. Les tissus touchés brunissent progressivement.

Quels qu'ils soient les symptômes primaires, les plantules ne tardent pas à flétrir, s'effondrer et mourir. Elles finissent par se décomposer et disparaître totalement (Blancard, 2009).

Le champignon du genre *Phytophthora* présente des sporanges en forme de citron, des sporangiophores bien différenciés ramifiés, le mycélium est non cloisonné. Les sporanges à maturité libèrent des zoospores biflagellées (Figure 7) (Jilman, 1986).

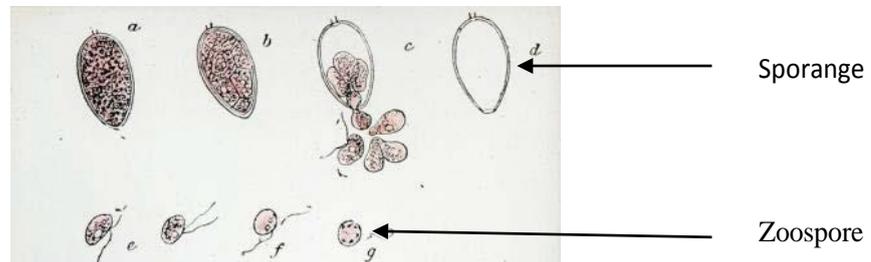


Figure 7: Sporanges et zoospores de *Phytophthora* sp. (Jilman, 1986)

d) *Alternaria* sp.

Ce champignon a longtemps été décrit comme affectant la tomate, l'aubergine, la pomme de terre, ainsi que plusieurs adventices de cette famille botanique.

Il provoque l'alternariose qui s'attaque à tous les organes aériens et à tous les stades de croissance de la plante. Il occasionne surtout, des taches foliaires vertes sombres, puis deviennent rapidement brunes à noires. Sur les tiges des taches assez comparables sont aussi constatées. Sur les fruits des taches concaves, peut se couvrir d'une moisissure noire, veloutée. Les lésions sur fruits peuvent engendrer leur chute.

Ses dégâts peuvent être conséquents si des conditions climatiques humides persistent et/ou si aucune méthode de protection n'est envisagée. Elle entraîne parfois des défoliations importantes à l'origine d'une réduction des rendements, mais aussi de nombreuses lésions sur fruits liées aux effets du soleil sur ces derniers qui sont moins protégés par le feuillage (Blancard, 2009).

Les champignons du genre *Alternaria* présentent des conidiessolitaires ou groupés, ovoïdes, cylindriques. Elles sont arrondies à la base et atténuées à leur sommet (Figure 8) (Jilman, 1986).



Figure 8: Conidies d'*Alternaria* sp. (Jilman, 1986)

e) *Trichoderma* spp.

Le terme «*Trichoderma*» a été introduit dans la mycologie en 1794 par Persoon (Bissett, 2004). En milieu terrestre, leur production d'enzymes, de substances bioactives et leur développement rapide font des *Trichoderma* sp. des agents potentiels en agroalimentaire et une matière de choix pour l'exploitation industrielle (Prieto et al., 1997).

Quelques-unes des quelques 35 espèces établies à ce jour sont d'intérêt économique, pour leur production d'enzymes cellulolytiques et utilisés comme agents de lutte biologique en raison de leur antagonisme vis-à-vis d'autres espèces fongiques (antibiose, mycoparasitisme, compétition, lyse, promotion de la plante hôte) (Kubicek et al., 2003).

Les colonies fongiques peuvent être légèrement floconneuses ou bien compactées et souffées. Entre ces deux extrêmes, existent des aspects intermédiaires. Les colonies sont colorées en fonction de la pigmentation des spores. Cinq jours après germination, la conidie donne naissance à un mycélium d'abord blanc et stérile en forme de cercle. Deux jours plus tard, une couleur verte est visible sur les parties aériennes du mycélium, correspondant à la conidiogénèse. D'autres cercles concentriques réguliers se forment par la suite, et entre le 16^{ème} et le 20^{ème} jour, un feutrage épais se superpose à la culture. Au microscope optique on peut observer un mycélium composé d'hyphe jaunes, septées, ramifiées à parois lisses (Figure 9) (Kubicek et al., 2003).

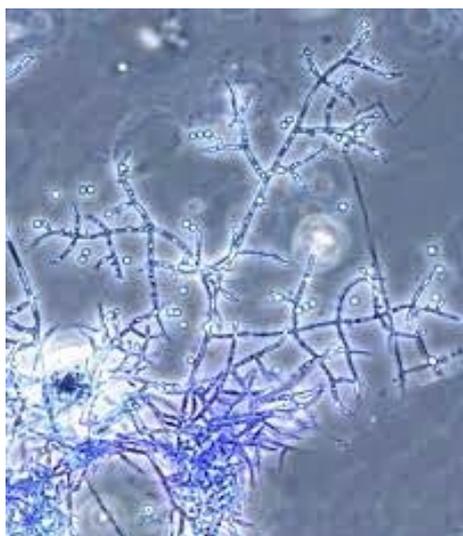


Figure 9 : Conidiophores de *Trichoderma* sp.
(Kubicek *et al.*, 2003)

f) *Botrytis* sp.

Fréquent sur légume sous abris et en plein champ lorsque les conditions climatiques sont humides. Sur folioles, il occasionne des lésions situées à l'intérieur du limbe, plus fréquemment à la périphérie et son extrémité. Celles-ci sont brunes et humides en début d'évolution, deviennent rapidement nécrotiques et prennent une coloration beige à brunâtre. Une fois qu'il a envahi un tissu, il fructifie très rapidement sous la forme d'une moisissure grise plus ou moins dense constituée de nombreux conidiophores et conidies ; la transmission par contact d'un organe malade à un organe sain s'effectue ainsi très aisément.

C'est une moisissure grise constituée de nombreux conidiophores ramifiés portant des conidies poudreuses (**Figure 10**) (**Blancard, 2009**). Les conidies sont globuleuses, le mycélium grimpant, ramifié, cloisonné (**Barnett, 1972**)

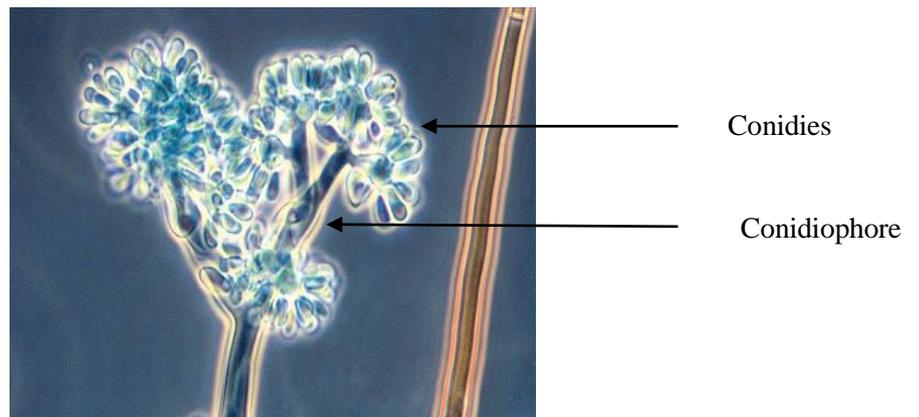


Figure 10 : Conidies de *Botrytis* sp.
(Barnett, 1972)

g) *Penicillium* spp.

Plusieurs espèces de *Penicillium* sont signalées sur les fruits, occasionnant des dégâts aussi bien en cours de culture qu'après récolte. Elles sont responsables de lésions molles, humides et sombres, qui peuvent se développer soit à partir de la zone d'implantation du pédoncule soit ailleurs sur le fruit, au niveau d'une blessure. Les tissus lésés recouvrent progressivement de coussinets sporifères dont la teinte peut varier en fonction de l'espèce présente et du degré d'évolution des fructifications (bleu, gris, vert...) (Blancard, 2009).

Les conidies sont unicellulaires, hyalines, de forme et de taille variables, ovoïdes, cylindriques, produites en chaîne sur des phialides conidiophores à l'aspect ramifié terminé par des phialides (Figure 11) (Jilman, 1986)

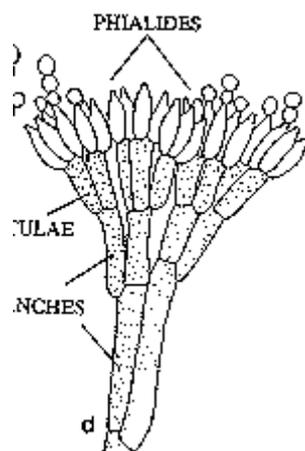


Figure 11: Conidies de *Penicillium* sp.

h) *Cladosporium* sp.

Cemycète, parasite essentiellement foliaire, provoque des dégâts sérieux sur melon et courgette. La cladosporiose est caractérisée par des taches foliaires qui sont d'abord vitreuses puis nécrotiques de quelques millimètres de diamètre à bordure jaune. La sporulation sur les feuilles est très faible. Les tissus situés au centre des taches brunissent, se nécrosent et se dessèchent tandis que les feuilles s'enroulent. La tige peut aussi être affectée (Blancard, 2009). Les conidies sont en chaînes ramifiées, unicellulaires ou pluricellulaires de forme variable, ovoïde, cylindrique et irrégulière (Figure 12) (Barnett, 1972).

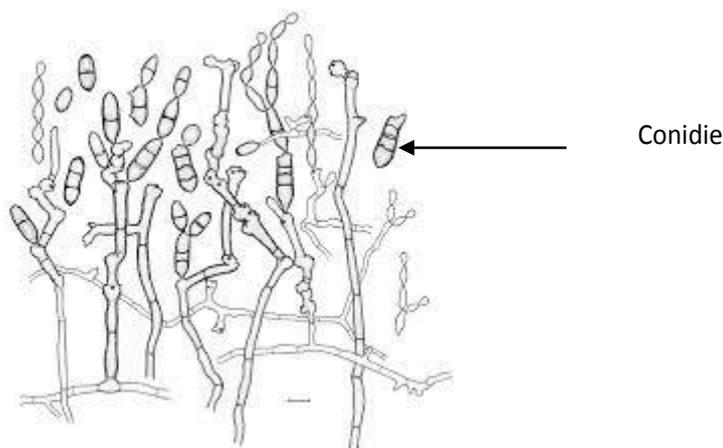


Figure 12: Conidies de *Cladosporium* sp.

i) *Rhizoctonia solani*

Présent dans de nombreux sols et dans certains substrats, responsable de fontes de semis et d'altérations racinaires, *Rhizoctonia solani* est capable de s'attaquer au collet de la tomate. Sur ce dernier, il occasionne des lésions apparaissant soit après plantation, soit plus tard sur des plantes produites dans des conditions défavorables. D'abord humides, brunâtres, parfois brun rougeâtre, leur contour est bien délimité. À terme, ces chancres peuvent ceinturer la base de la tige et prennent souvent une apparence plutôt sèche. Bien souvent, ces dégâts s'étendent aussi à la partie supérieure du système racinaire. C'est un mycélium cloisonné, hyalin à brun, présentant une constriction à un niveau de ses ramifications, cheminant à la surface des tissus (Figure 13) (Blancard, 2009).

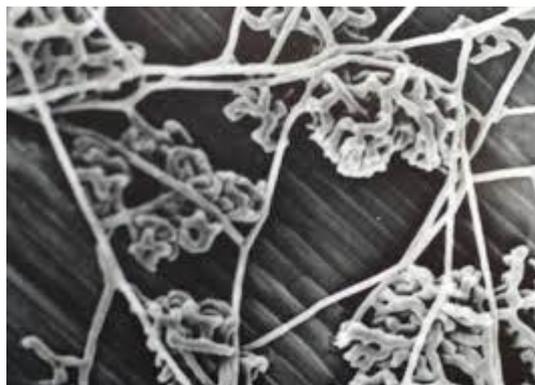


Figure 13: Mycélium de *Rhizoctonia solani* (Blancard, 2009)

J) *Helminthosporium* sp.

Il provoque la maladie de l'helminthosporiose du blé. C'est une maladie rare du blé tendre. On la rencontre principalement sur les variétés sensibles en non-labour en précédent blé tendre.

Ses symptômes s'observent durant la montaison jusqu'à la maturité. L'helminthosporiose progresse du bas vers le haut de la plante. Sur les feuilles on observe des taches ocellées en forme d'œil plutôt qu'un oïde. Souvent entourées d'un halo chlorotique jaune. Le point noir au centre est le point d'infection. Il est remplacé progressivement par un point foncé puis un cercle brun. L'helminthosporiose du blé peut être confondue avec des taches physiologiques qui présentent des décolorations claires à nécrotiques.

Il est possible d'observer les conidiophores portant les spores (conidies) dans le tissu nécrosé sur la face supérieure de la tache. L'observation est réalisée avec une loupe binoculaire après avoir placé quelques feuilles présentant des symptômes dans une bouteille en plastique contenant un peu d'eau pendant 24 à 48 h à T° ambiante. Les conidies de *Helminthosporium* sp. sont pluricellulaires (cloisonnées transversales) (**Figure 14**), allongées ou cylindriques, les conidiophores sont dressés droits, cloisonnés de couleur foncée (**Barnett, 1972**).

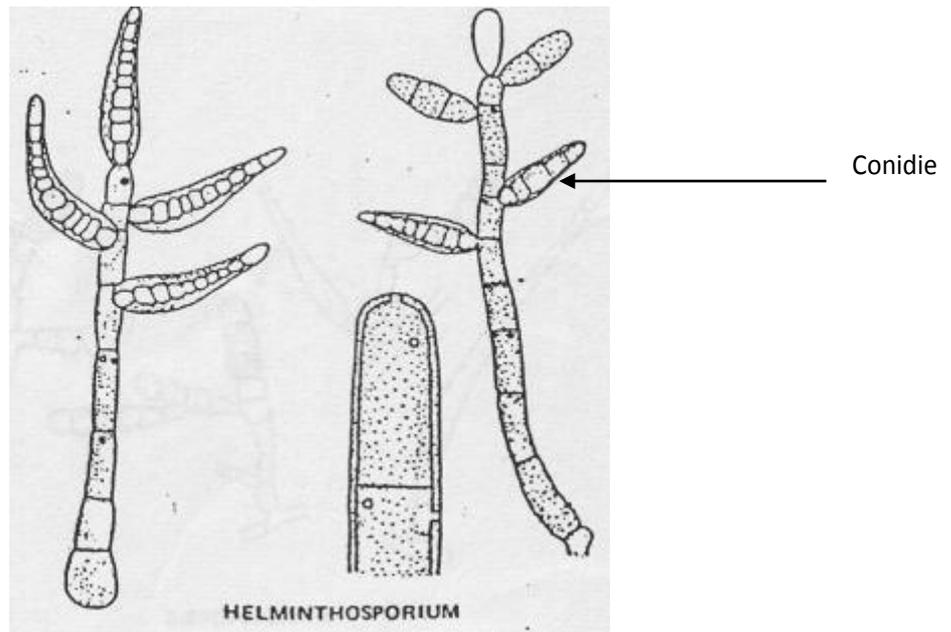


Figure 14: Conidies d'*Helminthosporium* sp. (Barnett, 1972)

Chapitre
III Lutte biologique

III.1. Lutte biologique

Ces dernières décennies, la protection de l'environnement s'est imposée de plus en plus comme une préoccupation mondiale majeure. La méthode classique de lutte biologique par utilisation de micro-organismes, de prédateurs, de parasitoïdes et de substances naturelles d'origine végétale, les industries agrochimiques orientent de plus en plus leurs efforts vers l'étude de produits naturels pour la recherche de nouveaux insecticides (**Sarnimancho et Cheynier, 2006**).

III.2. Les métabolites secondaires et les interactions plante-bioagresseurs

Polysaccharides, protéines, lipides et acides nucléiques représentent une source fondamentale pour le maintien de la vitalité de l'organisme. Ils sont connus sous le nom de métabolites primaires. Ces substances sont utilisées *in vivo* par les cellules pour assurer plusieurs fonctions et comprennent la biogenèse de métabolites secondaires tels que les polyphénols, les alcaloïdes, les terpènes, les pigments, ... etc. Les métabolites secondaires sont synthétisés à un niveau de plantes et d'organismes vivants par catalyse enzymatique de métabolites primaires (**Croteau et al., 2000**).

La majorité de ces substances secondaires sont dotées de multiples rôles dont la protection de la plante. D'autres études ont montré leurs intérêts pharmacologiques pour la santé humaine.

Parmi les métabolites secondaires on peut citer les huiles essentielles, les alcaloïdes, les tannins, les flavonoïdes, les anthocyanes, ... etc. (**Martinet Andriantsitohaina, 2002**).

Les plantes montrent une variabilité remarquable dans leurs relations avec les microbes, allant de l'interaction avec des microorganismes endophytes non-pathogènes présents dans des tissus spécialisés, jusqu'aux microorganismes extracellulaires habitant les surfaces de la plante (phyllosphère/rhizosphère) (**Gray and Smith, 2005**). De plus, les plantes modifient continuellement leur habitat environnant par les exsudats phytochimiques qui sélectionnent et régulent les populations microbiennes par exemple, augmenter la population de microorganismes bénéfiques et dissuader les pathogènes (**Gordon-Weeks et Pickett, 2009**).

Pour bien gérer avec succès ces différents types d'interactions avec les microorganismes, les plantes ont développé diverses stratégies pour l'utilisation de leurs produits naturels. Premièrement, les produits phytochimiques peuvent être produits

localement en réponse à une infection microbienne, qui peut se reproduire dans plusieurs interactions plante-pathogène. Les substances phytochimiques peuvent être constitutivement produites et stockées dans des cellules spécifiques. Les plantes peuvent aussi synthétiser certains produits dans des cellules spécialisées et les transporter sur le site d'action. Finalement, les substances phytochimiques peuvent se libérer à l'extérieur du corps de la plante par les graines en germination (Nelson, 2004), des racines en croissance (Bais *et al.*, 2006), des cellules du cortex racinaire (Hawes *et al.*, 2000), et aussi des feuilles (Baldwin *et al.*, 2006).

III.3. Les métabolites secondaires et les réactions de défense

L'exploitation des produits naturels nécessite la connaissance de la façon dont ces molécules exercent leurs effets, et suit souvent une compréhension du rôle du métabolite dans l'organisme producteur. Chez les plantes, les métabolites secondaires les mieux compris sont ceux impliqués dans la défense contre les agents pathogènes ou dans la détection et la signalisation (Morissey, 2009).

Les plantes ont développé des mécanismes sophistiqués de protection contre les agents pathogènes, avec une origine chimique, une des armes clés de l'arsenal de défense des plantes (Madden et Wheelis, 2003; Maoret Shirasu, 2005; Field *et al.*, 2006). Ils agissent notamment par le renforcement mécanique de la paroi cellulaire par le dépôt de callose et de la lignine (Develey - Rivière et Galiana, 2007), la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) (Appel et Hirt, 2004), par des protéines liées à la pathogénicité, des composés antimicrobiens préformés ou inductibles (Malek *et al.*, 2000).

Les molécules de défense peuvent être préformées soit dans les tissus ou synthétisées en réponse à une attaque pathogène, des distinctions mènent aux termes phytoanticipants et phytoalexines, respectivement. Bien que des milliers de différentes entités moléculaires soient censées jouer un rôle de défense contre les phytopathogènes bactériens et fongiques, le mode d'action seules fait l'objet d'études détaillées (Morissey, 2009).

III.4. Activité antimicrobienne des composés naturels des plantes

Des milliers de composés produits par les plantes sont impliqués dans la défense. La diversité phytochimique des composés antimicrobiens comprend : les stéroïdes, les

saponines, les phénols et phenylpropanoïdes, pterocarpans, stilbenes, alcaloïdes, glucosinolates, hydrogène cyanide, terpénoids, indole et aussi le soufre élémentaire, le seul composé inorganique. L'identification des sites et des mécanismes d'action est nécessaire pour comprendre, si ces composés antimicrobiens ont juste une réponse à l'infection ou sont des déterminants de la résistance (**Hammerschmidt, 1999**).

III.5. Méthodes d'évaluation de l'activité antimicrobienne

L'examen des données bibliographiques fait apparaître d'emblée la diversité des méthodes utilisées pour mettre en évidence l'activité antimicrobienne des extraits végétaux. L'insolubilité des huiles essentielles dans l'eau et d'une manière générale dans les milieux aqueux largement utilisés en microbiologie, est une explication de la variété de techniques. Selon la souche microbienne, l'huile essentielle et l'application choisie, divers milieux de culture peuvent être mis en œuvre. Les différents protocoles peuvent ainsi être classés :

- Selon le milieu dans lequel se fait la diffusion de l'huile essentielle, soit liquide, solide ou gazeux.
- Selon la nature du contact de l'huile essentielle avec le germe : diffusion sur disque, solution alcoolique ou dispersion dans un émulsionnant.

Ces différentes techniques sont répertoriées et décrites dans la thèse de doctorat de **Billerbecken 2000**, ainsi que dans différentes publications (**Smith et Navilliat, 1997**; **Mann C. Met Markham J.L., 1998**; **Lahlou. M., 2004**).

III.5.1. Aromatogramme

L'aromatogramme est une méthode de mesure *in vitro* du pouvoir antimicrobien des extraits végétaux. Cet examen est donc l'équivalent d'un antibiogramme où les antibiotiques sont remplacés par des huiles essentielles (**Fauchere, 1997**). La technique consiste à utiliser les disques de papier imprégnés de différents produits à tester. Les disques sont déposés à la surface d'une gélose uniformément ensemencée avec une suspension de germes à étudier (**Figure 15**). Après incubation, les colonies se développent à la surface de la gélose laissant des zones vierges autour des disques appelées zones d'inhibition. Plus le diamètre de cette zone est grand, plus la souche est sensible à la substance testée, plus elle est petite, plus le germe en question est résistant. On peut exprimer cette activité soit en indiquant directement le diamètre de la zone d'inhibition en millimètre, soit en traduisant en croix le degré d'activité (**Guerinet Carret, 1999**).

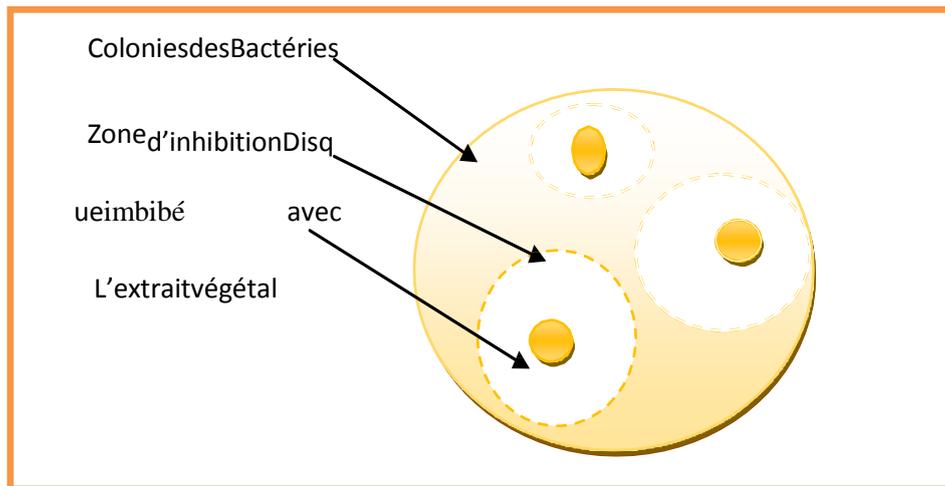


Figure 15: Illustration de la méthode des aromagrammes sur boîte de Pétri (Guerinet Carret, 1999).

III.5.2. Microatmosphères

Dérivée de la méthode précédente, le protocole des microatmosphères est techniquement proche de celui des aromagrammes. La différence réside principalement dans la position du disque imprégné. Dans cette technique, le disque imprégné est déposé au centre du couvercle de la boîte de Pétri, renversée pendant la durée de l'expérience. Celui-ci n'est donc plus en contact avec le milieu gélosé (Figure 16).

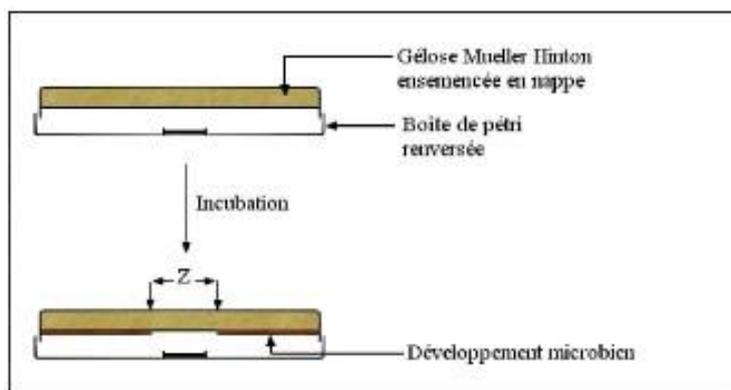


Figure 16: Illustration de la méthode des microatmosphères (Zaika, 1988).

Cette technique est utilisée dont le but est d'exploiter les propriétés de la phase volatile des huiles essentielles. Cette méthode est rarement citée car les auteurs qui s'y sont penchés spécifiquement sur l'activité de la phase gazeuse ont encore peu nombreux (Sarbach, 1962; Didryet *al.*, 1993; Billerbeck, 2000).

III.5.3. Méthode de diffusion en puits

Cette méthode assure une diffusion radiale de l'extrait végétal à partir d'un puits en donnant une zone d'inhibition claire facilement mesurable. La méthode consiste à découper un trou circulaire dans l'agelose et y verser une solution de l'extrait végétal de concentration connue. L'extrait diffuse radialement en donnant une zone d'inhibition circulaire à la surface de l'agelose préalablement ensemencée avec une suspension de germes (Eymard, 2003).

III.5.4. Méthode de dilution

Les extraits végétaux à tester peuvent également être directement mélangés en concentration comme un milieu de culture, qu'il soit solide ou liquide (exige la dispersion homogène par un émulsifiant). Le milieu est ensuite inoculé à un taux déterminé de microorganismes, après incubation, on note la présence ou l'absence de culture. La lecture peut être visuelle ou à l'aide d'un spectrophotomètre, le degré d'inhibition est en rapport avec la turbidité du milieu (Robert-Demuet, 1995).

III.6. Détermination de l'effet bactériostatique ou bactéricide

La détermination de l'effet bactéricide ou bactériostatique d'un extrait végétal est réalisée en procédant à un repiquage des zones d'inhibition formées et ne présentant aucun croissancement microbien visible à l'œil nu sur milieu de culture. S'il y a croissancement microbien, l'extrait végétal a un effet bactériostatique sur la souche testée. Si au contraire, il y a absence de croissancement microbien, l'extrait végétal a un effet bactéricide vis-à-vis de cette souche. La CMI est définie comme étant la plus basse concentration capable d'empêcher un croissancement microbien visible. La CMI n'est pas totalement bactéricide et une partie de l'inoculum est capable de se développer après disparition du composé inhibiteur (Mannet Markham, 1998). La CMB est la plus basse concentration de l'agent inhibiteur ne laissant subsister que 0,01% ou moins de survivants de l'inoculum initial après 18 heures de culture à 37°C. Cette valeur caractérise l'effet bactéricide de l'extrait végétal (Haddouchi et al., 2009).

Chapitre
IV Matériel
et méthodes

Notre étude expérimentale a été réalisée au sein du laboratoire des projets de fin d'étude du département de biologie, Faculté des sciences de la nature et de la vie à l'Université de Blida 1, et au laboratoire de bactériologie de l'Institut National de Protection des Végétaux (INPV) d'El Harrach à Alger.

IV.1. Matériel biologique

➤ Matériel végétal

L'étude a été réalisée sur la partie aérienne (Tiges, feuilles et fleurs) de l'espèce *Rosmarinus officinalis* L.

La récolte de notre plante a été effectuée au niveau de l'Université de Blida 1 pendant la période de floraison (Mars 2014), les différentes récoltes sont effectuées le matin au cours de la même semaine.

L'identification du matériel végétal a été faite au niveau du laboratoire de Botanique au département de Biotechnologie à l'Université de Blida 1.

➤ Matériel microbiologique

Quatre bactéries

: *Erwinia amylovora*, *Pseudomonas syringae syringae*, *Pseudomonas syringae savastanoi*, *Pectobacterium carotovorum* et dix champignons

: *Sclerotinia* sp., *Fusarium* sp., *Phytophthora* sp., *Alternaria* sp., *Trichoderma* sp., *Botrytis* sp., *Penicillium* sp., *Cladosporium* sp., *Rhizoctonia solani*, *Helminthosporium* sp., ont été choisis par leurs fréquences élevées. Elles sont fréquemment rencontrées sur les plantes cultivées en Algérie.

Ces sont des agents bactériens et cryptogamiques.

Les souches bactériennes proviennent du laboratoire de Phytobactériologie de l'INPV, elles sont entretenues par repiquages sur gélose nutritive (King B. annexe) favorable à leur croissance pendant 24h à l'obscurité à 28-30°C.

Les dix champignons proviennent du laboratoire de mycologie du département de Biotechnologie, ils sont cultivés sur un milieu nutritif (PDA. Annexe) pendant 7 jours à 25°C à l'obscurité.

IV.2. Méthodes

IV.2.1. Préparation de l'échantillon végétal

➤ Le séchage

La partie aérienne de notre plante a été séchée à l'air libre, à température ambiante et à l'abri de la lumière pendant deux semaines.

➤ Le broyage

Afin d'augmenter la surface de contact solvant-échantillon et d'optimiser ainsi l'extraction des substances bioactives, notre plante a été broyée dans un broyeur électrique type Waring: Commercial-Blender.

➤ La conservation

La poudre de notre plante a été conservée dans des boîtes en verre, à température ambiante et à l'abri de la lumière et de l'humidité.

IV.2.2. Extraction

Des étapes supplémentaires de purification des échantillons peuvent être nécessaires en vue d'éliminer les résidus de solvants, les graisses, les stérols et la chlorophylle (**Muanda, 2010**). Pour cela, nous avons effectué une extraction par solvant en utilisant l'éther de pétrole afin d'éliminer les graisses.

Le méthanol est fréquemment employé pour l'extraction des composés phénoliques (**Falleh et al., 2008**). C'est la raison pour laquelle nous avons opté pour l'extraction des polyphénols totaux de notre plante, par l'utilisation de méthanol comme solvant d'extraction.

La procédure suivie est celle décrite par **Owen et al. (1999)** avec quelques modifications.

Le principe de cette méthode repose sur l'extraction solide-liquide qui est une opération de séparation qui consiste à extraire un constituant solide d'une matrice qui en comporte plusieurs, en le transférant sélectivement vers une phase liquide.

Nous avons utilisé pour la méthode d'extraction par Soxhlet, pour extraire une quantité plus importante de poudre sèche de notre espèce de *Rosmarinus officinalis* L. L'extracteur Soxhlet permet le traitement des solides (matériel végétal) en plus grande quantité que la macération, avec des solvants en phase liquide ou partiellement vaporisés.

IV.2.2.1. . Extraction à chaud par Soxhlet

L'extracteur Soxhlet est un appareil spécifique conçu pour l'extraction continue solide-liquide. Le solvant (à raison de 100 ml pour 10 g d'échantillon solide à extraire) est porté à ébullition. Ensuite, les vapeurs sont condensées à l'intérieur de l'extracteur contenant le solide à extraire dans une cartouche de papier épais.

Le contact entre le solvant et le produit à extraire dure pendant l'accumulation du solvant dans le réservoir, puis quand le solvant atteint un certain niveau, il amorce le siphon et retourne dans le ballon en entraînant les substances dissoutes. Ce cycle peut être répété plusieurs fois jusqu'à l'épuisement complet du solide (Tyler et al., 1881).

➤ Mode opératoire

Le montage comporte une plaque chauffante, un ballon de 500 ml à col rodé et à fond plat, dans lequel le solvant est chauffé jusqu'à environ 64,9°C (température d'ébullition de méthanol), un réfrigérant qui condense les vapeurs et un extracteur de 250 ml à l'intérieur duquel on a introduit, dans une cartouche poreuse, la poudre végétale à extraire et où tombe le solvant condensé par le réfrigérant. Un siphon permet de vider périodiquement l'extracteur de la solution obtenue. La solution retombe alors dans le ballon où se concentrent les extraits (Figure 17).

Par ce procédé, la poudre végétale est successivement épuisée à l'aide du méthanol. L'extrait brut issu de l'extraction précédente a été soumis à une double filtration, puis concentré à l'évaporateur rotatif et enfin séché à température ambiante.

Le résidu sec obtenu a été pesé pour déterminer son rendement et conservé au frais, dans un flacon sombre bien fermé.

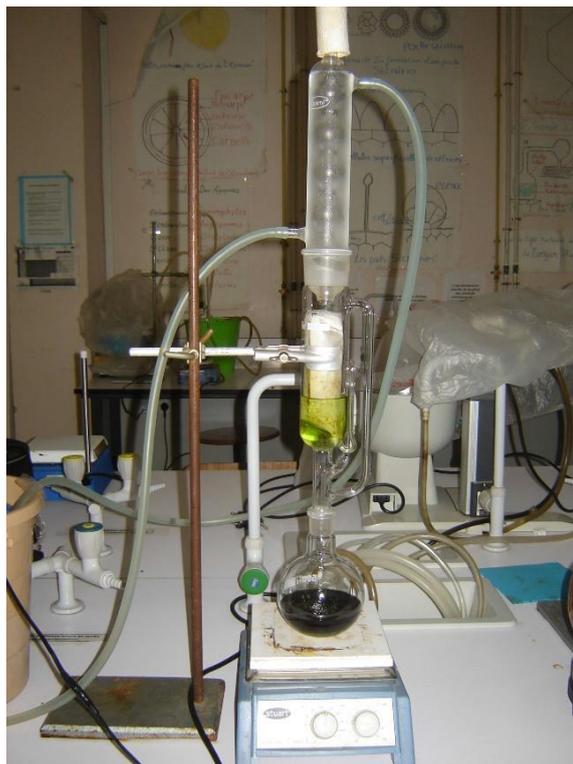


Figure 17: Dispositif d'extraction à chaud par Soxhlet
(Photo originale, 2014)

IV.2.2.2. . Extraction de l'huile essentielle de *Rosmarinus officinalis* L.

La méthode d'extraction la plus utilisée pour les huiles essentielles est l'hydrodistillation car c'est une méthode qui est très simple d'une part. D'autre part, parce que l'eau est un bon solvant qui a de nombreux avantages et les plus fragiles élaborés par le végétal sans altérer leur qualité et leur composition chimique en maîtrisant la température et la pression pendant le procédé (Lucchesi, 2005).

L'extraction de l'huile essentielle de *Rosmarinus officinalis* L. a été effectuée en utilisant un appareil de type Clevenger (Figure 18).

➤ Mode opératoire

Nous avons placé, dans un ballon, 600 ml d'eau déminéralisée et 150 à 200 g de romarin.

Nous avons mis en fonction le réfrigérant en réglant le débit d'eau et le contenu du ballon à chauffer (ébullition douce) pendant 3 heures. Les vapeurs chargées d'huile

essentielle traversant le réfrigérant sont condensées et chutées dans une ampoule à décanter, l'eau et l'huile se sont séparées par différence de densité.

Les huiles essentielles sont récupérées dans de petits flacons opaques et stockées à 4°C.

Cependant l'hydrodistillation possède des limites. En effet, un chauffage prolongé trop puissant engendre une détérioration de certains végétaux et la dégradation de certaines molécules aromatiques (Lucchesiet *al.*, 2004).



Figure 18: Dispositif d'hydrodistillation «Clevenger»
(Photo originale, 2014)

IV.2.3. Détermination du rendement en huile essentielle

Selon la norme AFNOR (1986), le rendement en huile essentielle (R_{HE}) est défini comme étant le rapport entre la masse d'huile essentielle obtenue après l'extraction (M') et la masse de la matière végétale utilisée (M). Le rendement est exprimé en pourcentage, par la formule suivante :

$$R_{HE}(\%) = M' / M \times 100$$

R_{HE} : Rendement en huile essentielle en %

M' : Masse d'huile essentielle en gramme.

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

IV.2.4. Caractéristiques organoleptiques

L'appréciation des caractéristiques organoleptiques des huiles essentielles consiste à évaluer l'aspect, l'odeur et la couleur en utilisant les sens.

IV.2.5. Caractéristiques chimiques de l'huile essentielle

Quelques paramètres chimiques sont très indispensables à vérifier afin de déterminer la qualité d'un produit.

- **Indice d'acide**

C'est la quantité d'hydroxyde de potassium (KOH), mesurée en milligrammes, nécessaire à la neutralisation des acides libres contenus dans 1 gramme d'huile essentielle, donnée par la formule suivante: (AFNOR, 2000).

$$IA = V \cdot N \cdot Meq / g$$

Où :

V: Volume en ml de la solution d'hydroxyde de potassium utilisé (ml),

G: masse en g de la prise d'essai (g),

Meq: masse équivalente de KOH (mg).

N: La normalité de la solution de KOH utilisée est de **0,1 N**.

➤ **Mode opératoire**

Nous avons introduit 0,5 g d'huile essentielle dans un bécher, nous avons ajouté 5 ml d'éthanol et 5 gouttes de la solution de phénolphtaléine, comme indicateur coloré. Nous avons neutralisé la solution avec l'hydroxyde de potassium contenu dans la burette et nous avons noté le volume de KOH qui assure une coloration stable.

- **Indice d'ester**

C'est le nombre de KOH nécessaire à la neutralisation des acides libérés par l'hydrolyse des esters contenus dans 1 g d'huile essentielle, il est calculé par la formule suivante (AFNOR, 2000).

$$IE = 28,05/m (V_0 - V_1) - IA$$

Où :

V₀: volume, de la solution d'acide chlorhydrique utilisé pour l'essai à blanc (ml). **V₁**:

volumedela solution d'acide chlorhydrique utilisé pour la

détermination (ml). **m**: prise d'essai (g).

➤ **Mode opératoire**

Dans un ballon, nous avons introduit 0,5 g d'huile essentielle à laquelle nous avons ajouté 25 ml de KOH et des pierres ponce. Nous avons adapté le ballon à un réfrigérant, nous avons placé le tout dans un bain-marie pendant 40 à 45 min.

Nous avons laissé refroidir puis nous avons ajouté 20 ml d'eau distillée et 5 gouttes de phénolphtaléine, nous avons titré l'excès de KOH avec la solution d'acide chlorhydrique (0,5 mol/l).

• **Indice de saponification**

D'après les résultats de calcul de l'indice d'acide et de l'indice d'ester, nous avons déterminé l'indice de saponification.

Formule de calcul :

$$IS = IA + IE$$

IV.2.6. Pouvoir antimicrobien

➤ **Solutions testées**

- L'huile essentielle pure.
- L'extrait méthanolique.

IV.2.7.2. Pouvoir antibactérien *in vitro*

L'activité antibactérienne de l'huile essentielle et de l'extrait méthanolique a été testée par la technique de la diffusion des disques de papier filtre (Wattman N°1) en milieu gélosé (Dorothy et Adcock, 2005) vis-à-vis de souches bactériennes pathogènes citées précédemment.

Chaque souche a été ensemencée en strie sur milieu King B pour obtenir des colonies isolées. Après incubation de 18 à 24 heures à 28-30°C, nous avons choisi 4 à 5 colonies bien isolées avec une ansede platine et les transférées dans un tube de solution d'eau physiologique stérile.

➤ **Ensemencement**

Nous avons trempé un écouvillon dans la suspension et nous avons étalé la surface entière de la gélose King B à trois reprises, entourant la boîte à environ 60° après chaque application dont le but d'avoir une distribution égale de l'inoculum. Enfin, nous avons étalé partout autour du bord de la surface de la gélose.

➤ **Depot des disques**

Les disques stériles imprégnés d'huile essentielle pure et d'extrait méthanolique dilués dans l'éthanol à raison de 50 µl par disque, ont été déposés stérilement à l'aide d'une pince sur la surface de l'agelose à raison de 3 disques par boîte de Pétri. Le témoin correspond aux disques imprégnés d'eau distillée stérile. Les 3 disques par boîte correspondent à des répétitions.

➤ **Incubation**

Les boîtes de Pétri ont été incubées durant 18 à 24 heures à 28-30°C pour le développement des bactéries phytopathogènes.

➤ **Lecture**

Après incubation, la lecture de l'efficacité de l'activité antibactérienne a été déterminée en mesurant le diamètre en millimètre (mm), de la zone d'inhibition autour des disques.

IV.2.7.3. Pouvoir antifongique *in vitro*

L'activité antifongique de l'huile essentielle et de l'extrait méthanolique de *Rosmarinus officinalis* L. a été déterminée par la méthode de diffusion en milieu gélosité par **Sacchetti et al. (2005)** et **Rasooli et al. (2008)**.

Pour cela, nous avons déposé au centre de la boîte de Pétri contenant le milieu de culture (PDA), un disque mycélien issu d'une jeune culture fongique (croissance de 5 jours est préconisée pour tous les isolats).

Les disques stériles de 9 mm de diamètre imprégnés de l'huile essentielle pure et de l'extrait méthanolique dilués dans l'éthanol à raison de 50 µl par disque, ont été déposés stérilement à l'aide d'une pipette stérile sur la surface de la gélose à raison de 3 disques par boîte de Pétri. Le témoin consiste en des disques imprégnés avec l'eau distillée stérile. Chaque test est répété 3 fois.

Les boîtes de Pétri ont été incubées dans l'étuve pendant 2 à 3 semaines à une température de 28°C pour le développement des germes en question.

La lecture de l'activité antifongique de l'huile essentielle et de l'extrait méthanolique vis-à-vis des champignons testés a été enregistrée en mesurant le diamètre de l'inhibition de la croissance en millimètre (mm).

Les isolats sont conservés à 4°C pour favoriser leur viabilité et limiter les possibilités de variation.

IV.2.7.4. . Lecture des résultats

L'activité antimicrobienne se manifeste par l'apparition d'un halo d'inhibition de la croissance microbienne autour des disques contenant l'extrait à tester.

La mesure des diamètres des zones d'inhibition se fait avec précision à l'extérieur de la boîte fermée.

Le classement des bactéries et des champignons se fait dans l'une des catégories : sensible ou résistante.

Le résultat de cette activité est exprimé par le diamètre de la zone d'inhibition et peut être symbolisé par des croix. La souche ayant un diamètre :

- $D < 8\text{mm}$: Souches résistantes (-).
- $9\text{mm} \leq D \leq 14\text{mm}$: Souches sensibles (+).
- $15\text{mm} \leq D \leq 19\text{mm}$: Souches très sensibles (++) .
- $D > 20\text{mm}$: Souches extrêmement sensibles (+++) . **(Ponce et al., 2003)**.

D : diamètre de la zone d'inhibition

Chapitre

V Résultatsetdiscussio

n

Dans ce chapitre, tous les résultats expérimentaux obtenus lors de cette étude sont présentés et discutés.

V.1. Rendement en huile essentielle de *Rosmarinus officinalis* L.

L'huile essentielle obtenue par la méthode de hydrodistillation a donné un rendement de **0.49%**. C'est un rendement légèrement faible, c'est à cause des pertes dues à la volatilité des composants (température d'évaporation très faibles) et aux conditions de travail.

Plusieurs études ont été menées pour trouver une explication aux variations qui affectent le rendement en huile essentielle, et de cerner la période adéquate à même de garantir l'obtention d'une grande quantité d'essence aromatique. Les conclusions qui découlent de ces travaux révèlent que, d'une façon générale, le rendement en huile essentielle est tributaire de plusieurs paramètres. Parmi ces paramètres on trouve

: Les méthodes d'extraction (**Gomes, 2007**), les pratiques culturales comme l'utilisation des engrais organiques (**Rametal., 2002 ; Arayaetal., 2006**) ou l'élimination des mauvaises

herbes(Raoetal.,2005)quiontunegrandeinfluencesurlaquantitéd’essencesvégétalessusceptibl
esd’être sécrétées par les plantes aromatiques.

Ce rendementpeutvarier égalementd’une régionà une autre,selon
lesconditionspédoclimatiques.

V.2. Caractéristiquesdesextraits obtenus

Lespremièresétapesdel’extractionparsolvantontconduitàl’obtentiond’unextraitbrutliqui
dedecolorationverte.L’extraitsecdérivédel’extraitbrutduromarinrécupéréaprèsévaporationàsec
àl’évaporateurrotatifrenfermantdescomposés phénoliques, a été pesépourdéterminerlepoids
sec résultant.

Tableau 1 : Caractéristiquestrendementdel’extraitméthanoliquede*Rosmarinus officinalis*L.

Caractéristiquestrendement	Aspect	Couleur	Rendement
Extraitméthanolique de <i>Rosmarinusofficinalis</i> L.	Poudre	Marronverdâtre	4,2%

Lesextraitsméthanoliques issus dela plante obtenuein situ, présentent une couleur
marronverdâtre, un aspect depoudreavecun rendementde l’ordre de4,2%(**Tableau 1**)

V.3. Caractéristiquesorganoléptiques

L’huileessentiellede*Rosmarinusofficinalis*L.estunliquidemobile,transparentàjaunepâl
e(**Figure19**),d’odeurcaractéristiquecamphrée,insolubledansl’eauetsolubledansl’alcooletl’éth
er diéthylique,lesrésultats obtenus sont représentés dans le**tableau 2**.

Tableau 2: Caractéristiquesorganoleptiquesde l’huileessentiellede *Rosmarinusofficinalis*L.

Caractéristiques organoleptiques	Aspect	Couleur	Odeur
Huileessentielle deromarin de la région de Blida	Liquidemobile,l impide	Jaune clair	camphrée
Huileessentielle deRomarinNormes AFNOR(2000)	Liquidemobile,l impide	Presqueincoloreàjaunep âle	Caractéristiquefraîche,plus oumoinscamphréeselonl’or igine

Notrehuileessentielle

estobtenueparhydrodistillation,c'estlaméthodeadéquatepourl'extraction(**MarieElisabethL., 2005**).CesparamètresorganoleptiquessontenaccordavecceuxrépertoriédanslesnormesAFNOR(**AFNOR,2000**).



Figure 19: l'huileessentielle de*Rosmarinusofficinalis*L.

V.4. Caractéristiqueschimiques de l'huile essentielle

Letableau3ci-dessousrésumelesrésultatsdesanalyseschimiquesdel'huileessentiellede *Rosmarinusofficinalis*L.

Tableau 3 :Caractéristiqueschimiques deL'huileessentielle de*Rosmarinus officinalis*L.

Indiceschimiques	Huile essentielle de <i>Rosmarinusofficinalis</i> L.	NormeAFNOR (2000)
Indice d'acide	4.74	2 à5
Indice d'ester	18.12	12 à25
Indice de saponification	22.86	-

D'aprèslesrésultatsobtenus,lesindiceschimiquesdel'huileessentielleétudiéesontconforme sauxnormesAFNOR.

Lecontrôledel'indiced'acide I_A permetd'évaluerlaqualitédeshuilesessentielles :qualitédesd'acidesgraslibresprésent(Goetz,2007).Unevaleurélevéeindiqueunedégradationd'huileessentielle(hydrolysedesesters)durantsaconservation.Inversement,un I_A inférieurà2 est un indicedebonneconservation de l'huile essentielle (Salle, 1991).

L'indiced'esterreenseignesurlaquantitédesacidesgrasliés(Kankoetal.,2004), dansnotre étude,l' I_E denotre huile essentielle estdanslesnormes.

L'indicedesaponificationcorrespondàdesacidesgrascomportantunechaînedecarbonepluslongue.Dansnotreétude,l'indicedesaponificationdel'huileessentielleduromarinest de22.86.Iln'ya pas denormes pourcetindice.

V.5. Évaluationde l'activitéantimicrobiennede l'huileessentielleetde l'extraitméthanolique de*Rosmarinusofficinalis*L.

L'étudedel'activitéd'inhibitiondel'huileessentielleetdel'extraitméthanoliqueduromarin aétéeffectuéeeparlaméthodedes disques.Lesrésultatsdestestseffectuéspermettentde faire la mise en evidencede l'activité antibactérienne etantifongique desextraits du romarin.

Silasoucheestsensible,unezoned'inhibitioncirculaireseforme,c'estàdirequeledéveloppementdesbactériesauniveaudelazonede diffusion del'échantillon estinactif.

Silasoucheestrésistante,lediamètredecettezoned'inhibitionestnégligeable,c'est-à-dire que lesbactéries n'ont pasété inhibées parla diffusion de l'échantillon.

V.5.1. Evaluationdu pouvoir antibactériende l'huileessentielleparla méthodedediffusion à partir desdisquessolides

Nousavonstestél'huileessentielle surquatre souches bactériennes dans le cadre de la lutte biologique. L'évaluation a été faite par la méthode des aromagrammes. Le pouvoir antibactérien de ces extraits est obtenu par la mesure des diamètres des zones d'inhibition (mm). Les résultats obtenus sont résumés sur le **tableau 4**.

Tableau 4 : Diamètres des zones d'inhibition (mm) (moyenne \pm écartype) de l'huile essentielle de *Rosmarinus officinalis* L.

Bactéries phytopathogènes	Diamètre d'inhibition	Sensibilité
<i>Erwinia amylovora</i>	30 \pm 0,33	+++
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>Syringae</i>	0 \pm 0,00	-
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>savastanoi</i>	16 \pm 0,53	++
<i>Pectobacterium carotovorum carotovorum</i>	14 \pm 0,00	+

L'huile essentielle de *Rosmarinus officinalis* L. pure présente une forte activité sur les 3 souches bactériennes testées ($D \geq 9$). Les diamètres des zones d'inhibition varient de 14 mm à 30 mm (**Tableau 4**).

La sensibilité des bactéries est déterminée selon le diamètre du halo d'inhibition par la méthode de diffusion sur gélose (**Figure 24, Annexe 2**).

Les résultats des diamètres des zones d'inhibition révèlent qu'*Erwinia amylovora* apparaît extrêmement sensible vis-à-vis des huiles essentielles de *Rosmarinus officinalis* L. testées.

Les souches *Pseudomonas syringae* pv. *savastanoi* et *Pectobacterium carotovorum carotovorum* sont respectivement très sensible et sensible, par contre *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* est résistante vis-à-vis des huiles essentielles.

L'huile essentielle de *Rosmarinus officinalis* L. a montré une activité élevée contre *Erwinia amylovora* (30 mm) et modérée contre *Pseudomonas syringae* pv. *savastanoi* (16 mm) et *Pectobacterium carotovorum* (14 mm).

V.5.2. Evaluation du pouvoir antibactérien testé par les extraits méthanoliques

Les résultats de l'activité antimicrobienne des extraits méthanoliques vis-à-vis des quatre souches bactériennes sont résumés sur le **tableau 5**.

Tableau 5 : Diamètres des zones d'inhibition en (mm) (moyenne \pm écart type) de l'extrait méthanolique de *Rosmarinus officinalis* L.

Bactéries phytopathogènes	Diamètre d'inhibition	Sensibilité
<i>Erwinia amylovora</i>	15 \pm 0,00	++
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>Syringae</i>	12 \pm 0,53	+
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>Savastanoi</i>	0 \pm 0,00	-
<i>Pectobacterium carotovorum carotovorum</i>	0 \pm 0,00	-

Les résultats des diamètres des zones d'inhibition des extraits méthanoliques de *Rosmarinus officinalis* L. (**Tableau 5**) et (**figure 25, annexe 2**) montrent que l'extrait méthanolique exerce une forte activité sélective sur les deux souches bactériennes : *Erwinia amylovora* (15 mm) et *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* (12 mm).

V.5.3. Evaluationdupouvoirantifongiquedel’huileessentiellede*Rosmarinusofficinalis*

L.

L’étudedupouvoirantifongiquedel’huileessentielleetdel’extraitméthanoliquede *Rosmarinusofficinalis*L.a été évaluée sur dix souches fongiques.

Lesrésultatsdutesensibilitémicrobienneauxhuilesessentielles(aromatogramme)sontregroupés dans le **tableau 6**, les valeurs indiquées sont les moyennes de 3 mesures.

Tableau 6: Résultats du pouvoir antifongique de l'huile essentielle de *Rosmarinus officinalis* L.

Champignons phytopathogènes	Diamètre d'inhibition	sensibilité
<i>Sclerotinia</i> sp.	18 ± 0,33	++
<i>Fusarium</i> sp.	15 ± 0,33	++
<i>Phytophthora</i> sp.	25 ± 0,00	++
<i>Alternaria</i> sp.	12 ± 0,00	+
<i>Trichoderma</i> sp.	15 ± 0,53	++
<i>Botrytis</i> sp.	12 ± 0,33	+
<i>Penicillium</i> sp.	0 ± 0,00	-
<i>Cladosporium</i> sp.	0 ± 0,00	-
<i>Rhizoctonia solani</i>	12 ± 0,53	+
<i>Helminthosporium</i> sp.	0 ± 0,00	-

Il est clair d'après le tableau 6 et (Figure 26 annexe 2) qu'il y a une forte inhibition de la croissance radiale de la majorité des isolats fongiques par l'huile essentielle dont le diamètre le plus important est celui de *Phytophthora* sp. (25 mm), suivi de *Sclerotinia* sp. (18 mm), *Fusarium* sp. et *Trichoderma* sp. (15 mm) et *Botrytis* sp. (12 mm), sauf pour *Penicillium* sp., *Cladosporium* sp. et *Helminthosporium* sp. (0 mm), où nous n'avons observé aucune zone d'inhibition autour des disques.

Les résultats des diamètres des zones d'inhibition de l'huile essentielle de *Rosmarinus officinalis* L. révèlent que les souches fongiques suivantes : *Penicillium* sp., *Cladosporium* sp. et *Helminthosporium* sp. sont résistantes à l'huile essentielle, par contre *Sclerotinia* sp., *Fusarium* sp. et *Trichoderma* sp. sont très sensibles ainsi que *Alternaria* sp. et *Botrytis* sp. sont sensibles à l'huile essentielle. Et seule la souche extrêmement sensible à l'huile essentielle est *Phytophthora* sp.

V.5.4. Evaluation du pouvoir antifongique des extraits méthanoliques

Les résultats de l'activité antifongique de l'extrait méthanolique de *Rosmarinus officinalis* L. sont présentés sur le tableau 7 où nous avons mesuré les diamètres des zones d'inhibition en (mm).

Tableau 7: Résultats du pouvoir antifongique de l'extrait méthanolique de *Rosmarinus officinalis* L.

Champignons phytopathogènes	Diamètres d'inhibition	Sensibilité
<i>Sclerotinia</i> sp.	0 ±0,00	–
<i>Fusarium</i> sp.	0 ±0,00	–
<i>Phytophthora</i> sp.	0 ±0,00	–
<i>Alternaria</i> sp.	0 ±0,00	–
<i>Trichoderma</i> sp.	12 ±0,33	+
<i>Botrytis</i> sp.	0 ±0,00	–
<i>Penicillium</i> sp.	0 ±0,00	–
<i>Cladosporium</i> sp.	0 ±0,00	–
<i>Rhizoctonia solani</i>	0 ±0,00	–
<i>Heminthosporium</i> sp.	0 ±0,00	–

D'après le tableau 7 et (Figure 27, annexe 2), nous pouvons conclure que les extraits méthanoliques de *Rosmarinus officinalis* L. n'ont aucun effet inhibiteur sur les champignons testés vu l'absence de zones d'inhibitions, sauf chez *Trichoderma* sp. (12 mm) qui est sensible à l'extrait méthanolique du romarin.

V.6. Discussion de l'activité antimicrobienne de *Rosmarinus officinalis* L.

Récemment, beaucoup d'attention a été orientée vers les extraits des plantes et les composés biologiques actifs isolés à partir de certaines espèces végétales.

Notre objectif principal est l'extraction des huiles essentielles et des extraits méthanoliques à partir des feuilles et des fleurs de la plante *Rosmarinus officinalis* L., et l'utilisation de ces extraits pour lutter contre les agents phytopathogènes.

Nous avons étudié les effets des extraits de cette plante sur la croissance *in vitro* de deux collections d'organismes phytopathogènes (bactéries et champignons).

L'activité antibactérienne des huiles essentielles a été révélée positive sur une gamme de souches bactériennes phytopathogènes dont : *Erwinia amylovora*, *Pseudomonas syringae savastanoi*, et *Pectobacterium carotovorum* qui appartiennent toutes au groupe des bactéries à Gram négatif.

L'activité antibactérienne des extraits méthanoliques a été révélée positive sur *Erwinia amylovora* et *Pseudomonas syringae*. Les résultats varient selon l'agent pathogène testé.

Cependant, l'activité antifongique de l'huile essentielle évaluée *in vitro*, a montré une efficacité relativement modérée, marquée sur une gamme de champignons phytopathogènes, causant des dégâts aussi bien au champ qu'en conservation, à savoir: *Sclerotinia* spp., *Fusarium* sp., *Phytophthora* spp., *Alternaria* spp., *Trichoderma* spp., *Botrytis* sp., *Rhizoctonia solani*

Et l'activité antifongique de l'extrait méthanolique a montré une efficacité seulement sur *Trichoderma* sp.

V.6.1. L'activité antibactérienne

L'étude de l'activité antibactérienne constitue une étape préliminaire de recherche sur de nouvelles molécules bioactives à intérêt pesticide.

Les résultats obtenus à travers cette étude confirment les propriétés antimicrobiennes que renferme le romarin.

La sensibilité des bactéries testées vis-à-vis des extraits méthanoliques est expliquée par le fait que les plantes produisent des métabolites secondaires spécifiques qui appartiennent à certaines classes connues pour avoir ce type d'activité antibactérienne telles que: les composés phénoliques (Stavriana *et al.*, 2005), les stéroïdes (Ceccherelli *et al.*, 1985 ; Grande *et al.*, 1992) et les flavonoïdes. Les résultats obtenus par cette étude sont en concordance avec les travaux cités précédemment.

L'étude de l'activité antibactérienne *in vitro* de nos extraits analysée par la méthode de diffusion, nous a permis de déduire que l'espèce *Rosmarinus officinalis* L. présente une activité antibactérienne à l'égard de toutes les souches bactériennes testées. Ces résultats pourraient être expliqués par la composition phytochimique de cette plante, caractérisée par sa richesse en composés phénoliques ; spécialement des polyphénols et aussi des flavonoïdes. De nombreux travaux ont mis en évidence le pouvoir antibactérien élevé des composés phénoliques (Scalbert, 1991 ; Cowan, 1999).

D'après les résultats de cette expérience, on arrive à la conclusion que les flavonoïdes et les composés de nature phénolique à groupes hydroxyle libres sont classifiés comme composés antibiotiques très actifs (Rojas *et al.*, 1992). La variation de la composition chimique explique donc les variations observées dans l'activité antimicrobienne des extraits d'une même plante ou de plantes différentes.

L'efficacité optimale d'un extrait peut ne pas être due à un constituant actif principal, mais à l'action combinée (synergie) de différents composés à l'origine de cet extrait (Essawiet Srour, 2000).

Les extraits testés dans cette étude ont montré une action antibactérienne importante vis-à-vis des bactéries à Gram négatif testées, ce qui démontre que ces extraits renferment des métabolites secondaires bioactifs capables de franchir la paroi de ces bactéries comme le feraient d'ailleurs, certains antibiotiques, selon différents modes d'action, soit empêcher la multiplication des bactéries (bactériostase) ou entraîner leur destruction (bactéricide) (Lavigne, 2007).

Plusieurs études ont été menées pour comprendre les mécanismes d'action des extraits de plantes, et plusieurs attribuent cette fonction aux composants phénoliques en interaction avec la membrane plasmique des agents pathogènes. De ce fait, les composés secondaires des plantes possèdent plusieurs modes d'actions sur différentes souches bactériennes aboutissant à la lésion de la membrane plasmique.

D'après Caillet et ses collaborateurs (2007), l'action antimicrobienne des huiles essentielles se déroule en trois phases :

1. Attaque de la paroi bactérienne par l'huile essentielle, provoquant une augmentation de la perméabilité puis la perte des constituants cellulaires.
2. Acidification de l'intérieur de la cellule, bloquant la production de l'énergie cellulaire et la synthèse des composants de structure.
3. Destruction du matériel génétique, conduisant à la mort de la bactérie.

Selon Faraget al. (1989), Marino et al. (1999), Inouye et al. (2001), Fennele et al. (2004); les bactéries à Gram positif sont généralement plus sensibles aux extraits des plantes que les bactéries à Gram négatif. En effet, les bactéries à Gram positif ont seulement une couche externe de peptidoglycane qui ne constitue pas une barrière efficace. En contraste, les bactéries à Gram négatif possèdent une membrane externe de phospholipides qui rend la paroi des cellules imperméables aux corps dissous lipophiles, alors que les sporines constituent une barrière sélective aux corps dissous hydrophiles (Nikaido et Vaara, 1985).

Nos résultats sont en accord avec ces hypothèses du fait que nos deux extraits montrent une activité antibactérienne sur les trois bactéries à Gram négatif testées, ce qui

peut-être dû à la présence de molécules bioactives capables de franchir la paroi des bactéries.

V.6.2. L'activité antifongique

La littérature rapporte de nombreux mécanismes antifongiques très complexes des extraits de plantes végétales afin d'expliquer l'action de diverses molécules bioactives appartenant à différentes familles botaniques. C'est ainsi que **Omidbeygi et ses collaborateurs en 2007**, ont suggéré que les composants de la membrane cellulaire traversent la paroi en interagissant avec les enzymes et les protéines de la membrane, produisant ainsi un flux de protons vers l'extérieur de la cellule qui provoque des changements, et, finalement leur mort.

D'après **Tripathi et Sharma (2006)**, les composants des extraits végétaux agiraient sur les hyphes du mycélium, provoquant la sortie du contenu cytoplasmique, la perte de la rigidité et l'intégrité de la paroi cellulaire des hyphes, ce qui entraîne l'arrêt de la croissance mycélienne.

Le manque d'activité inhibitrice d'un extrait vis-à-vis de certains isolats fongiques, peut être prouvé par l'extraction de ces composés bioactifs dans un solvant différent de l'eau. L'attention devrait également être prêtée aux interactions possibles entre le solvant et les corps dissous, car le solvant peut réagir avec certains composés pour produire des complexes ou pour causer la décomposition, la déshydratation ou encore l'isomérisation de ces composés (**Yrjonen, 2004**).

Conclusion

Conclusion

Notre travail est une contribution modeste pour l'étude de l'activité antimicrobienne des extraits du romarin, une plante très répandue en Algérie, dans le cadre de la lutte biologique.

Notre plante a été récoltée dans la région Blida, identifiée au département de Biotechnologie, séchée à l'air libre dans un laboratoire de projets de fin d'étude de la faculté des sciences de la nature et de la vie, dans les normes désignées par la pharmacopée.

L'extraction des métabolites secondaires a été effectuée par la méthode d'extraction par solvant utilisant l'appareil de Soxhlet et le méthanol comme solvant.

L'extraction de l'huile essentielle a été effectuée par hydrodistillation et le rendement était de 0,49%.

Le contrôle de qualité de l'huile essentielle a révélé que les indices chimiques (indices d'acidité, indice d'ester et indice de saponification) sont tous conformes aux normes AFNOR.

L'activité antibactérienne de l'huile essentielle a été révélée positive sur une gamme de souches bactériennes pathogènes à Gram négatif dont : *Erwinia amylovora*, *Pseudomonas syringae savastoni* et *Pectobacterium carotovorum*.

L'activité antibactérienne des extraits méthanoliques a été révélée positive sur : *Erwinia amylovora* et *Pseudomonas syringae*.

L'activité antifongique de l'huile essentielle évaluée *in vitro* montre une efficacité moyenne marquée sur une gamme de champignons phytopathogènes, à savoir : *Sclerotinia* sp., *Phytophthora* sp., *Alternaria* sp., *Trichoderma* sp., *Botrytis* sp. et *Rhizoctonia solani*.

L'absence d'activité inhibitrice des extraits méthanoliques vis-à-vis de tous les isolats fongiques sauf *Trichoderma* sp. a été enregistrée.

Les résultats obtenus à travers cette étude montrent l'efficacité des extraits du romarin sur certaines souches bactériennes et fongiques.

À la lumière des résultats obtenus et des problèmes rencontrés, il paraît utile d'approfondir cette étude, en utilisant des moyens matériels plus performants et ceci en essayant de :

- Analyser les extraits du romarin par CGMSE et par HPLC, pour mettre en évidence l'effet des molécules actives.
- Élargir la gamme de souches à tester afin d'affirmer l'efficacité de cette plante sur d'autres microorganismes pathogènes.
- Déterminer la CMI (Concentration minimale inhibitrice) et la CMB (Concentration minimale bactéricide) des extraits les plus efficaces contre les souches microbiennes.

Conclusion

étudiées.

- Essai de production d'un biobactéricide et d'un biofongicide à base de ces extraits.

Ces résultats nous encouragent à vérifier et confirmer l'activité *in vitro* de l'espèce *Rosmarinu officinalis* L. et de caractériser les composés responsables du pouvoir antimicrobien.

Par ce modeste travail, nous espérons avoir contribué à la valorisation du romarin de Blida et que nous pouvons conclure que cette plante possède des propriétés antimicrobiennes importantes et que nous recommandons de poursuivre les recherches sur le comportement antibactérien et antifongique de ses extraits du romarin.

Références bibliographiques

Références bibliographiques

- **Abigail A.S. Whitt D.(2005).** Revenge of microbes: how bacterial resistance is undermining the antibiotic miracle. *Amer Society for Microbiology*: 186p.
- **AFNOR**
: Association Française de Normalisation (2000). Recueil des normes françaises «Huiles essentielles». AFNOR, Paris. AFNOR NFT75-006. 202p.
- **Albu S., Joyce E., Paniwnyk L., Lorimer J.P., Mason T.J.(2004)** Potential for the use of ultrasound in the extraction of antioxidants from *Rosmarinus officinalis* for the food and pharmaceutical industry. *Ultrasonics Sonochemistry*. **11**: 261-265.
- **Andy S.(2007).** Lutte biologique, biodiversité et écologie en protection des plantes. Agropolis international, ISSN: 1628-4240.
- **Appel H. and Hirt H.(2004).** Reactive Oxygen Species: Metabolism, Oxidative Stress, and Signal Transduction. *Ann. Rev. Plant Biol.* **55**: 373–99.
- **Araya H. T., Soundy P., Steyn J.M.(2006).** Response of Herbage Yield, Essential Oil Yield and Composition of South African Rose-Scented Geranium (*Pelargonium sp*) to Conventional and Organic Nitrogen. *J. Essent. Oil Res.*, 18: pp 111-115 (Special Edition).
- **Armstrong G.M., Armstrong J.K.(1981).** “Formae speciales and races of *Fusarium oxysporum* causing wilt diseases”, in: Nelson P.E., Toussoun T.A. and Cook R.J. (Eds.) *Fusarium: diseases, Biology, and Taxonomy*, The Pennsylvania State University Press, University Park, PA, USA, 391-399.
- **Arslan D., Musaozcan M.(2007).** Evaluation of drying methods with respect to drying kinetics, mineral content and colour characteristics of rosemary leaves. *Energy Conversion and Management*. (in press)

Références bibliographiques

- **Athamen S.** Etude quantitative des flavonoïdes des graines de *Cuminum cyminum* et les feuilles de *Rosmarinus officinalis* L. et l'évaluation de l'activité biologique. Thèse de Magister, Université de Batna, 2009.
- **Bais H.P., Weir T.L., Perry L.G., Gilroy S., and Vivanco J.M. (2006).** The role of root exudates in rhizosphere interactions with plants and other organisms. *Annu Rev Plant Biol* 57. 233-266
- **Baldwin IT., Halitschke R., Paschold A., Von Dahl CC, Preston CA (2006).** Volatile signaling in Plant-Plant interactions: "Talking trees" in the Genomics Era. *Science* 10, 311, 812-815.
- **Barnett HL. Et Hunter BB. (1972).** Illustrated general of imperfect fungi. Minneapolis. USA . Burgess Publishing. 235p.
- **Bekkara A., Bousmaha F., Talebbendiab L., Boti S.A., Casanova J.B. (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.
- **Belaiche P. (1979).** Traité de phytothérapie et d'aromathérapie. Tome 1 L'aromathérapie. Ed Maloine. S.A. Paris. France.
- **Bellakhdar J. (1997).** La pharmacopée marocaine traditionnelle. Ibis Press (Ed). Paris, 764p.
- **Beloued A. (1998).** Plantes médicinales d'Algérie. 2ème Edition. Office des publications universitaires (Ed). Alger, 274p.
- **Beloued A. (2001).** Plantes médicinales d'Algérie. Edition: Office des publications universitaires : 88-89p.

Références bibliographiques

- **Ben Amor B. (2005).** Maîtrise de l'aptitude technologique de la matière végétale dans les opérations d'extraction de principes actifs; Texturisation par détente instantanée contrôlée "DIC", Thèse de Doctorat, Toulouse.
- **Berche P. (P.C.E.M.2) (2002/2003).** Bactériologie générale, faculté de médecine Necker – enfants malades. 16p.
- **Besombes C. (2008).** Contribution à l'étude des phénomènes d'extraction hydro-thermo-mécanique d'herbes aromatiques". Applications généralisées. Thèse de doctorat. Université de La Rochelle.
- **Billerbeck G. (2000).** Activité fongique de l'huile essentielle de cymbopogon nardus sur l'*Aspergillus niger*. Evaluation d'un bioréacteur pour l'étude de l'effet inhibiteur des substances volatiles en phase vapeur. Faculté des sciences pharmaceutiques, Institut national polytechnique de Toulouse, 236.
- **Bissett J.A (2004).** Revision of the genus *Trichoderma*. I. Section *Pachybasium*. (a) *Can. J. Bot.*, 69 : 2373-2417
- **Blancard D. (1991).** Les maladies de la tomate, identifier, connaître maîtriser. Ed. Quae, Paris.
- **Blancard D., Laterrot H., Marchoux G. et Cetrèse T. (2009).** Les maladies de la tomate, identifier, connaître maîtriser. Ed. Quae, Paris.
- **Boivin G. (2001).** Parasitoïdes et lutte biologique : Paradigme ou panacée? *Vertigo*, 2(2)
- **Boullard B. (2001).** Plantes Médicinales Du Monde (Réalités et croyances), ESTEM, ISBN 2843711177. Pp 515-516.
- **Bousetta N., Lanoisellé J.-L., Bedel-Cloutour C. and Vorobiev E. (2009).** Extraction of soluble matter from grape pomace by high voltage electrical discharges

Références bibliographiques

for polyphenol recovery: Effect of sulphur dioxide and thermal treatments. *Journal of Food Engineering* 95(1):192-198.

- **Bradbury J.F. (1986).** *Guide to Plant Pathogenic Bacteria*. CAB International Mycological Institute, Kew, UK, 332. Luigi Savastano (1887, 1889).
- **Caillet S., Lacroix M. (2007).** Les huiles essentielles : leurs propriétés antimicrobiennes et leurs applications potentielles en alimentaire. Laboratoire de recherche en Sciences appliquées à l'alimentation (RESALA) INRS-Institut Armand-Frappier, Université de Laval (Québec).
- **Ceccherelli P., Curini M., Marcotullio M.C. et Menghin A.I. (1985).** Sesquiterpene Acids from *Dittrichia viscosa*. *Phytochemistry*, Vol. 24, N° 12, P : 2987-2989.
- **Chermette R., Bussieras J. (1993).** Parasitologie vétérinaire. Mycologie, Edité par le Service de Parasitologie de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Maisons-Alfort.
- **Cornelissen C.N., Harvey R.A. and Bruce D.F. (2012).** *Microbiology*, third edition: 448.
- **Cowan M.M. (1999).** Plant products as antimicrobial agents. *Clinical Microbiology Review* 12, 564-582.
- **Croteau R., Kutchan M.T., Lewis G.N. (2000).** Natural products (Secondary metabolites). *Biochemistry & Molecular Biology of Plants*. Ed B. Buchanan, W. Gruissem, R. Jones, American Society of Plant Physiologists. P: 1250-1318.
- **Crouzet J. (1996).** Arômes alimentaires. Techniques de l'ingénieur, F4 100, Paris.
- **Del Bano M.J., L. Castillo J. (2004).** "Flavonoid distribution during the development of leaves, flower, stems and roots of *Rosmarinus officinalis*. Postulation of a biosynthetic pathway", *J. Agric Food*, 32(16), 4987-92.

Références bibliographiques

- **DeBoer S.H. et Kelman A., (1975).** Evaluation of procedures for detection of pectolytic *Erwinia* spp. on potato tubers. *American Potato Journal* **52**: 117-123.
- **DeBoer S.H. (1994).** Prospects for control of potato diseases caused by pectolytic *Erwinia*. In Zehnder, G. W., Powelson, M. L., Jansson, R. K., and Raman, K. V. (Eds), APS Press, St Paul Minnesota 136-148.
- **Develey- Rivière M. and Galiana E. (2007).** Resistance to pathogens and host developmental stage: a multifaceted relationship within the plant kingdom. *New phytol.* **175**, 405-416.
- **Didry N., Dubreuil L. et Pinkas M. (1993).** Activité antibactérienne de thymol, de carvacrol et de l'aldéhyde cinnamique seuls ou associés. *Pharmacize*, **48**, 301-304.
- **Dorothy M. Adcock MD. (2005).** Procedures for validation of INR and local calibration of PT/INR Systems; Ap580-1 proved Guideline. ISBN 1-56238-580-1. Volume 25. Number 23. H54-A
- **Duhoux E. et Nicole M. 2004.** Atlas de Biologie Végétale: Associations et interactions chez les plantes. 1ère Edition, DUNOD, p. 166.
- **Eisse G., de Haan T. C. E. M., Dekker- Nooren G. E. W., vanden Bovenkamp A. G. C. L., Speksnijder P. S., vander Zouwen J. M. et vander W. (2008).** *Pectobacterium carotovorum* subsp. *Carotovorum* can cause potato blackleg in temperate climates. *Eur J Plant Pathol* **122**: 561-569.
- **El Modafar C., El Boustani E., (2002).** Contribution des polyphénols aux mécanismes d'action des plantes. In Regnault-Roger C., Philogène B., J., R., Vincent C., biopesticides d'origines végétales. Lavoisier Tec et Doc, Paris, 196-185.
- **Escott, Harlein, Klein (2006).** Microbiologie 2^e édition française, de boek, P : 2.

Références bibliographiques

- **Essawi T. et Srour M. (2000).** Screening of some Palestinian medicinal plants for antibacterial activity. *J. Ethnopharm.* 70: 343-349.
- **Fache P., Nuns J., Tuaz F. (1995)** "Le chauffage des liquides fortement conducteurs de l'électricité: l'induction directe, une solution qui ignore l'encrassement et la corrosion", Congrès, UN IPEDE, Barcelona.
- **Falleh H., Ksouri R., Chaieb K., Karray-Bourauoui N., Trabelsi N., Boulaaba M., Abdelly C. (2008).** Phenolic composition of *Cynara cardunculus* L. organs, and their biological activities. *C. R. Biologies.* 331: 372-379.
- **Farag R.S., Daw Z.W., Hewedi F.M., Elbararoty G.S.A. (1989).** Antimicrobial activity of some Egyptian spice Essential Oils. *J. Foodprotects*, 52, pp: 675-679.
- **Fauchère J-L. (1997).** Bactériofiches Techniques en bactériologie clinique. Edition ellipses, 175p.
- **Fauchère J. et Avril J.L., 2002,** Bactériologie générale et médicale: Ellipses Editions Paris, 365.
- **Fekhar N. et Arabi M. (2011).** Extraction des métabolites secondaires { Flavonoïdes } de *Rosmarinus officinalis* L. par le procédé du chauffage par induction magnétique. Thèse de Master, Université de Médéa.
- **Fennell C.W., Lindsey K.L., McGaw L.J., Sprag S.G., Stafford G.I., Elgorashi E.E., Grace O M., Van Staden J. (2004).** Assessing African medicinal plants for efficacy and safety: pharmacological screening and toxicity. *Journal of Ethnopharmacology* 94, 205-217.
- **Ferrari J. (2002).** Contribution à la connaissance du métabolisme secondaire des *Thymelaeaceae* et investigation phytochimique de l'une d'elles: *Gnidiainvolucrata* Steud. ex A. Rich. Thèse de doctorat. Lausanne.

Références bibliographiques

- **Ferron P. (2000).** La lutte biologique: définition, concept et stratégies. Dossiers de l'environnement de l'INRA*.*
- *NR. 19: 7-18.
- **Field B., Jordan F., and Osbourn, A. (2006).** First encounters - deployment of defence-related natural products by plants. *New Phytologist* 172: 193-207.
- **Gérard D. (2000).** "Chauffage par induction électromagnétique: technologie", technique de l'ingénieur Rudnev V, "Handbook of induction heating", Ed CRS, 2003. eur D5963.
- **Goetz P. (2007).** La phyto cosmétologie thérapeutique. Ed. Springer-verlag, Paris. 257p.
- **Gomes P.B., Vera G., Mata Aliro E. Rodrigues A. F. (2007).** Production of rose geranium oil using supercritical fluid extraction. *Journal of Supercritical Fluids*, 41: pp50-60.
- **Gonzalez-Trujano M.E., Pena E.I., Martinez A.L., Moreno J., Guevara-Fefer P., Deciga-Campos M., 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.
- **Gordon-Weeks R. and Pickett J. K. (2009).** Role of natural products in nature: plant-insect interactions. *Plant-derived Natural products*, p 321-347
- **Grande M., Torres P., Piera F., Bellido I. S. (1992).** Triterpenoids from *Dittrichia viscosa*. *Phytochemistry*, Vol. 31, N°.5, p: 1826-1828.
- **Gray E. J. and Smith D. L. (2005).** Intracellular and extracellular PGPR: commonalities and distinctions in the plant-bacteria signaling processes. *Soil Biol.*
- **Gueorguiev E. (1980).** Produits aromatiques naturels et synthétiques. Edition de l'Institut Supérieur de Technologie Alimentaire. Plovdiv, Bulgarie.

Références bibliographiques

- **Guerin-**
Fauble V. et Carret G. (1999). L'antibiogramme, principes, méthodologie, intérêt et limites. Journée Nationale GTV-INRA, 5-12.
- **Haddouchi F., Lazouni H., Ahammer K.A., Carson C.F. et Riley T.V. (2009).** Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts. *Journal of Applied Microbiology*, 86, 985-990.
- **Hall B.H., Cother E.J., Whattam M., Noble D., Luck Jet Cartwright D. (2004).** First report of olive knot caused by *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* on olives (*Olea europaea*) in Australia. *Australasian plant pathology*. 33: 433-436.
- **Hammerschmidt R. (1999).** Phytoalexins: what have we learned after 60 years? *Ann. Rev. Phytopathol.* 37, 285-306.
- **Handa S.S., Khanuja S.P.S., Longo G. and Rakesh D.D. (2008).** Extraction technologies for medicinal and aromatic plants, International Centre for Science and High Technology, Trieste, Italy.
- **Hawes M.C., Gunawardena U., Miyasaka S. and Zhao X. (2000).** The role of root border cells in plant defense. *Trends Plant Sci.* 5, 128-133
- **Helias (2008).** Synthèse. *Cahiers Agricultures* 17 :349-354.
- **Hemwimon S., Pavasant P. & Shotiprux A. (2007).** Microwave-assisted extraction of antioxidant anthraquinones from roots of *Morinda citrifolia*. *Separation and Purification Technology*. 54.44-50.
- **Hennequin C., Lavarde V. (1998).** Infections à *Penicillium*. *Encycl. Med. Chir. (Elsevier, Paris), Maladies Infectieuses*, 850-A-11.
- **Inouye S., Takiswa T. and Yamaguchi H. (2001).** Antibacterial activity of essential oils and their major constituents against respiratory tract pathogens by gaseous contact. *J. of Antimi. Chemo.* 47: pp 565-573.

Références bibliographiques

- **Jilman(1986).** A manual of soil fungi. Reviser second edition. Ames, Iowa, USA. 428p.
- **Julie A. E. (2000).** *Erwinia amylovora*: The molecular basis of the fire blight disease. *Molecular Plant Pathology*. 1(6): 325-329.
- **Kanko C., Sawaliho B. E., Kone S., Koukoua G., N'Guessan Y. T. (2004).** Etude des propriétés physico-chimiques des huiles essentielles de *Lippia multiflora*, *Cymbopogon citratus*, *Cymbopogon ardens*, *Cymbopogon giganteus*. *Comptes rendus Chimie* 7, pp 1039–1042.
- **King E. O., M. K. Ward D. E. Raney. (1954).** Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescein. *J. Lab. Clin. Med.* 44:301–307.
- **Kraft J. M., Haware M. P., Jimenez-Diaz R. M., Bayaa B., Harrabi M. (1994).** Screening techniques and sources of resistance to root rot and wilt in cool season food legumes. In: Muelbauer, F. G., Kaiser, W. J. *Expanding the production and use of cool season food legumes*. Ed. Kluwer academic publishers, Dordrecht. The Netherlands, pp. 268-289.
- **Kubicek C. P., Bissett J., Druzhinina I., Kullnig-Gradinger C. & Szakacs G. (2003).** Genetic and metabolic diversity of *Trichoderma* sp.: a case study on South-East Asian isolates. *Fungal Genet. Biol.*, 38 (3) : 310-319
- **Lahlou. M. (2004).** Method to study phytochemistry and bioactivity of essential oils. *Phytotherapy Research*, 18, 435-448.
- **Lapwood D. H. et Hering T. F. (1968).** Infection of tubers by common scab (*Streptomyces scabiei*) during brief periods when the soil is drying. *European Potato Journal* 1:177-187.
- **Larkin R. P., Fravel, D. R. 1998.** Efficacy of various fungal and bacterial biocontrol organisms for control of Fusarium wilt of tomato. *Plant Dis.*, 82, pp.1022–1028.

Références bibliographiques

- **Lavigne J.P. (2007).** Effets des antibiotiques et mécanismes de résistance. MB7 Bactériologie, B7 Antibiotiques et résistance. Faculté de médecine Montpellier-Nîmes. Janvier 2007.
- **Leybros J., Fremeux P.** *Extraction solide-liquide-Aspects théoriques.* Techniques de l'Ingénieur (traité Génie des procédés), J2780
- **Lucas J. (1996).** Induction Conduction électrique dans l'industrie". Ed Electra; Paris
- **Lucchesi (2005).** Extraction Sans Solvant Assistée par Micro-ondes Conception et Application à l'extraction des huiles essentielles : p 17 ; 23, 52,
- **Lucchesi M.E., Chemat F. and Smadja J. (2004).** Flavour and Fragrance Journal Flavour Fragr. J. ; 19: 134-138
- **Macias F.A., Galindo J.L.G., Galindo J.C.G. (2007).** Evolution and current status of ecological phytochemistry. Phytochemistry 68: 2917-2936
- **Madden L. V., and Wheelis M. (2003).** The threat of plant pathogens as weapons against U.S. crops. Annu Rev phytopathol 4:155-176
- **Maleck K., Levine A., Eulgem T., Morgan A., Schmid J., Lawton K.A., Dangel J. and Dietrich R.A. (2000).** The transcriptome of Arabidopsis thaliana during systemic acquired resistance. Nat. Genet. 26: 403-410
- **Mann C. and Markham J.L. (1998).** A new method for determining the minimum inhibitory concentration of essential oils. Journal of Applied Microbiology, 84, 538-544.
- **Maor R. and Shirasu K. (2005).** The arms race continues: battle strategies between plants and fungal pathogens. Curr Opin Microbiol 8: 399-404

Références bibliographiques

- **Marino M., Bersani C., Comi G. (1999).** Antimicrobial activity of essential oils of *Thymus vulgaris* L. measured using a bioimpedometric method. *J. Food Protect.*, 62: pp1017-1023.
- **Mellat I. (1997).** "Contribution à l'extraction et l'étude de l'huile essentielle de *Eucalyptus*" (PFE) Université de Médéa.
- **Messiaen C., Blancard D., Rouxel F., Lafon R. (1991).** Les maladies des plantes maraichères (du labo au terrain), Edition Quae, 552p.
- **Morrissey John P. (2009).** Biological activity of defence-Related Plant Secondary Metabolites. *Plant-derived Natural Products*, P283-299
- **Mouas S., Lachenani A. (2010).** "Extraction et caractérisation de l'huile essentielle des graines de *Cominum cuminum L.* induction électromagnétique", PFE, Université de Médéa.
- **Muanda F.N., 2010.** Identification de polyphénols, évaluation de leur activité antioxydante et étude de leurs propriétés biologiques. Thèse de doctorat, Université de Metz. 238 p.
- **Nautiyal C.S. (2001).** Biocontrol of plant diseases for agricultural sustainability. In: Upadhyay, R. K., Mukerji, K. G., Chamola, B. P. *Biocontrol Potential and its Exploitation in Sustainable Agriculture*, vol. 1: Crop Diseases, Weeds, and Nematodes. Ed. Kluwer Academic, New York, pp.9-23.
- **Nelson E.B. (2004).** Microbial dynamics and interactions in the sphere. *Ann. Rev. Phytopathol.*, 42, 271-309
- **Nikaido H., Vaara M. (1985).** Molecular basis of bacterial outer membrane permeability. *Microbiology Review* 1, 1-32.

Références bibliographiques

- **Okamura N., Haraguchi H., Hashimoto S., Yagi A. (1994).** "Flavonoïdes in *Rosmarinus officinalis* leaves Phytochem", 37(5), 463-6.
- **Omidbeygi M., Barzegar M., Hamidi Z. (2007).** Antifungal activity of thyme, summer savory and clove essential oils against *Aspergillus flavus* in liquid medium and tomato paste. Food control 18: 1518-1523.
- **Owen P. et Johens T. (1999).** Xanthine oxidase inhibitory activity of northeastern North American plant remedies used for gout. *Journal of Ethnopharmacology*. 64, 149-160
- **Panda H. (2009).** *Aromatic Plants Cultivation, Processing And Uses*.
- **Perrot E. (1944).** *Matières premières usuelles du règne végétal*. Masson & Cie. Tome 2. Paris
- **Pérombelon MCM. (1974).** The role of the seed tuber in the contamination by *Erwinia carotovora* of potato crops in Scotland. *Potato Research* 17: 187-199.
- **Pérombelon MCM., Lumb VM., Zutra D., Hyman L. J. et Burnett EM. (1989).** Factors affecting potato blackleg development. In: Tjamos, EC, Beckman, CH, eds Proceedings of the NATO Advanced Research Workshop on the interaction of Genetic and Environmental Factors in the development of Vascular Wilt Diseases of Plants' 1988, Cape Sounion, Greece. Berlin: Springer-Verlag, 421-431.
- **Pérombelon MCM. (2002).** Potato disease caused by soft rot *Erwinia*: an overview of pathogenesis. *Plant Pathology* 51: 1-12.
- **Philogene B.-J., Fabres G., Regnault-Roger C. (2005).** Protection des cultures, environnement et développement durable: Enjeux pour le XXI^e siècle. In Regnault-Roger C., Fabres G., Philogene B.-J. Enjeux phytosanitaires pour l'agriculture et l'environnement. Lavoisier Tec et Doc, Paris, p 1-14.

Références bibliographiques

- **Piga P.M., Belanger R.R., Paulitz T.C., Benhamou N. (1997).** Increased resistance to *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopescii* in tomato plants treated with the endophytic bacterium *Pseudomonas fluorescens* strain 63-28. *Physiol. Mol. Plant Pathol.*, 50, pp.301–320.
- **Prieto A., Leal J.A., Poveda A., Jiménez-Barbero J., Gómez-Miranda B., Domenech J., Ahrazem O. & Bernabé M. (1997).** Structure of complex cell wall polysaccharides isolated from *Trichoderma* and *Hypocrea* species. *Carbohydrate Research*, 304(3-4) : 281-291
- **Quesada J.M., Penyalver R. et López M.M. (2008).** Epidemiological Basis for an Efficient Control of *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* on Olive Trees. Springer Science + Business Media B.V. DOI:10.1007/978-1-4020-6901-7:57-64.
- **Quezel P. et Santa S. (1963).** *Nouvelle flore d'Algérie et des régions désertiques méridionales.* Tome II. p.940
- **Ram M., Ram D., Roy S.K. (2002).** Influence of an organic mulching on fertilizer nitrogen use efficiency and herb and essential oil yields in geranium (*Pelargonium graveolens*). *Bioresource Technology*, 87, pp273-278.
- **Rameau J-C. (2008).** *Flore forestière française: Région méditerranéenne,*
- **Rao R.B., Paul R.N., Singh K. (2005).** Influence of co-distillation with weed biomass on yield and chemical composition of rose-scented geranium (*Pelargonium species*) oil. *J. Essent. Oil Res.* 17: pp 41-43.
- **Rasooli I., Fakoor M.H., Yadegarinia D., Gachkar L., Allameh A., Rezaei M.B. (2008).** Antimycotoxicogenic characteristics of *Rosmarinus officinalis* and *Trachyspermum copticum* L. essential oils. *International Journal of Food Microbiology*. 122:135-139.

Références bibliographiques

- **Rojas A., Hernandez L., Pereda-Miranda R., Mata R. (1992)**, Screening for antimicrobial activity of crude drug extracts and pure natural products from Mexican medicinal plants. *J. Ethnopharmacology*. 35:275-283.
- **Sacchetti G., Maietti S., Muzzoli M., Scaglianti M., Manfredini S., Radice M., Bruni R. (2005)**, Comparative evaluation of 11 essential oils of different origin as functional antioxidants, anti-radicals and antimicrobials in foods. *Food Chem.* **91**:621-632.
- **Sallé J.L. (1991)**. Les huiles essentielles. Ed. Frison-Roche. Paris. 167p.
- **Sarbach R. (1962)**. Contribution à l'étude de la désinfection chimique des atmosphères. Faculté de Pharmacie, Université de Rennes, 181p.
- **Sarni-Manchado P., Cheynier V., 2006**. Polyphénols en agro-alimentaire. édition Lavoisier PP :398
- **Scalbert A. (1991)**. Antimicrobial properties of tannins. *Phytochemistry*. 30; 3875-83.
- **Scheler A. (1862)**. *Dictionnaire d'étymologie française d'après les résultats de la science moderne*.
- **Schroth M.N., Hildebrand D.C. et Panopoulos N. (2006)**. Phytopathogenic *Pseudomonads* and Related Plant-Associated *Pseudomonads*. *Prokaryotes*. 6:714–740. DOI: 10.1007/0-387-30746-x_23.
- **Scott R.I., Chard J.M., Hocart M.J., Lennard J.H. et Grahams DC. (1996)**. Penetration of potato tuber lentils by bacteria in relation to biological control of blackleg disease. *Potato Research* **39**: 333-334.
- **Semal J. (1996)**. Traité de pathologie végétale, les presses agronomiques de Gembloux, p. 465-478

Références bibliographiques

- **Senhaji A. (1999).** Problématique de la tuberculose de l'olivier dans le plateau du Saiss. Journée nationale sur la protection de l'olivier, Marrakech le 27 mai 1999.
- **Sharma R. C. and Sharma J. N. (2005).** Challenging problem in horticultural and forest pathology. *Indus publishing company*. 444 p.
- **Simpson W. T. (1999).** Drying and control of moisture content and dimensional changes, Gen. Tech. Rep. FPL-GTR-113. Madison, Forest Products Laboratory. 463 p.
- **Smith M. Det Navilliat P. L. (1997).** A new protocol for antimicrobial testing of oils. *Journal of microbiological methods*, 28, 21-24.
- **Spencer R. C. J. (2003).** Ozone as a post-harvest treatment for potatoes. Thesis for the degree of Master of Science, University of Saskatchewan, Saskatoon, Canada 152 p.
- **Stavriakou S., Liakopoulos G. et Karabourniotis G. (2005).** Boron deficiency effect on growth, photosynthesis and relative concentrations of phenolics of *Dittrichia viscosa* (Asteraceae). *Environmental and Experimental Botany* (Elsevier). P: 293-300.
- **Strange R. N. (2003).** Introduction to Plant Pathology. John Wiley & Sons Ltd., p. 497.
- **Teuscher E., Robert A., Annelise L. (2005).** 1000 plantes aromatiques, Edition Lavoisier. pp 195, 310-313, 416-422.
- **Tortora G. J. (2003).** Introduction à la microbiologie. Edition ERPCanada P. 945
- **Touafek O. (2010).** Etude phytochimique de plantes médicinales du nord et du sud Algériens., Thèse de Doctorat Constantine, Algérie.

Références bibliographiques

- **Tripathi A., Sharma N. (2006).** Fungitoxicity of the essential oil of *Citrus sinensis* on post-harvest pathogens. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 22(6):587-593.
- **Tyler V.E., Brady L.R., Robbers J.E. (1881).** *Pharmacognosy*. Lea & Febiger, Philadelphia, 520 p.
- **Vanachter A., Van Wembeke E., Van Assche C. (1983).** Potential danger for infection and spread of root disease of tomatoes in hydroponics. *Acta Hort.*, 133, pp. 119-127.
- **Wang L. and Weller C.L. (2006).** Recent advances in extraction of nutraceuticals from plants. *Trends in Food Science & Technology* 17(6):300-312.
- **Yaganza E-S. (2005).** Utilisation post-récolte des sels organiques et inorganiques pour lutter contre la pourriture molle de la pomme de terre: base physico-chimique. Thèse Ph.D. Université Laval, Québec, Canada 188 p.
- **Young, J.M. (2004).** Olive knot disease and its pathogens. *Australasian Plant Pathology*. 33: 34-39.
- **Yrjonen T. (2004).** Extraction and planar chromatographic separation techniques in the analysis of natural product. Conference room 513 at Viikki info centre. Faculty of pharmacy of the University of Helsinki. P: 64
- **Zohary D. et Spiegel-Roy P. (1975).** Beginnings of fruit growing in the old world. *Science*. 187: 319-27.

Annexes

Annexe1: appareillage



Figure20:Evaporateur rotatif



Figure21:Balance



Figure22:Bain Marie



Figure23:Autoclave

Annexe2

Figure 24: photosreprésentativesdeszonesd'inhibitions(mm)
desbactériesphytopathogènesvis-à-visdes
huilesessentiellesde*Rosmarinusofficinalis*L.



Erwinia amylovora(temoin)

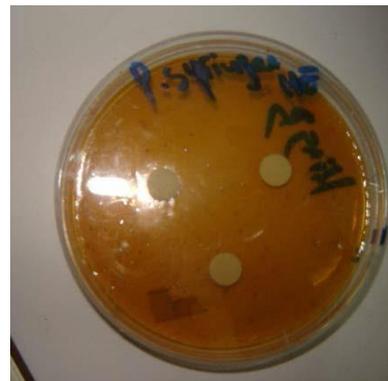


Zone
d'inhibition

Erwinia amylovora (huile esentielle)



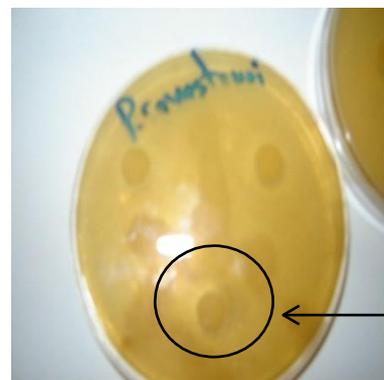
Pseudomonas syringae syringae (temoin)



Pseudomonas syringae syringae
(huile esentielle)



Pseudomonas savastoni(temoin)

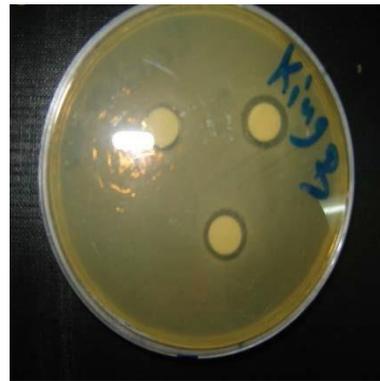


Zone
d'inhibition

Pseudomonas savastoni
(huile esentielle)



Pectobacterium carotovorum
(temoin)



Pectobacterium carotovorum
(huile essentielle)

Zoned'inhibition

Figure 25 : photos représentatives des zones d'inhibition (mm) des bactéries phytopathogènes vis-à-vis des extraits méthanoliques de *Rosmarinus officinalis* L.



Zone d'inhibition

Erwinia amylovora (extrait méthanolique)



Zoned'inhibition

Pseudomonas syringae (extrait méthanolique)



Pseudomonas syringae savastoni
(extrait méthanolique)

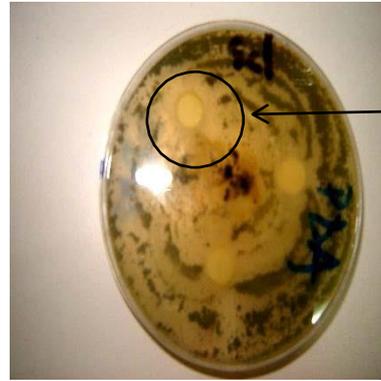


Pectobacterium carotovorum
(extrait méthanolique)

**Figure 26 : photosreprésentativesdeszonesd'inhibitions(mm)
deschampignonsphytopathogènesvis-à-
visdeshuilesessentiellesde*Rosmarinusofficinalis*L.**



Sclerotiniasp.(temoin)

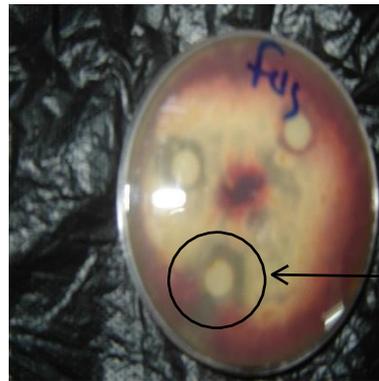


Sclerotiniasp.(huile essentielle)

Zone
d'inhibition



Fusariumsp.(temoin)

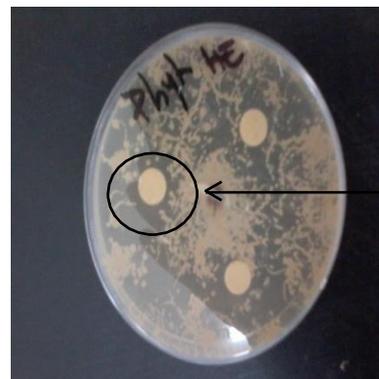


Fusariumsp.(huile essentielle)

Zone
d'inhibition



Phytophthorasp.(temoin)



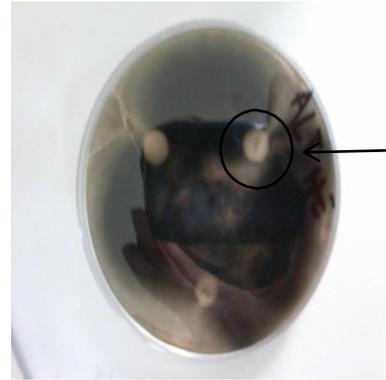
Phytophthorasp.(huile
essentielle)

Zone d'inhibition

Annexes

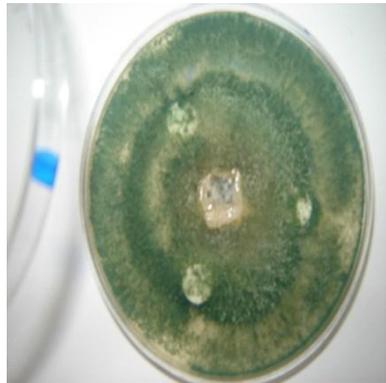


Alternaria sp.(temoin)



Zoned' inhibition

Alternaria sp.(temoin)



Trichoderma sp.(temoin)

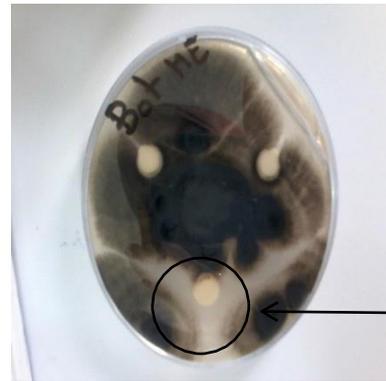


Botrytis sp.(temoin)



Zone
d' inhibition

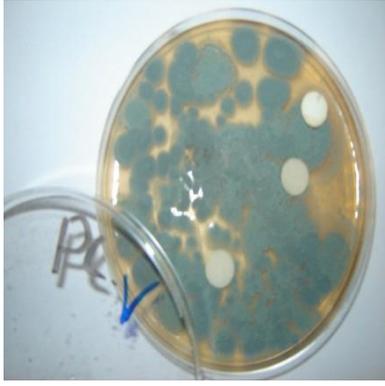
Trichoderma sp.(huile essentielle)



Zone
d' inhibition

Botrytis sp.(huile essentielle)

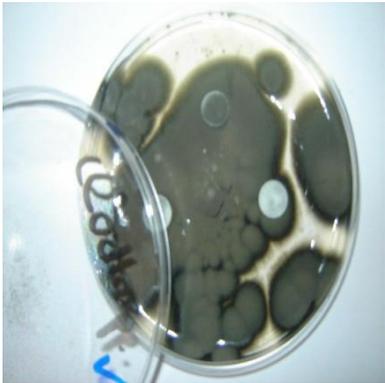
Annexes



*Penicillium*sp.(temoin)



*Penicillium*sp.(huile essentielle)



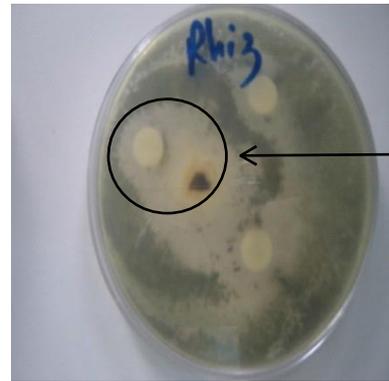
*Cladosporium*sp.(temoin)



Cladosporium sp.(huile essentielle)



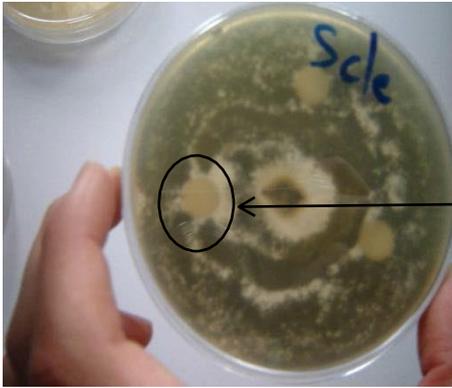
Rhizoctoniasolani(temoin)



Rhizoctoniasolani(huile essentielle)

Zone
d'inhibition

Figure 27: photos représentatives des zones d'inhibitions (mm) des champignons phytopathogènes vis-à-vis des extraits méthanoliques de *Rosmarinus officinalis* L.



Zoned' inhibition

Sclerotinia sp. (extrait méthanolique)



Fusarium sp. (extrait méthanolique)



Phytophthora sp. (extrait méthanolique)



Alternaria sp. (extrait méthanolique)

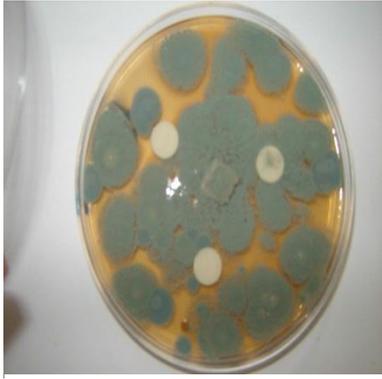


Botrytis sp. (extrait méthanolique)



Trichoderma sp. (extrait méthanolique)

Annexes



Penicillium
sp.(extraitméthano
lique)



Cladosporium
sp.(extraitméthanolique)



Rhizoctoniasolani(extrait
méthanolique)

Annexe3

Milieux de culture

a) Milieu King B (King *et al.*, 1954).

Ce milieu est utilisé pour cultiver les bactéries phytopathogènes à 28°C pendant 24 à 72h. Il se compose de:

- Peptone 20,0g
- Glycérol 10,0 ml
- Phosphate dipotassique 1,5 g
- Sulfate de magnésium 1,5 g
- Agar agar bactériologique 15,0 g
- Eau distillée 1000ml
- pH 7,2

b) Milieu PDA (potato-Dextrose-Agar)

Ce milieu est utilisé pour cultiver les champignons phytopathogènes. Il a été préparé comme suit :

600g de pomme de terre bouillit dans 1,5 litre
d'eau. 20g de glucose
20g d'agar
Compléter avec l'eau distillée jusqu'à 3 litres

Les milieux de cultures utilisés dans ce travail étaient stérilisés par autoclavage à 121°C pendant 20 minutes.