

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

UNIVERSITE SAAD DAHLEB - BLIDA 1

FACULTE DES SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE

DEPARTEMENT DE BIOTECHNOLOGIE



Projet de fin d'étude en vue de l'obtention du diplôme de Master 2

Spécialité. Biotechnologie microbienne

Thème

L'effet antifongique de quelques extraits végétaux

Présenté par

HADJ KOUIDER Ouahiba

KENFOUD Bouthaina

Devant le jury composé de

Mme BENKORTBY. H	MMA	USDB 1	Présidente
Mme AMMAD. F	MCA	USDB 1	Promotrice
Mme BENCHABANE. T.D	MAA	USDB 1	Examinatrice

Année universitaire 2020 – 2021

Remercîments

Avant tout nous remercions **ALLAH** tout puissant de nous a accordé la force, le courage et la patience pour toutes ces longues années d'étude et pour la réalisation de ce mémoire que nous espérons être utile.

Nos adressons nos chaleureux et profonds remerciements, et nos vives reconnaissances à notre promotrice Madame **AMMAD Faiza** qui a accepté de nous encadrer, pour nous conseiller et nous orienter durant la réalisation de ce travail.

Nos vifs remerciements vont également aux membres de jury, chacun à son nom, Madame **BENCORTEBY. H** Présidente et Madame **BENCHABANE. T.D** Examinatrice. Pour l'intérêt qu'elles ont porté à notre recherche en acceptant d'examiner notre travail et de l'enrichir par leurs propositions.

Nos remerciements s'étendent également à tous nos enseignants durant les années des études, particulièrement nos enseignants qui ont veillé à notre formation durant notre cursus.

Nous tenons à remercier tous nos collègues d'étude, en particulier notre promotion biotechnologie microbienne (2020 - 2021).

Enfin nos remerciements vont également à toute personne ayant participé de près ou de loin dans l'élaboration de ce travail, trouve ici l'expression de nos très vifs remerciements.

Dédicace

Je dédie ce modeste travail : A ceux qui m'ont tout donné sans rien attendre en retour A ceux qui m'ont encouragée et soutenue : mes parents «**MOUHAMMED** et **MALIKA** » tous les mots sont insuffisants pour exprimer ma gratitude, et mon amour. Que le tout puissant les garde et les protégé.

A mon grand- père **BENYOUCEF** et ma grande- mère **KHADIDJA**, Je pris Dieu de les protéger et de les accorder santé et bonheur.

Je tiens à présenter mes remerciements à mon fiancé Qui n'a jamais cessé de me soutenir pour que je puisse finir mes études et surtout être le meilleur.

A mes adorable sœurs «**AMEL** et **WAFAA** » Merci d'être toujours à mes côtés.

A mes frères, **OUSSAMA**, **DJAMEL EDDIN** et **ABD ERRAHMAN**, pour leur appui et leur encouragement.

A toute ma famille, et à tous mes amis pour leur soutien.

Merci d'être toujours là pour moi.

« *Ouahiba* »

Dédicace

A l'aide d'ALLAH tout puissant, qui m'a tracé le chemin de ma vie, j'ai
pu réaliser ce travail que je dédie :

A la lumière de mes yeux et l'ombre de mes pas, ma Mère

A le bonheur de ma vie, mon honorable Père

A ma chère grande mère

Que dieu les gardes et les protèges

A mes frères Abd el malek et Alae eddine

A mes chères cousines (mes sœurs) et mes chers cousins

A mes adorables et mes fidèles amies Zola et Ghada et à mon chère
amie Hadjer

A mon binôme Hiba qui a partagée avec moi les moments difficiles et
agréables passés ensemble duré ce travail

A ma belle famille

A tous mes amis(es) et tous ceux qui me sont chers.

« *Bouthaina* »

Listes des figures :

Figure 1. Répartition géographique des maladies du bois	17
Figure 2. Forme lente de l'esca	18
Figure 3. Forme apoplectique de l'esca	18
Figure 4. a) Feuille saine b) Feuille nécrosée	20
Figure 5. a) Grappe saine b) Symptômes d'eutypiose sur grappe	20
Figure 6. Evolution de la nécrose brune dure et de position sectorielle	20
Figure 7. Répartition géographique du BDA en Algérie	21
Figure 8. Les symptômes du BDA sur le bois.....	22
Figure 9. Symptômes de la forme sévère du BDA. a : Dessèchement d'un rameau, b : Défoliation des entres- cœurs	22
Figure 10. Symptômes foliaires de BDA sur cépage noir Merlot.....	23
Figure 11. Symptômes foliaires de BDA sur cépage blanc (Sauvignon).....	24
Figure 12. Le recépage de vigne	27
Figure 13. La complantation de vigne	28
Figure 14. L'injection de nanoparticules de cuivre	31
Figure 15. Introduction de clous en cuivre.....	32
Figure 16. Les souches fongiques de <i>Botryosphaeria obtusa</i> cultivée sur le milieu PDA.	37
Figure 17. Schéma d'un montage d'entraînement à la vapeur d'eau.....	38
Figure 18. Evaluation de l'activité antifongique par test d'activité volatile.....	40
Figure 19. Evaluation de l'activité fongicide de l'H.E de <i>Géranium rosat d'Algérie</i> à différentes dilutions.....	45
Figure 20. Étude comparée des taux d'inhibition de la croissance mycélienne de <i>Botryosphaeria otusa</i> sous l'effet des huiles essentielles (a : huiles essentielles, b : doses c : périodes après traitement)	47

Liste des tableaux :

Tableau 1. Propriétés organoleptiques des huiles essentielles de <i>Géranium rosat d'Algérie</i> et de <i>Lavandula agustifolia</i>	43
Tableau 2. Rendement de H.E de <i>Géranium rosat d'Algérie</i>	43
Tableau 3. Modèle G.L.M. appliqué aux essais de traitements sur la croissance mycélienne (N=40).	46

Liste des abréviations

AFNOR. Association française de normalisation.

BDA. Black Dead Arm.

G.L.M. Modèle général linéaire

H.E. Huile essentielle.

LOS. Lipooligosaccharides.

LPS. Lipopolysaccharides.

MDB. Maladie du bois.

OGA. Oligogalacturonides.

OIV. Organisation internationale de la vigne et du vin.

PDA. Potato Dextrose Agar.

Rd HE. Rendement d'huile essentielle.

SDP. Stimulateur de Défense des Plantes.

SDN. Stimulateurs des Défenses Naturelles.

Table des matières:

Résumé	
Liste des figures	
Liste des tableaux	
Liste des abréviations	
Introduction.....	14

Chapitre I. Synthèse bibliographique

1. Les maladies du bois.....	16
1.1. Introduction.....	16
1.2. Localisation des maladies du bois.....	16
1.3. Les principales maladies du bois.....	17
1.3.1. L'esca.....	17
1.3.1.1. Symptomatologie.....	18
1.3.2. l'eutypiose.....	19
1.3.2.1.Symptomatologie.....	19
1.3.3. Black dead arm « BDA ».....	21
1.3.3.1. Symptomatologie.....	22
1.3.3.2. Principaux agents fongiques associés au BDA.....	24
1.3.3.2.1. Les Botryosphaeriaceae.....	24
1.3.3.2.2. La taxonomie des Botryosphaeriaceae.....	24
1.3.3.2.3. Interactions hôte-pathogène.....	25
2. Les méthodes de lutte contre les maladies du bois.....	26
2.1. La lutte prophylactique.....	26
2.2. La lutte curative.....	27
2.2.1. Le curetage.....	27

2.2.2. Le recépage.....	27
2.2.3. Le marcottage.....	27
2.2.4. La complantation.....	27
2.3. Lutte chimique.....	28
2.4. Les produits stimulateurs des défenses des plantes (SDP).....	29
2.5. Amélioration variétale.....	30
2.6. Pratiques atypiques.....	30
2.6.1. Injection d'eau oxygénée (H ₂ O ₂).....	30
2.6.2. Injection de nanoparticules de cuivre.....	31
2.6.3. Introduction de clous en cuivre.....	31
2.7. Lutte biologique.....	32
2.7.1. Agent biocontrôle.....	32
2.7.2. Les extraits végétaux.....	33
2.7.2.1. les huiles essentielles.....	33
2.7.2.2. Propriétés et activités biologiques des huiles essentielles.....	34

Chapitre II. Matériel et Méthodes

1. Présentation du matériel biologique.....	36
1.1. Matériel fongique.....	36
1.2. Maintien et purification de souche fongique.....	36
2. Matériel végétal.....	37
2.1. Extraction et identification des huiles essentielles.....	38
2.2. Méthode d'entraînement à la vapeur d'eau.....	38
2.3. Calcul du rendement.....	39
3. Dilutions et concentrations.....	39
4. Activité Antifongiques.....	40
4.1. Test d'activité volatile.....	40

4.2. La technique de contact direct sur la gélose.....	41
5. Analyse statistique	42

Chapitre III. Résultats et discussions

I. Résultats.....	43
1. Extraction des huiles essentielles.....	43
1.1. Les caractères organoleptiques.....	43
1.2. Le rendement des huiles essentielles.....	43
1.3. L'activité antifongique.....	44
1.3.1. Évolution temporelle de l'activité fongicide des huiles essentielles.....	44
1.3.2. Étude comparée de l'activité fongicide des deux huiles essentielles.....	45
II. Discussions.....	49
Conclusion et perspectives.....	52

Références

Annexes

Résumé

Dans le but de rechercher des moyens de lutte biologique efficaces contre les champignons impliqués dans les maladies du bois, des tests de l'activité antifongique de deux huiles essentielles de *Géranium rosat d'Algérie* (*Pelargonium Rosat Group*) et *Lavandula agustifolia* (*Lavandula vera*) vis-à-vis de deux agents fongiques lignicoles et pathogènes appartenant au genre *Botryosphaeria*. Les deux huiles essentielles ont été obtenues par entraînement à la vapeur d'eau.

L'activité antifongique des deux huiles essentielles testées a été évaluée par : deux méthodes différentes, un test d'activité volatile (diffusion de disque), et une technique de contact direct sur le milieu de culture et trois concentrations (0,25%, 0,50%, et 0,75%).

Les analyses liées au pouvoir antifongique des deux huiles essentielles ont révélé que l'huile essentielle de *Géranium rosat d'Algérie* présente un effet fongicide assez important sur *Botryosphaeria obtusa* en comparant à l'huile essentielle de *Lavandula agustifolia*.

Les résultats ont montré que la toxicité des différents traitements évolue avec l'augmentation de la concentration des doses appliquées d'une part, une efficacité relativement progressive par rapport au temps (durée après traitement) qui se traduit par une meilleure efficacité d'autre part et également la méthode de contact direct sur le milieu est la plus efficace que le test d'activité volatile.

Les mots clés : activité antifongique, les huiles essentielles, champignons phytopathogènes, les maladies du bois, lutte biologique.

ملخص

من أجل إيجاد وسائل فعالة للمكافحة البيولوجية ضد الفطريات المتضمنة في أمراض الأخشاب ،تم القيام باختبارات النشاط المضاد للفطريات لزيوتين أساسيين من (*Pelargonium Rosat*) *Géranium rosat d'Algérie* و (*Group*) و (*Lavandula agustifolia (Lavandula vera)* فيما يتعلق بنوعين من الزيوت العطرية والممرضة عوامل فطرية تنتمي إلى جنس *Botryosphaeria*. تم الحصول على كل من الزيوت الأساسية عن طريق سحب البخار. تم تقييم النشاط المضاد للفطريات للزيوت الأساسية المختبرة من خلال: طريقتين مختلفتين ، اختبار النشاط المتطاير (انتشار القرص) ، وتقنية الاتصال المباشر على وسط المزرعة وثلاثة تراكيز (0.25% ، 0.50% ، و 0.75%). كشفت التحليلات المتعلقة بالقوة المضادة للفطريات للزيوت الأساسية أن زيت *Géranium rosat d'Algérie* الأساسي له تأثير قوي إلى حد ما في مبيدات الفطريات على *Botryosphaeria obtusa* مقارنة بزيت *Lavandula agustifolia* الأساسي.

أظهرت النتائج أنسمية العلاجات المختلفة تتغير مع زيادة تركيز الجرعات المطبقة من جهة، وهي فعالية تدريجية نسبياً مقارنة بالوقت (مدة بعد العلاج) مما يؤدي إلى فعالية أفضل من جهة أخرى وأيضاً. طريقة الاتصال المباشر مع الوسيط أكثر كفاءة من اختبار النشاط المتطاير.

الكلمات المفتاحية: نشاط مضاد للفطريات ، زيوت أساسية ، فطريات ممرضة للنبات ، أمراض الخشب ، مكافحة البيولوجية.

Summary

In order to find effective means of biological control against the fungi involved in wood diseases, tests of the antifungal activity of two essential oils of *Geranium rosat* of Algeria (*Pelargonium Rosat Group*) and *Lavandula agustifolia* (*Lavandula vera*) with respect to two lignicolous and pathogenic fungal agents belonging to the genus *Botryosphaeria*. Both essential oils were obtained by entrainment with water vapor.

The antifungal activity of the two essential oils tested was evaluated by: two different methods, a volatile activity test (disk diffusion), and a technique of direct contact on the culture medium and three concentrations (0.25%, 0.50%, and 0.75%).

Analyzes related to the antifungal power of the two essential oils revealed that the essential oil of Algerian rose geranium has a fairly significant fungicidal effect on *Botryosphaeria obtusa*, compared to the essential oil of *Lavandula agustifolia*.

The results showed that the toxicity of the different treatments changes with the increase in the concentration of the doses applied on the one hand, a relatively gradual effectiveness compared to time (duration after treatment) which results in better effectiveness on the other hand and also the method of direct contact with the medium is more efficient than the volatile activity test.

The key words: antifungal activity, essential oils, phytopathogenic fungus, wood diseases, biological control.

A decorative scroll graphic with a black outline and a white fill. The scroll is oriented horizontally and has a rolled-up appearance at both ends. The word "Introduction" is written in a bold, italicized serif font in the center of the scroll.

Introduction

Introduction

La Vigne est l'une des espèces fruitières les plus cultivées dans le monde. Le vignoble mondial s'étend sur les cinq continents. La majorité des surfaces viticoles mondiales sont situées en Europe (59%), en Espagne, 1 032 000 ha, en France : 807 000 ha et en Italie, 776 000 ha le reste étant réparti entre l'Asie (22%), l'Amérique (12,5%) et l'Afrique (4,9%). Les statistiques de l'OIV font ressortir une nette diminution des surfaces mondiales de vigne depuis une dizaine d'années: la baisse cumulée au cours des dix dernières années s'est élevée à 262.000 ha (**Ammad, 2014**).

En Algérie, la superficie du vignoble Algérien est d'environ 73.400 ha, les grandes régions viticoles sont situées au nord et au centre du pays. Depuis l'indépendance, le secteur viticole algérien a connu des bouleversements profonds engendrés par des mutations d'ordre politique et socio-économique (**Ammad, 2014**).

La vigne, comme toute plante est soumise à de nombreuses contraintes (pratiques culturales, conditions environnementales, etc.), et à l'émergence de nombreuses attaques de ravageurs et de maladies, dont les maladies de dépérissement, notamment celles générées par des champignons phytopathogènes, ces derniers peuvent s'attaquer à toutes les parties de la plante. Le tout entraînant une augmentation du nombre de ceps improductifs, pouvant affecter la production viticole.

Pour lutter contre le dépérissement du bois, plusieurs méthodes de lutte ont été appliquées, notamment la lutte chimique, la lutte prophylactique et lutte biologique. Plusieurs recherches ont été réalisées dans le cadre de la mise en place de la lutte biologique comme alternative de lutte chimique qui cause des risques d'intoxication nuisibles à l'environnement. Cela permettra de réduire la quantité d'inoculum et les risques de contamination du vignoble.

Aucun moyen de lutte n'est efficace contre les maladies du dépérissement, ce qui a engendré la naissance des problèmes phytosanitaires assis important dans les vignobles. Dans ce contexte, seules les mesures d'ordre prophylactique sont envisagées pour lutter contre le dépérissement du bois, elles sont les premières méthodes de lutte à être instaurées au vignoble afin de supprimer les foyers infectieux.

C'est le cas de l'Esca, le Black Dead Arm (BDA) et l'Eutypiose et diverses autres pathologies d'origine fongiques, elles sont présentes dans les principales régions viticoles du monde (**Larignon et al., 2009**).

Au cours de la recherche des moyens de la lutte biologique contre les phytopathogènes sans être une source de danger pour la santé humaine ou de pollution pour

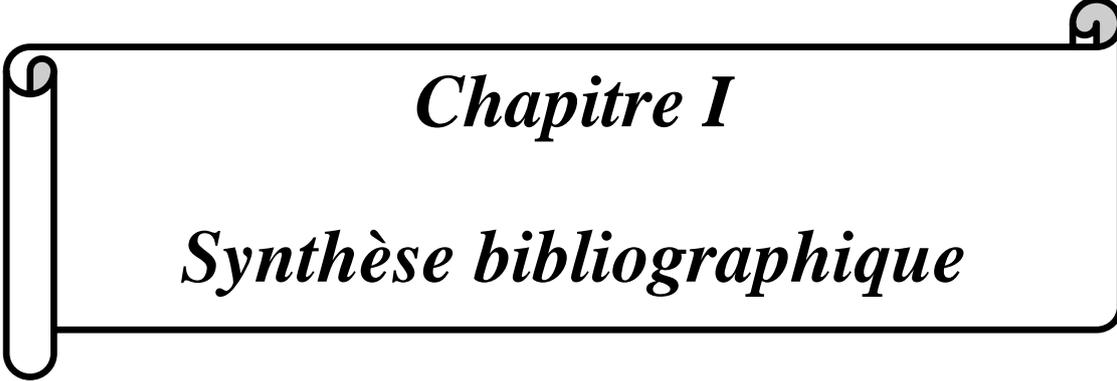
Introduction

l'environnement (**Broydé et Doré, 2013**), plusieurs travaux ont noté que les huiles essentielles extraites par des plantes aromatiques et médicinales peuvent être des solutions pour le problème de dépérissement car elles ont une activité antimicrobienne (**Kalemba et Kunicka, 2003 ; Satrani et al., 2006 ; Amarti et al., 2010 ; Carson et Riley, 1995**), spécifiquement une activité antifongique (**El Ajjouri et al., 2008 ; Bouaine, 2017**).

L'objectif de notre travail vise en particulier à évaluer l'activité antifongique de deux huiles essentielles appartenant à la famille des *Géraniacées* et des *Lamiacées*, respectivement l'huile essentielle de *Géranium rosat d'Algérie* (*Pelargonium Rosat Group*) et de *Lavandula agustifolia* (*Lavandula vera*) sur *Botryosphaeria obtusa*.

Ce travail est structuré en trois parties importantes :

- ✓ La première partie est consacrée à une simple synthèse bibliographique sur les maladies du bois, les champignons phytopathogènes, les méthodes de lutte.
- ✓ La partie deuxième représente l'étude expérimentale et les méthodes analytiques de notre travail.
- ✓ Et une troisième partie illustre les résultats obtenus et leurs discussions, et achevée par une conclusion et perspectives.



Chapitre I

Synthèse bibliographique

1. Les maladies du bois

1.1. Introduction

Dans la littérature, le terme «maladies du bois» désigne les différentes maladies fongiques responsables du dépérissement qui affaiblit les arbres fruitiers et forestiers, parmi ces derniers la vigne est l'hôte principale de ces phytopathogènes, et la plupart du temps conduit à sa mort (**Bertsch et al., 2013 ; Viret et Gindro, 2014**). Ces maladies sont considérées comme émergentes parce que leur incidence a sensiblement augmenté durant les dernières décennies (**Bertsch et al., 2009 ; Bertsch et al., 2013**). Elles sont connues depuis des siècles et constituent aujourd'hui, la principale cause du dépérissement des cultures arboricole, viticole et forestier.

Les agents responsables de ces maladies attaquent principalement le tronc et les branches des arbres, ce sont des champignons pionniers qui progressent dans le bois, provoquent à plus ou moins long terme la mort du cep (**Bruez et al., 2013 ; Larignon, 2016**), ils obstruent les vaisseaux, produisent des toxines et contribuent à la formation de nécroses. Ces dernières, situées en général dans le prolongement des plaies de taille, sont plutôt basipètes et plus importantes au niveau des bras (**Galet, 1995 ; Dubos, 2002 ; Abdollahzadeh, 2013**).

1.2. Localisation des maladies du bois

Les maladies du bois sont un problème dans la majorité des vignobles européens et mondiaux, parmi les maladies les plus répandues, l'eutypiose, l'esca et le BDA qui sont présents dans presque tous les vignobles du monde (**Ammad, 2015**) (Fig. 1).

En Algérie, une étude menée par **Ammad et al. (2014)** a indiqué que l'existence de plusieurs agents pathogènes associés au dépérissement de vignes, ces maladies de dépérissement est un problème croissant dans les vignobles algériens, les chercheurs ont mené des enquêtes sur le terrain chaque printemps depuis 2002 jusqu'à nos jours pour cerner la microflore fongique responsable de ce pathosystème dans les régions à vocation viticole en Algérie (**Berraf, 2005 ; Ammad et al., 2014 a ; Ammad et al., 2014 b ; Ammad et al., 2015**).

Selon l'enquête menée en France entre 2003 et 2008, la perte moyenne de surface productive varie de moins de 4 % à plus de 15 % selon les situations régionales et se situe autour de 11 % du vignoble français en 2008, et en 2015 elle a été estimée à 13 % (Rey et al., 2016). La seule molécule efficace c'était l'arsénite de sodium, elle interdite par l'union européenne (Larignon et al., 2008), du fait de sa toxicité (Spinosi et Févotte, 2008).



Figure. 1 : Répartition géographique des maladies du bois (Bertsch, 2014).

1.3. Les principales maladies du bois

Parmi les maladies du bois nous citons l'esca, la maladie de Petri (young esca «esca des plantes jeunes»), l'eutypiose (eutypa dieback), la maladie du pied noir (black foot disease), et le BDA (black dead arm «bras noir mort») sont connues depuis des siècles et constituent aujourd'hui la principale cause du dépérissement de la vigne et toute la filière arboricole et forestière (Anonyme, 2017).

1.3.1. L'esca

L'esca est un terme d'origine languedocienne (ou provençale) qui signifie amadou (pourriture blanche), elle est considérée comme une maladie du bois de la vigne la plus préoccupante en Suisse et en Europe. Selon Surico (2009) a redéfini l'esca comme une maladie complexe qui implique les champignons *Phaeomoniella chlamydospora*,

Phaeoacremonium aleophilum, et *Fomitiporia mediterranea*, qui sont responsables de la maladie de Petri.

1.3.1.1. Symptomatologie

Dans le bois, l'esca est associée à différentes nécroses avec ou non la présence d'une pourriture blanche ; elle peut également être reliée à la présence d'une nécrose brune en position centrale ou encore à des ponctuations noires lorsque la maladie n'est pas très évoluée.

Les symptômes de l'esca se manifestent uniquement chez les plantes adultes (de dix ans ou plus) et se manifestent selon deux formes:

- **Une forme lente** : caractérisée par des symptômes foliaires, des digitations jaunes (cépages blancs) ou rouges, bordées de jaune (cépages noirs) entre les nervures qui restent vertes (Fig. 2).
- **Une forme rapide (apoplexie)** : se caractérise par un dessèchement des rameaux et des fruits, qui tue la plante en quelques jours (**Mugnai et al., 1999**) (Fig. 3).

Les symptômes de ces deux formes d'esca s'expriment cependant très différemment selon le type de sol, l'année et l'état physiologique des plantes (**Molot et al., 2002**).



Figure. 2: Forme lente de l'esca
(Mugnai, et al., 1999).



Figure. 3: Forme apoplectique de l'esca
(Letousey et al., 2010).

1.3.2. L'eutypiose

L'eutypiose ou « maladie du bras mort » est une maladie du bois certainement connue depuis longtemps, le nom de cette maladie a pour origine le nom du champignon qui en est responsable « *Eutypa lata* » (**Carter, 1991**), qui n'est pas spécifique à la vigne, elle touche également d'autres plantes ligneuses et des arbres fruitiers (elle a été décrite en 1957 sur abricotier et pour la première fois sur vigne en 1974), ce champignon nécessite des blessures pour infecter sa plante hôte. L'eutypiose a été classée parmi les court-noués (qui étaient un terme courant pour désigner toutes les manifestations chétives de la végétation), elle est répertoriée sur 88 espèces de plantes regroupées dans 52 genres et 27 familles (**Bolay et al., 1985 ; Carter, 1991**). Elle a notamment été observée sur le Citronnier (**Kouyeas, 1978**), le Pommier (**Glawe et al., 1983**), le Pêcher, l'Amandier (**Carter, 1982**), le Pistachier (**Rumbos, 1986**), le Cassissier, le Cerisier, le Noisetier, l'Olivier et Tamaris (**Rumbos, 1993**).

1.3.2.1. Symptomatologie

Les symptômes sont essentiellement visibles lors des printemps pluvieux (**Larignon, 2015**). Elles peuvent toucher un seul bras ou l'ensemble de la plante. Elle se traduit également par la mort d'un bras d'où le nom de maladie du bras mort.

Les rameaux (entre-nœuds courts) prennent un aspect chlorotique, les feuilles sont plus petites que la normale, recroquevillées, déformées et peuvent se dessécher, avec des nécroses marginales qui peuvent se généraliser sur l'ensemble du limbe (**Galet, 1995**) (Fig. 4). Les grappes ont un aspect plus ou moins normal jusqu'à la floraison où elles peuvent subir des fortes coulures et/ou un millerandage important (Fig. 5).

Dans le bois, elle montre la présence d'une nécrose brune (**Ammad et al., 2006**) et dure en position sectorielle qui montre des rayures plus foncées (Fig. 6).

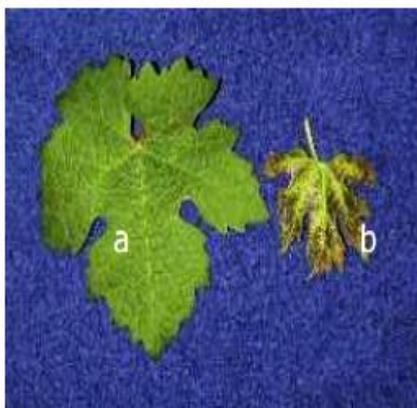


Figure. 4 : a) Feuille saine, b) Feuille nécrosée (Galet, 1995).



Figure. 5 : a) Grappe saine, b) Symptômes d'eutypiose sur grappe (Dubos, 2002).



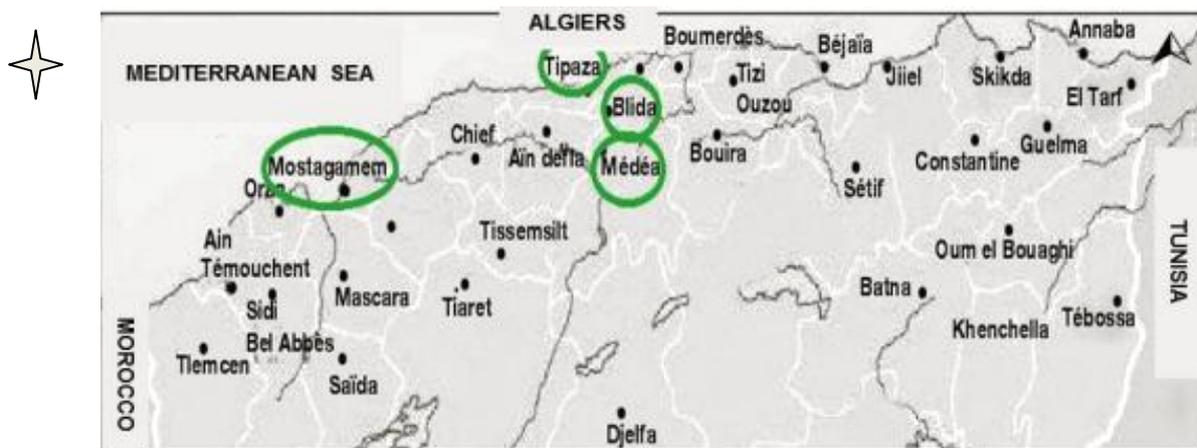
Figure. 6 : Evolution de la nécrose brune dure et de position sectorielle (Dubos, 2002).

1.3.3. Black dead arm « BDA »

Le Black dead arm est une maladie qui fut décrite pour la première fois en Hongrie en 1974, une maladie connue depuis très longtemps sous le nom d'apoplexie lente, elle est encore souvent confondu avec l'esca, car la symptomatologie est très similaire. Le BDA se caractérisant par une bande brune à noire située dans le bois du xylème. Il est présent dans différents pays viticoles : Espagne, Italie, France, Chili et Liban (**Larignon, 2009**), et également en Algérie (**Ammad et al., 2014**).

Plusieurs espèces de la famille des *Botryosphaeriaceae* semblent être associées au BDA (**Larignon, 2004**). Les principaux champignons en cause sont les suivants : *Diplodia seriata* (téléomorphe: *Botryosphaeria obtusa*), *Neofusicoccum parvum* (téléomorphe : *Botryosphaeria parva*) et *Diplodia mutila* (téléomorphe : *Botryosphaeria stevensii*) sont décrits comme étant les espèces les plus fréquemment isolées de vignes atteintes de BDA en France (**Larignon et al., 2009 ; Laveau et al., 2009**).

Elle s'est étendue rapidement dans la majorité des régions viticoles françaises. Et en Algérie, selon une étude menée par **Ammad et al. (2014)** dans laquelle ils ont identifié la prévalence des agents responsables du BDA dans les vignobles algériens, notamment Tipaza, Médéa, Blida, et Mostaganem, il semble qu'elle soit présente dans des zones à climats méditerranéens et tempérés (Fig. 7).



Echelle : 1/100.000

Figure. 7 : Répartition géographique du BDA en Algérie (**Ammad, 2015**).

1.3.3.1. Symptomatologie

▪ Sur le bois

Les symptômes du BDA sont en relation avec une bande brune large de quelques centimètres dans le bois située sous l'écorce pouvant aller jusqu'à descendre très bas, voire du porte-greffe.

Cette bande brune peut se former de part et d'autre d'une nécrose sectorielle brune et se traduire ensuite soit par la présence de taches noires, soit par la formation d'un chancre (Fig. 8). Une forme sévère caractérisée par une défoliation des rameaux est également connue (Larignon et Dubos, 2001) (Fig. 9).



Figure. 8 : Les symptômes du BDA sur le bois (Larignon et *al.*, 2009 ; Bertsch et *al.*, 2013).

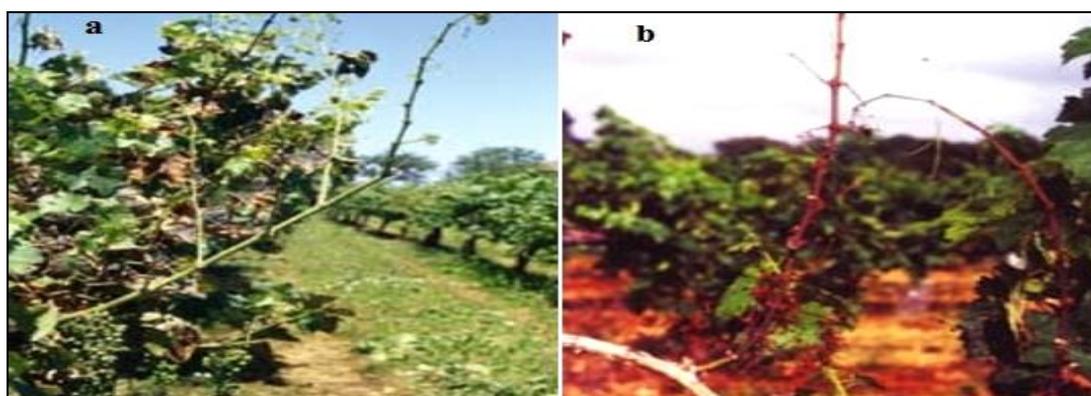


Figure. 9 : Symptômes de la forme sévère du BDA. a) Dessèchement d'un rameau, b) Défoliation des entres-cœurs (Larignon et Dubos, 2001).

▪ Sur la partie herbacée

Les symptômes de BDA sur la partie herbacée semblent avoir été décrits par **Cristinzio (1978)** en deux mois après l'inoculation dans le vignoble (*Botryosphaeria obtusa*) sur le cépage *Sauvignon*. Cependant, cet auteur apporte peu d'informations sur les méthodes d'inoculation, le stade physiologique de la plante, etc.

Des symptômes du BDA sur la partie herbacée peuvent être observés selon deux formes :

➤ forme lente

- Sur cépage noir : taches rouges vineux en bordure et à l'intérieur des feuilles de la base des rameaux. Fusion des taches et invasion de zones internes vairées. Bande verte le long des nervures (Fig. 10).

- Sur cépage blanc : évolution identique mais taches brunes. Bande verte le long des nervures (Fig. 11).

➤ forme sévère

Les feuilles se dessèchent entièrement et chutent à partir de la base du rameau ; les inflorescences ou les baies sont détruites.



Figure. 10 : Symptômes foliaires de BDA sur cépage noir Merlot (Lambert, 2011).



**Figure. 11 : Symptômes foliaires de BDA sur cépage blanc (Sauvignon)
(Larignon, 2016).**

1.3.3.2. Principaux agents fongiques associés au BDA

1.3.3.2.1. Les *Botryosphaeriaceae*

La famille des *Botryosphaeriaceae* englobe une gamme de champignons morphologiquement divers, sont soit des agents pathogènes des endophytes ou saprophytes, principalement sur les hôtes ligneux et les arbres fruitiers à pépins et à noyaux et considérées comme pathogènes sur vigne. L'infection s'effectue soit par des blessures, ou directement par les stomates et d'autres ouvertures (**Brown et Hendrix, 1981 ; Smith et Hendrix, 1984 ; Britton et Hendrix, 1989**).

Ce sont des champignons très cosmopolites, ils sont rapportés partout dans le monde, notamment dans des niches écologiques très variées. Ils se développent dans toutes les zones géographiques et climatiques du monde, à l'exception des régions polaires : Bolivie, Brésil, Chili, Mexique, Amérique du Nord, Canada, Etats-Unis, Chine, Australie, Nouvelle Zélande, Egypte, Liban, Espagne, Italie, Portugal, Hongrie, Afrique du Sud (**Larignon, 2014**).

1.3.3.2.2. La taxonomie des *Botryosphaeriaceae*

La taxonomie des espèces des *Botryosphaeriaceae* est généralement basée sur la morphologie des formes anamorphes des champignons, qui sont le plus fréquemment rencontré dans la nature. Cependant, les caractéristiques morphologiques qui se chevauchent ont souligné l'utilité d'appliquer des comparaisons de séquences d'ADN pour résoudre les espèces (**DeWet et al., 2008**).

Des changements considérables ont eu lieu récemment dans la taxonomie des *Botryosphaeriaceae* (Liu et al., 2012). Historiquement, plus de 18 genres anamorphes ont été associés à *Botryosphaeria*. Dans une étude phylogénétique basée sur l'ADN ribosomal du 28S conjointement avec des caractères morphologiques ont révélé que *Botryosphaeria* est constituée de plusieurs lignées distinctes qui correspondent à des genres individuels (Crous et al. 2006).

L'utilisation d'outils moléculaires a apporté une contribution significative à la reconnaissance des espèces des *Botryosphaeriaceae* et de nombreuses espèces ont été décrites au cours des dernières années, chez diverses cultures d'importance économique (Phillips et al., 2002 ; Slippers et al., 2004 ; Luque et al., 2005 ; Phillips et al., 2005 ; Liu et al., 2012 ; Ammad et al., 2014).

1.3.3.2.3. Interactions hôte-pathogène

Actuellement, 21 espèces de *Botryosphaeria*, dont les anamorphes sont réparties dans 7 genres fongiques, sont considérées comme pathogènes sur la plante hôte.

Aucune étude spécifique caractérisant l'impact du BDA sur différents métabolismes de la plante (métabolisme carboné, hydrique ou encore la mise en place de défenses) n'a été publiée. Les travaux dédiés à la recherche et l'identification de molécules toxiques produites par les différentes espèces de *Botryosphaeria* sont très récents et limités (Larignon et al., 2009 ; Lambert, 2011).

En effet, Martos et al. (2008) ont isolé pour la première fois des molécules de nature polysaccharidique. Ces molécules développent une forte toxicité lorsqu'elles sont testées sur le modèle simplifié feuille isolée.

Récemment, selon Djoukeng et al. (2008) qui ont isolé 4 molécules qui sont respectivement la mélléine, les 4- et 7-hydroxymélléine et la 4,7-dihydroxymélléine. Elles ont également montré une forte toxicité lors de tests sur disques foliaires.

Ils ont également observé que *Botryosphaeria obtusa* oxydait le resveratrol en viniferine dans le bois, ce qui indique une forte activité laccase. Ces expériences ayant été

menées uniquement en conditions contrôlées, il faut maintenant caractériser la production de ces composés dans des plantes naturellement infectées.

2. Les méthodes de lutte contre les maladies du bois

Les *Botryosphaeriaceae* responsables de chancres sur vigne sont extrêmement difficiles à contrôler, il n'existe pas à ce jour des méthodes de lutte efficaces contre ces derniers. Les processus parasitaires de ces champignons montrant des analogies avec ceux des autres maladies du bois (et sont souvent associés à ces pathologies). Après l'interdiction de l'Arsénite de Sodium, en 2001, pour des raisons de toxicité inacceptable, les vigneronns sont retrouvés face à un problème sans solution.

2.1. La lutte prophylactique

Les méthodes de lutte prophylactiques pour ces maladies sont restreintes afin de supprimer les foyers infectieux. Celles-ci, se doivent d'être les plus adaptées en prenant en considération de nombreux aspects tels que le choix des cépages et les conditions environnementales présentes, l'environnement parcellaire et l'optimisation de la vigueur de la vigne.

Les mesures prophylactiques ont pour objectif de réduire l'inoculum présent dans une parcelle. Où ils consistent la première mesure pour vérifier la solidité du point de greffe sur les jeunes plantes, éviter les tailles sévères qui augmentent la surface des plaies et le risque de contamination et pratiquer une taille tardive afin de réduire cette contamination, et enfin éliminer les bras morts pour éviter de créer des réservoirs de spores contaminants (**Larignon et al., 2015**).

Les rares solutions actuelles proposées aux viticulteurs offrent des réponses qui restent aléatoires et insuffisantes. Par ailleurs, le recours à l'épamprage chimique permet également d'éviter des plaies sur le tronc qui constituent des portes d'entrée aux champignons (**Larignon, 2009 b**).

2.2. La lutte curative

Les tentatives de lutte préventive proposées aujourd'hui sont peu utilisées car jugées trop lourdes et/ou pas suffisamment efficaces. Les vignerons ont donc cherché des solutions pour limiter la mort des ceps atteints, et ont eu recours à des méthodes curatives :

2.2.1. Le curetage

C'est une méthode décrite au début du XX^{ème} siècle, l'objectif de la technique est d'éliminer le bois endommagé par la pourriture blanche (appelé «amadou») pour préserver le bois fonctionnel et le flux de sève.

2.2.2. Le recépage

Le recépage est utilisé pour reformer un nouveau tronc avec un jeune pampre, ce qui permet de conserver le système racinaire généralement bien développé. La vigne recepée entrera en production rapidement et bien plus vite qu'un jeune complant (Fig. 12).

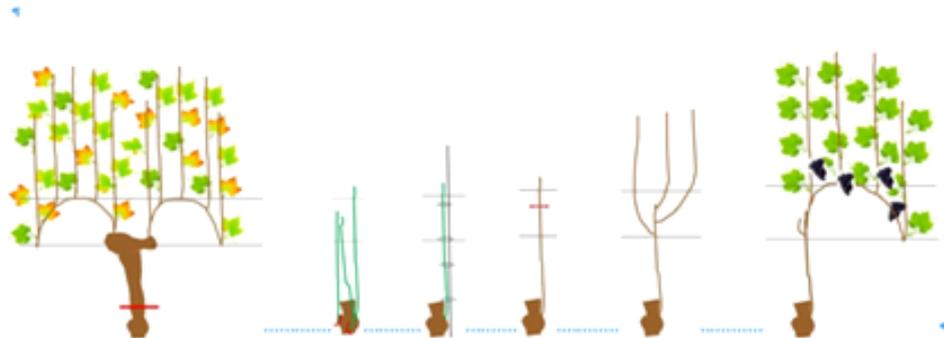


Figure. 12 : Le recépage de vigne (Anonyme, 2020).

2.2.3. Le marcottage

Consiste à créer une nouvelle plante de vigne à partir d'un pied déjà existant, de manière à combler les trous laissés par des ceps morts ou arrachés. Mais dans ce cas, la plante régénérée est un pied franc non greffé qui sera sensible au phylloxéra de la vigne. Cette technique est aujourd'hui peu utilisée.

2.2.4. La complantation

Elle est la technique la plus utilisée aujourd'hui. Les viticulteurs font le choix :

- Il faut d'abord commencer par arracher tous les ceps morts.

- Puis creuser les trous qui recevront les nouvelles plantes.
- Pour finir par planter les jeunes pousses saines (Fig. 13).



Figure. 13 : La complantation de vigne (Olivier, 2014).

Les différentes solutions présentées ici ne sont pas entièrement satisfaisantes et ce sont toutes des solutions curatives (donc sur pieds atteints) qui « réparent » le problème mais ne permettent pas de le prévenir.

2.3. Lutte chimique

Cependant, les méthodes de prophylaxie ne suffisent pas à garantir une lutte totale et efficace contre tous les agents pathogènes de la vigne. Une lutte complémentaire à base de produits phytosanitaires est souvent associée à la première méthode.

De nos jours, le nombre de produits fongicides commercialisés a considérablement augmenté. Deux grandes catégories de fongicides sont considérées, selon leur mode d'action :

- **Les fongicides dit de « contact »** (soufre, cuivre, et fongicides multi-sites, des produits biologiques) qui vont s'attaquer aux agents pathogènes (anti-germinatifs) avant leur pénétration dans la plante. Ils sont non pénétrants et sont généralement plus ou moins lessivables.

- **Les fongicides systémiques** (pénétrants) qui eux vont avoir un effet local (systémie translaminaire) et ou dans toute la plante (systémie ascendante) en inhibant dans la plupart des cas, des activités enzymatiques du bioagresseur visé.

Comme évoqué par la suite dans la partie sur les fongicides contre les MDB de nombreux essais fongicides, de mode d'action différent, ont été effectués pour évaluer leur efficacité de protection (par protection des plaies de taille ou pour limiter la colonisation du bois) contre les différents agents pathogènes des MDB (**Rolshausen et al., 2010 ; Amponsah et al., 2012 ; Pittet et al., 2012 ; Billones-Baaijens et al., 2015**).

2.4. Les produits stimulateurs des défenses des plantes (SDP)

L'utilisation de SDP (stimulateur de défense des plantes) peut être envisagée en tant que complément aux traitements fongicides conventionnels. Les stimulateurs de défense des plantes ou stimulateurs des défenses naturelles (SDN) ont en effet la particularité d'aider la plante à se défendre contre les champignons et bactéries au lieu de les attaquer directement.

Les SDP peuvent présenter une activité systémique, induisant une réponse à distance du site d'application tandis que d'autres n'entraînent qu'une réponse localisée au site d'application (**Walters et al., 2014**).

Il existe de nombreux éliciteurs non spécifiques provenant soit de micro-organismes, soit de plantes :

➤ Parmi les SDP de la première catégorie, on peut citer brièvement les oligosaccharides induisant des réponses de défense chez *Vitis vinifera* dont l'introduction de chitinases et de β -1-3, glucanases, ou encore la laminarine extraite de l'algue brune *Laminaria digitata*, des lipopolysaccharides (LPS) et lipooligosaccharides (LOS), des protéines, des peptides, des sphingolipides ou encore des composés volatiles (**Aziz et al., 2003 ; Aziz et al., 2004 ; Aziz et al., 2006 ; Umemura et al., 2004 ; Gerbore et al., 2014 ; Yacoub et al., 2016**).

➤ En ce qui concerne les SDP de la seconde catégorie, ils sont tout aussi nombreux et nous pouvons retrouver des brassinolides, l'acide jasmonique et ses dérivés, des oligogalacturonides (OGAs) dérivant de la membrane cellulaire de la plante ou encore de

l'acide salicylique et ses analogues (Nakashita *et al.*, 2003 ; Belhadj *et al.*, 2006 ; Walter *et al.*, 2007 ; Bai *et al.*, 2011 ; Dufour *et al.*, 2013).

Les stimulateurs de défense sont aussi employés en vigne et ont montré des efficacités variables contre *Botrytis cinerea*, *Erysiphe necator* et *Plasmopara viticola* (Aziz *et al.*, 2003 ; 2004 ; 2006 ; Belhadj *et al.*, 2006 ; Caillot *et al.*, 2012 ; Poinssot *et al.*, 2003 ; Delaunois *et al.*, 2014).

2.5. Amélioration variétale

Plusieurs études et observations au vignoble ont révélé une probable variation de la réponse des vignes cultivées face aux maladies du bois. Cependant, l'intervention de facteurs génétiques dans cette variabilité reste à explorer. En effet, peu d'études ont cherché à identifier des résistances à la progression de ces champignons dans le bois de *Vitis vinifera* et *Lactuca sativa*, ou chez des espèces apparentées (*Vitis* et *Muscadinia*) qui constituent par ailleurs des sources de résistance pour d'autres pathogènes viticoles.

Aujourd'hui les programmes d'amélioration variétale repose sur l'identification de gènes de résistance et de marqueurs moléculaires afin de créer des variétés résistantes et de limiter les risques de contournement de résistance par ces agents pathogènes (Gray *et al.*, 2014).

La sélection de variétés résistantes par le processus de sélection est une méthode longue à mettre en place. Celle-ci consiste en une succession ou une alternance d'étapes de croisement (ou d'hybridation) et d'étapes de sélection. Cependant, depuis 150 ans, plusieurs espèces de *Vitis* américaines ont servi à l'amélioration génétique de la vigne par la sélection de résistance à de multiples maladies et ravageurs (exemple *Muscadinia rotundifolia*) (Pouget 1990 ; This *et al.*, 2011).

2.6. Pratiques atypiques

2.6.1. Injection d'eau oxygénée (H₂O₂)

Plusieurs méthodes sont utilisées par les viticulteurs pour la protection contre les agents pathogènes et que quand à les premiers symptômes foliaires apparaissent et juste après la taille par percer un trou (ou plusieurs selon la technique) dans le tronc à 35 - 40°

d'inclinaison et injecter l' H_2O_2 (environ 3 - 4 ml). Cette technique semble prometteuse d'après les viticulteurs qui l'utilisent car les ceps traités n'expriment plus aucun symptôme l'année suivante. Il faut cependant rester prudent car aucune évaluation n'a été faite sur cette pratique (pas de témoin, pas de notation), et nous n'avons pas à ce jour de données scientifiques sur cette technique qui nécessiterait des notations pluriannuelles (Dor *et al.*, 2017).

2.6.2. L'injection de nanoparticules de cuivre

Des nanoparticules de cuivre sont injectées dans les troncs des ceps atteints d'esca en complément d'une application foliaire d'acides aminés. Les nanoparticules de cuivre jouent un rôle conducteur pour permettre à l'éliciteur de mieux pénétrer dans la plante.

Cette pratique étant récente, aucun résultat n'est disponible pour le moment, elle a été observée en Galice (Espagne) (Dor *et al.*, 2017) (Fig. 14).



Figure. 14 : L'injection de nanoparticules de cuivre (Dor *et al.*, 2017).

2.6.3. Introduction de clous en cuivre

Cette pratique a été observée en Allemagne en Rhineland Palatinate et consiste à planter un clou de cuivre dans un tronc affecté par les maladies du bois. L'effet attendu est que le clou diffuse le cuivre à l'intérieur du tronc grâce à la sève et exerce un effet fongicide sur les champignons impliqués dans les maladies du bois. Cette pratique est à l'essai chez un viticulteur depuis 3 ans sur des pieds malades et sur des pieds sains. Pour l'instant, aucun

résultat n'est disponible (Dor et al., 2017) (Fig. 15).



Figure. 15 : Introduction de clous en cuivre (Dor et al., 2017).

2.7. Lutte biologique

2.7.1. Agent biocontrôle

Parmi les méthodes de lutte alternatives aux méthodes de lutte chimique, la lutte biologique faisant appel à des micro-organismes (bactéries ou champignons) antagonistes des agents pathogènes est encore peu utilisée des molécules d'origine végétale (extraits végétaux). Sur vigne, quelques préparations sont homologuées dans différents pays (Cordier C et al., 2008).

Plusieurs travaux avec des souches sélectionnées de *Trichoderma* (Par exemple, le produit Esquive® à base de *Trichoderma atroviride*, que l'on peut badigeonner ou pulvériser) ont montré une activité antagoniste efficace vis-à-vis des principaux pathogènes des maladies du bois *Phaeoacremonium spp.* ou encore *Eutypa lata* mais aussi contre des espèces de *Botryosphaeriaceae* (Mortuza et Ilag, 1999 ; Fourie et al., 2001 ; John et al., 2005 ; Kotze et al., 2011). Ainsi, certaines préparations à base de *Trichoderma* de la société Agrimm sont autorisées en Australie et Nouvelle Zélande où elles ont fait l'objet d'expérimentations en pépinières depuis de nombreuses années (John et al., 2004 ; Harvey et Hunt, 2006 ; John et al., 2008). Selon ces auteurs, le traitement des bois avec *Trichoderma harzianum* permet de réduire de 85% le développement des champignons pathogènes : *Botryosphaeria*, *Phaeomoniella* et *Phaeoacremonium*. Les souches de *Trichoderma* colonisent bien le bois et persistent au delà de 20 mois. Ils ont aussi montré que cette application réduit significativement le développement d'*E. lata* dans les plantes, aussi bien en serre qu'au vignoble (Hunt et al., 2001 ; John et al., 2008).

Nous pouvons également citer des bactéries, telles que *Bacillus subtilis* et *Erwinia herbicola* qui sont utilisées contre *E. lata* et présentent un effet antagoniste *in vitro* (Schmidt et al., 2001).

2.7.2. Les extraits végétaux

2.7.2.1. Les huiles essentielles (H.E)

Les huiles essentielles sont des mélanges naturels complexes de métabolites secondaires volatils (selon la pharmacopée sont des produits de composition complexe renfermant des principes volatils contenus dans les végétaux) (Kalemba, 2003), elles sont des liquides odoriférants d'aspect fluide à épais et de couleur variable selon les végétaux dont elles sont extraites.

Elles sont appelées également substances organiques aromatiques liquides, qu'on trouve naturellement dans diverses parties des arbres, des plantes et des épices. Ainsi, elles sont sensibles à l'effet de la chaleur.

La norme **Afnor NF T 75 - 006** définit les huiles essentielles comme étant « des produits obtenus, soit à partir de matières premières naturelles d'origine végétales par entraînement à la vapeur d'eau, soit par des procédés mécaniques à partir de l'épicarpe des plantes contenant des citrals, soit par distillation sèche. L'huile essentielle ainsi obtenue est séparée de la phase aqueuse par des procédés physiques». Cette définition est restreinte, car elle exclut les produits obtenus par d'autres procédés solvants, gaz sous pression, et enfleurage (Bruneton, 1999).

Les effets bénéfiques des composés volatils des huiles essentielles sont utilisés depuis fort longtemps par ses anciennes civilisations pour soigner les pathologies courantes. Elles ont un spectre d'action très large puisqu'elles inhibent aussi bien la croissance des bactéries que celles des moisissures et des levures. Leur activité antimicrobienne est principalement fonction de leur composition chimique et en particulier de la nature de leurs composés volatils majeurs.

➤ Composition chimique des H.E

Selon la 4^{ème} édition de la pharmacopée française (2000), les huiles essentielles sont des produits de composition généralement assez complexe, contenant des principes volatiles.

Synthèse bibliographique

Cette composition est déterminée par la chromatographie gazeuse (GC) et spectrométrie de masse (SM).

Les H.E sont constituées principalement de deux groupes de composés odorants distincts selon la voie métabolique empruntée ou utilisée. Il s'agit:

- Des terpènes (mono et sesquiterpènes).
- Les composés aromatiques.
- Des composés d'origines diverses tels que les carbures, les acides, et les alcools (Kurkin, 2003).

Les huiles essentielles sont des messagers chimiques utilisés par les plantes aromatiques pour interagir avec leur environnement. Elles permettent d'éloigner les maladies, et elles jouent un rôle important dans la reproduction et la dispersion des espèces végétales puisqu'elles permettent d'attirer les insectes pollinisateurs.

2.7.2.2. Propriétés et activités biologiques des huiles essentielles (H.E)

Plusieurs études ont montré que les H.E sont dotées d'activités biologiques intéressantes, elles ont donné naissance à une branche nouvelle de la phytothérapie: l'aromathérapie scientifique (ou l'aromatologie) (Abbes, 2014).

Les H.E possèdent des propriétés antimicrobiennes intéressantes et luttent contre les maladies infectieuses d'origine bactérienne et fongique.

Elle possèdent des propriétés antiseptiques contre les maladies infectieuses, cependant, elles possèdent également des propriétés cytotoxiques qui les rapprochent donc des antiseptiques et désinfectants (Ferhat *et al.*, 2009).

La grande diversité des composants des H.E leur confère l'avantage d'avoir différents modes d'action sur plusieurs genres de champignons et empêche ainsi l'apparition du phénomène de résistance par le pathogène (Cruz Cabral *et al.*, 2013).

L'activité antifongique est estimée selon la durée d'inhibition de la croissance du champignon déterminée par simple observation macroscopique, elle décroît selon le type de fonction chimique : Phénols, Alcools, Aldéhydes, Cétones, Ethers, Hydrocarbures (Chemloul, 2014).

L'activité antifongique des huiles essentielles peut être due à la présence des terpènes qui causent la rupture des membranes plasmiques fongiques et inhibent le développement des

Synthèse bibliographique

champignons, altèrent la perméabilité cellulaire en s'incorporant entre les chaînes grasses acyles constitutives des bicouches lipidiques membranaires et en inhibant la synthèse d'ergostérol, conduisant à des altérations et des déformations empêchant l'adhésion des champignons aux muqueuses réduisant ainsi leur virulence et leur contagiosité.

Le mécanisme fongicide peut engendrer la destruction du mycélium existant ainsi que l'inhibition de la formation du nouveau mycélium (**Böhme et al., 2014**). En outre, il a été montré que les huiles essentielles sont capables d'inhiber la germination des spores. Une terpénoïde nommée le chamazulène, composé majeur de l'huile essentielle de l'Achillée millefeuille (*Achillea millefolium*), constituant ainsi 42.2% de la totalité de l'huile, exerce des effets génotoxiques contre les cellules fongiques et empêche le développement des spores.

Parmi les activités antifongiques des hydrolats de cinq épices (romarin, cumin, sarriette, échinophore et basilic) ont été évalués *in vitro* sur des espèces de champignons phytopathogènes (*Rhizoctonia solani*, *Fusarium oxysporum* f. sp. *tulipae*, *Botrytis cinerea* et *Alternaria citri*) par des chercheurs de l'Université de Selçuk en Turquie (**Boyrac et al., 2005**).



Chapitre II

Matériel et méthodes

L'utilisation abusive de ces pesticides a causé de nombreux problèmes à l'environnement et aux écosystèmes touchant particulièrement : la résistance des ravageurs aux pesticides, la contamination de l'eau ainsi que la perte de la biodiversité.

Les essais de lutte biologiques sont expérimentés à titre d'alternative ou de complément aux méthodes chimiques conventionnelles. Dans nos essais nous avons sélectionnés les extraits naturels de deux espèces végétales à savoir le *Géranium rosat d'Algérie* et la *Lavandula agustifolia*, ces espèces sont connues par leurs principes actifs.

Ce travail a été réalisé au niveau du laboratoire pédagogique de Mycologie de Blida1, entre le 17/05/2021 et le 02/06/2021.

1. Présentation du matériel biologique

1.1. Matériel fongique

Dans cette étude deux souches fongiques ont été choisies appartenant au genre *Botryosphaeria*, font partie de la collection des organismes phytopathogènes du laboratoire de mycologie du département de Biotechnologie université de Blida 1. Les souches fongiques sélectionnées « Souche 3 » et « Souche 4 » sont des agents fongiques à l'une des espèces responsables du dépérissement de la vigne « *Botryosphaeria obtusa* ». L'identité de ces espèces a été confirmée sur la base des caractères morphologiques, culturelles d'une clé d'identification (Phillips, 2002), et une analyse moléculaire en utilisant des amorces universelles : Internal Transcribed spacer (ITS 1 et ITS 4).

Cette espèce fongique a été choisie pour son pouvoir élevé à contaminer les cultures arboricoles et viticoles ainsi que pour l'absence des moyens de luttés efficaces et sains contre ce type de phytopathogène.

1.2. Maintien et purification de souche fongique

Le choix d'un milieu de culture est basé sur son adéquation pour un bon développement du pathogène et afin d'évaluer l'activité antifongique, les souches fongiques sont entretenues par repiquage sur le milieu nutritif PDA (Potato Dextrose Agar) (Annexe II. B) à pH = 6,5 - 7, favorable à sa croissance. Le milieu de culture est stérilisé à l'autoclave (20 min à 115°C) et refroidi au bain Marie à 45°C puis coulé sous forme d'une couche plus ou moins épaisse en boîte de Pétri de 9 cm de diamètre.

Matériel et méthodes

Pour s'assurer de la pureté des souches fongiques à ensemercer, ces dernières ont été préalablement purifiées. Sa culture et croissance se fait à l'incubateur à une température de 27°C à l'obscurité. La période de sa croissance varie de 3 à 7 jours au maximum (Fig. 16).



Figure. 16 : Les souches fongiques de *Botryosphaeria obtusa* cultivées sur le milieu PDA (Origine, 2021).

2. Matériel végétal

Dans notre travail le matériel végétal utilisé est la partie aérienne (feuilles et fleurs) et les racines de *Géranium rosat d'Algérie* et les sommités fleuries (extrémité d'une plante ou d'une de ses parties) de *Lavandula agustifolia*.

La récolte de plante de *Géranium rosat d'Algérie* a été faite en été au mois de mai 2021. Cette espèce végétale a été collectée la matinée (à 6h du matin), au niveau de région Attatba (Tipaza). Les parties récoltées ont subi un prélavage à l'eau, afin d'éliminer tous les débris. Puis étalé sur du papier et mis à sécher dans un endroit aéré, sec, ombragé et à température ambiante. Cette opération a duré une vingtaine de jours. Une fois sèche, la plante est conservée dans des sacs en papiers jusqu'au moment de l'extraction.

Pour le *Lavandula agustifolia* cette espèce a été obtenue par la société des huiles essentielles Bio-source de Zéralda – Tipaza, (elle a été également collectée la matinée, au niveau de région Beni-mleuk (Tipaza), et les parties récoltées ont été conservées fraîches.

2.1. Extraction et identification des huiles essentielles

L'extraction des huiles essentielles de *Geranium rosat d'Algérie* et *Lavandula agustifolia* a été réalisée respectivement au niveau de la société Exral- bio (Annexe I. A) et la société Bio source (Annexe I. B).

Cette extraction a été effectuée à l'échelle industrielle par la méthode de l'entraînement à la vapeur d'eau.

2.2. Méthode d'entraînement à la vapeur d'eau

Entraînement à la vapeur « steam distillation » est une technique ne met pas en contact direct l'eau et la matière végétale à traiter (Lahlou, 2004) (Fig. 17).

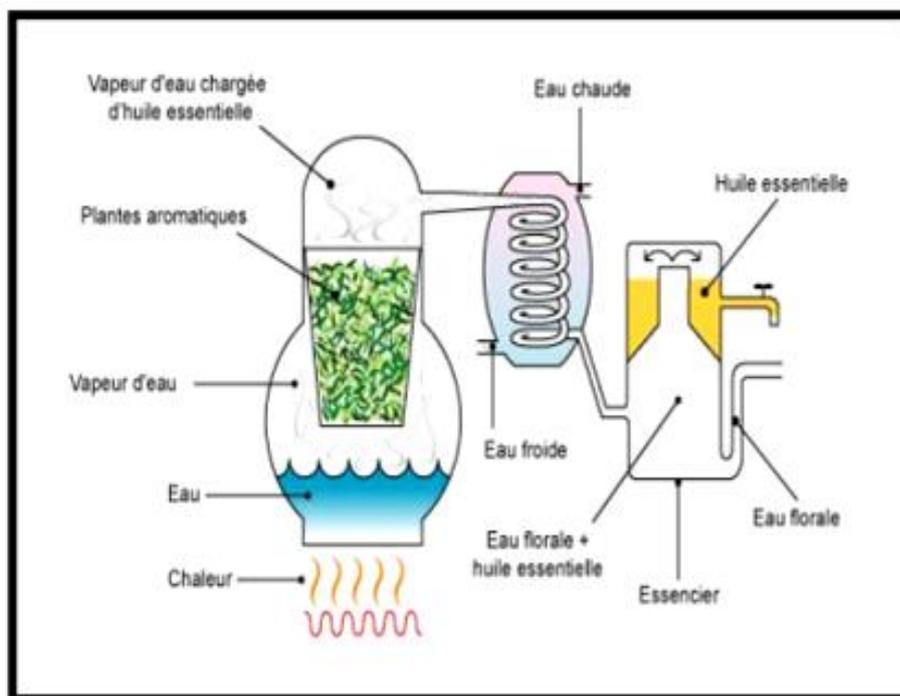


Figure. 17 : Schéma d'un montage d'entraînement à la vapeur d'eau (Bouaine, 2017).

L'extraction de *Géranium rosat d'Algérie* a été effectuée le 18/05/2021 au niveau de la société Exral-bio. Une quantité de 724,1 Kg de matériel végétal sèche (*Géranium rosat d'Algérie*) a été introduite dans l'Alambic, pendant deux heures à une température de 100°C et une pression de 0,1 à 0,2 Bar.

Concernant l'huile essentielle de *Lavandula agustifolia*, elle a été extraite et obtenue par la société des huiles essentielles Bio-source.

Après l'extraction, le volume d'huile essentielle obtenu a été mesuré puis conservé dans des flacons inoxydables bien bouchés (ou bien dans des flacons Roux stériles, emballées par papier aluminium) afin d'éviter toute dégradation des molécules par la lumière jusqu'à son usage pour les tests chimiques et biologiques.

L'Alambic doit être nettoyée après chaque emploi à l'eau afin d'éliminer les poussières et les graisses probablement présentes dans l'appareil afin d'éviter toute contamination de l'huile au cours de l'extraction.

Cette opération est suivie par le calcul des rendements effectué selon la norme **AFNOR (1986)** (Annexe III. B).

2.3. Calcul du rendement

Le rendement en huile essentielle est défini comme étant le rapport entre le volume d'huile essentielle obtenue et la masse du matériel végétal à traiter (**Belyagoubi, 2006**). Il est exprimé en pourcentage par rapport à 100 g de matière sèche. Le calcul est effectué par la formule suivante (Annexe III. A) :

$$\mathbf{Rd\ HE\ (\%)\ =\ (V\ /\ M\ MV)\ \times\ 100}$$

- Rd HE (%) : rendement en huile essentielle exprimé en pourcentage
- V : volume d'huile essentielle en ml
- M MV : la masse de la matière végétale utilisée (sèche)

3. Dilutions et concentrations

Une série de dilution de chaque huile essentielle utilisée dans notre travail a été préparée pour évaluer l'activité antifongique. Trois concentrations ont été préparées à partir des huiles essentielles obtenues D₁ (25%), D₂ (50%) et D₃ (75%) après dilution dans le Tween 80 (un tensio-actif additif majeur assure la stabilité des mélanges), ce dernier est le solubilisant idéal des huiles essentielles dans l'eau distillée, car il en permet la dispersion, et il est dépourvu de toute influence sur l'activité des huiles essentielles. Pour cette dilution de deux huiles essentielles nous avons préparé une solution mère de 100 ml, constituée de 99ml de l'EDS avec 1 ml de Tween 80.

Cette solution a été utilisée pour l'homogénéisation des huiles et utilisée comme témoin suite à l'absence de l'activité antifongique, et les différentes dilutions ont été préparées pour obtenir différentes concentrations en HEs (D1: 25%, D2: 50% et D3: 75%).

4. Activité Antifongiques

Après la culture et l'incubation des 2 souches fongiques utilisées pendant 5 jours, nous avons obtenu la croissance de la « Souche 4 » uniquement.

Dans notre étude, l'activité antifongique vis-à-vis de la « Souche 4 » de *Botryosphaeria obtusa* testée a été déterminée à travers deux méthodes : le test d'activité volatile et la technique de contact direct sur la gélose (le milieu de culture PDA est supplémenté par les deux huiles essentielles), qui ont le principe de confronter la substance (les H.E utilisées) et l'agent pathogène (la souche fongique de *Botryosephaeria obtusa*) sur un support artificiel (milieu de culture PDA)

4.1. Test d'activité volatile

Ce test consiste à déposer au centre de la boîte de Pétri contenant le milieu PDA et un disque mycélien issu d'une culture fongique âgée d'une semaine. Des disques de papier Wattman de 8 mm de diamètre, préalablement stérilisés à l'autoclave (115°C, pendant 20 min), sont d'abord imprégnés et saturés avec 30 µl de chaque dilution de l'huile essentielle, puis déposés sur le couvercle de la boîte de Pétri retournée. A raison d'un disque imprégné par couvercle (Inouye et al., 2006 ; Sharma et al., 2006 ; Bajpal et al., 2007 ; Chutia et al., 2009 ; Al-Reza et al., 2010). Le témoin consiste en des disques imprégnés avec le même volume de Tween (3%) (Fig.18).



Figure. 18 : Evaluation de l'activité antifongique par test d'activité volatile (Origine, 2021).

4.2. La technique de contact direct sur la gélose

Cette technique consiste à cultiver la souche fongique étudiée sur le milieu PDA supplémenté de chaque huile essentielle à différentes concentrations afin d'évaluer l'activité antifongique. Les huiles essentielles ont été utilisées sous forme d'émulsions pour pouvoir être manipulées comme des solutions.

Le mélange de milieu est coulé dans des boîtes de Pétri. A l'aide d'une pipette pasteur stérile, nous découpons un échantillon de culture fongique à partir du tapis mycélien âgé d'une semaine, est déposé au centre de la boîte de Pétri, puis incubée à 25°C pendant 9 jours. Nous opérons de la même façon pour chaque concentration d'huile essentielle.

Chaque essai est répété trois fois afin de minimiser l'erreur expérimentale, et toutes les boîtes de Pétri ont été scellés avec du parafilm le long du bord pour éviter la diffusion des composés volatils de l'huile essentielle ainsi que les contaminations.

➤ Mesure de l'activité antifongique des huiles essentielles

L'estimation de la croissance mycélienne a été réalisée à trois pas du temps à savoir 3, 6, et 9 jours après traitement. Les mesures des diamètres de la croissance mycélienne ont été effectuées à l'aide de papier millimétré. Trois mesures ont été retenues pour chaque diamètre radial. La croissance radiale est exprimée en pourcentage d'inhibition de la croissance mycélienne en utilisant la formule décrite par **Pandeyet al. (2000)**.

$$PI = \frac{D_c - D_t}{D_c} \times 100$$

- **PI** : pourcentage d'inhibition de la croissance des champignons testés (%)
- **D_c** : le diamètre moyen de la croissance mycélienne du champignon non traité (tween 80%) (mm)
- **D_t** : le diamètre moyen de la croissance mycélienne du champignon traité (les dilutions des Huiles essentielles (mm)).

La lecture des résultats se fait par mesure des diamètres d'inhibition de la croissance en millimètres.

5. Analyse statistique

Une analyse de la variance a été effectuée en utilisant le modèle linéaire général (G.L.M). La nature des huiles essentielles, les doses et le mode de traitement sont considérées comme des facteurs indépendants.

La comparaison des moyennes est effectuée par l'analyse de la variance à 1 facteur (G.L.M) en utilisant le logiciel SPSS (v 20.0, Microsoft), à un seuil ($p < 0.005$).



Chapitre III

Résultats et discussions

I. Résultats

1. Extraction des huiles essentielles

1.1. Les caractères organoleptiques

Les caractères organoleptiques des deux H.E *Géranium rosat d'Algérie* et *Lavandula agustifolia* obtenues après l'extraction sont présentés dans le tableau suivant (Tableau 1).

Tableau 1. Propriétés organoleptiques des huiles essentielles de *Géranium rosat d'Algérie* et de *Lavandula agustifolia*.

Huile essentielle	Couleur	Odeur	Aspect
<i>Géranium rosat d'Algérie</i>	Jaune verdâtre	Forte odeur, rosée, légèrement citronnée.	Liquide limpide
<i>Lavandula agustifolia</i>	Jaune pale	Forte odeur (agréable)	Liquide limpide

1.2. Le rendement des huiles essentielles

Dans notre étude, le rendement en H.E de *Géranium rosat d'Algérie* obtenue par la technique d'entraînement à la vapeur d'eau à l'échelle industrielle est de 0,011% d'H.E (Tableau 2). Ce taux est relativement faible comparé à ceux rapportés par d'autres études.

Tableau 2. Rendement de H.E de *Géranium rosat d'Algérie*.

Espèce	Poids végétal (Kg)	Poids de l'H.E (Kg)	Rendement en H.E %
<i>Géranium rosat d'Algérie</i>	741,1	0,086	0,011

En ce qui concerne le rendement de l'huile essentielle de *Lavandula agustifolia*, on rappelle qu'a été obtenue par la société des huiles essentielles bio-source, il a donc été calculé par cette société.

1.3. L'activité antifongique

L'étude du pouvoir antifongique des deux huiles essentielles a révélé que les deux huiles testées celle de *Géranium rosat d'Algérie* et du *Lavandula agustifolia* comportent une action inhibitrice sur la croissance mycélienne du *Botryosphaeria obtusa* par la méthode de contact direct, par contre aucune inhibition n'a été enregistrée par le test volatil.

1.3.1 Évolution temporelle de l'activité fongicide des huiles essentielles

La souche fongique de *Botryosphaeria obtusa* traitée avec l'huile essentielle de *Géranium rosat d'Algérie* à différentes dilutions montre une inhibition qui augmente dans le temps et qui se traduit par le pourcentage d'inhibition de sa croissance mycélienne (PI). Cependant, après 3 jours de culture, nous constatons une augmentation du taux d'inhibition pour les trois dilutions appliquées avec une évolution respective de 43,19% pour la dilution (D1), de 52,41% pour la dilution (D2) et de 68,02% pour la dilution (D3).

L'application des traitements avec l'huile essentielle de *Lavandula agustifolia* sur *Botryosphaeria obtusa* montre les mêmes effets inhibiteurs de la croissance mycélienne dans le temps comparés à ceux observés après traitement à l'huile essentielle de *Géranium rosat d'Algérie*. Entre les trois observations réalisées (à 3, 6 et 9 jours), le taux d'inhibition de la croissance mycélienne a doublé pour la dose 0,75 (D3) et la dose 0,50 (D2) avec les évolutions respectives de 82,22% et 74,44%.

La comparaison des taux des zones d'inhibition sous l'effet des deux huiles essentielles sur *Botryosphaera obtusa* montre une similitude de l'évolution temporelle de la croissance mycélienne avec une augmentation de celui-ci à 09 jours. La dose 0,75 (D3) de l'huile essentielle de *Géranium rosat d'Algérie* a enregistré le pourcentage d'inhibition le plus marqué (PI=87,77%) (Fig. 19).

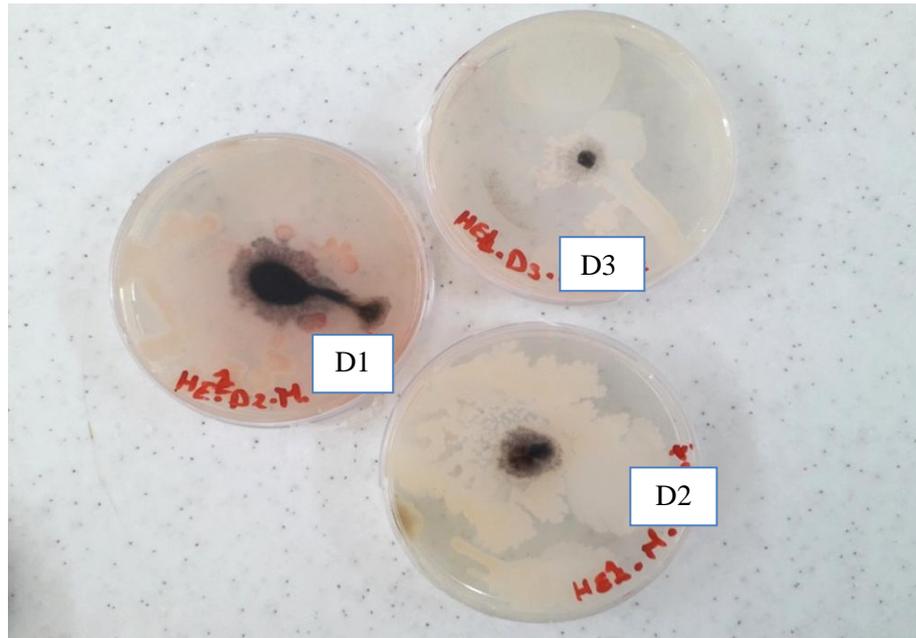


Figure. 19 : Evaluation de l'activité fongicide de l'H.E de *Géranium rosat d'Algérie* à différentes dilutions après 9 jours du traitement (Origine, 2021).

La croissance fongique du témoin était normale, elle a débuté dès le premier jour, et elle a évolué progressivement jusqu'à atteindre 90 mm au 9^{ème} jour.

1.3.2 Étude comparée de l'activité fongicide des deux huiles essentielles

Nous avons utilisé le modèle général linéaire (G.L.M.) de manière à étudier la variation temporelle (à 3, 6 et 9 jours) des taux d'inhibition de la croissance mycélienne de *Botryosphaeria obtusa* en fonction des différentes dilutions des deux huiles essentielles de *Géranium rosat d'Algérie* et *Lavandula agustifolia* appliquées lors des traitements. La fiabilité des résultats a été démontrée sur la base des permutations réalisées et qui sont au nombre de 40. L'ensemble des résultats d'analyses est consigné dans le Tableau 3 et la Figure 20.

Résultats et discussions

Tableau 3. Modèle G.L.M. appliqué aux essais de traitements sur la croissance mycélienne (N=40).

Source	Somme des carrés	DDL	Moyen des écarts	F-ratio	P
Nature/HE	432,876	1	432,876	9,933	0,003*
Mode de traitement	955,044	3	318,348	7,305	0,001**
Dose	6117,101	2	3058,550	70,185	0,000***
Période	2432,391	1	2432,391	55,816	0,000***
Var. intra	1743,141	40	43,579	-	-

N.S.: non significative, * : Probabilité significative à 5 % ; ** : Probabilité significative à 1 % ; *** : Probabilité significative à 0,1 %

Le tableau ci-dessus désigne que la nature biologique des matières actives présente un effet significatif sur la variabilité des taux d'inhibition de la croissance mycélienne du champignon phytopathogène étudié (F-ratio = 9,933 ; p = 0,003; p < 0,05). Par ailleurs, le facteur mode d'action révèle une différence fortement significative sur les taux d'inhibition de leur croissance mycélienne (F-ratio = 7,305 ; p = 0,001; p < 0,05). Les facteurs dose et période après traitement révèlent l'existence d'une différence très hautement significative des taux d'inhibition de la croissance mycélienne avec les valeurs respectives (F-ratio = 70,185 ; p = 0,000 ; p < 0,01) et (F-ratio = 55,816 ; p = 0,000 ; p < 0,001).

Les résultats obtenus de l'effet des deux huiles essentielles sur la souche fongique étudiée montre que la matière active de l'huile essentielle de *Géranium rosat d'Algérie* génère une action inhibitrice plus importante que celle de l'huile essentielle de *Lavandula agustifolia* qui offre un pourcentage d'inhibition plus faible (Fig. 20).

Résultats et discussions

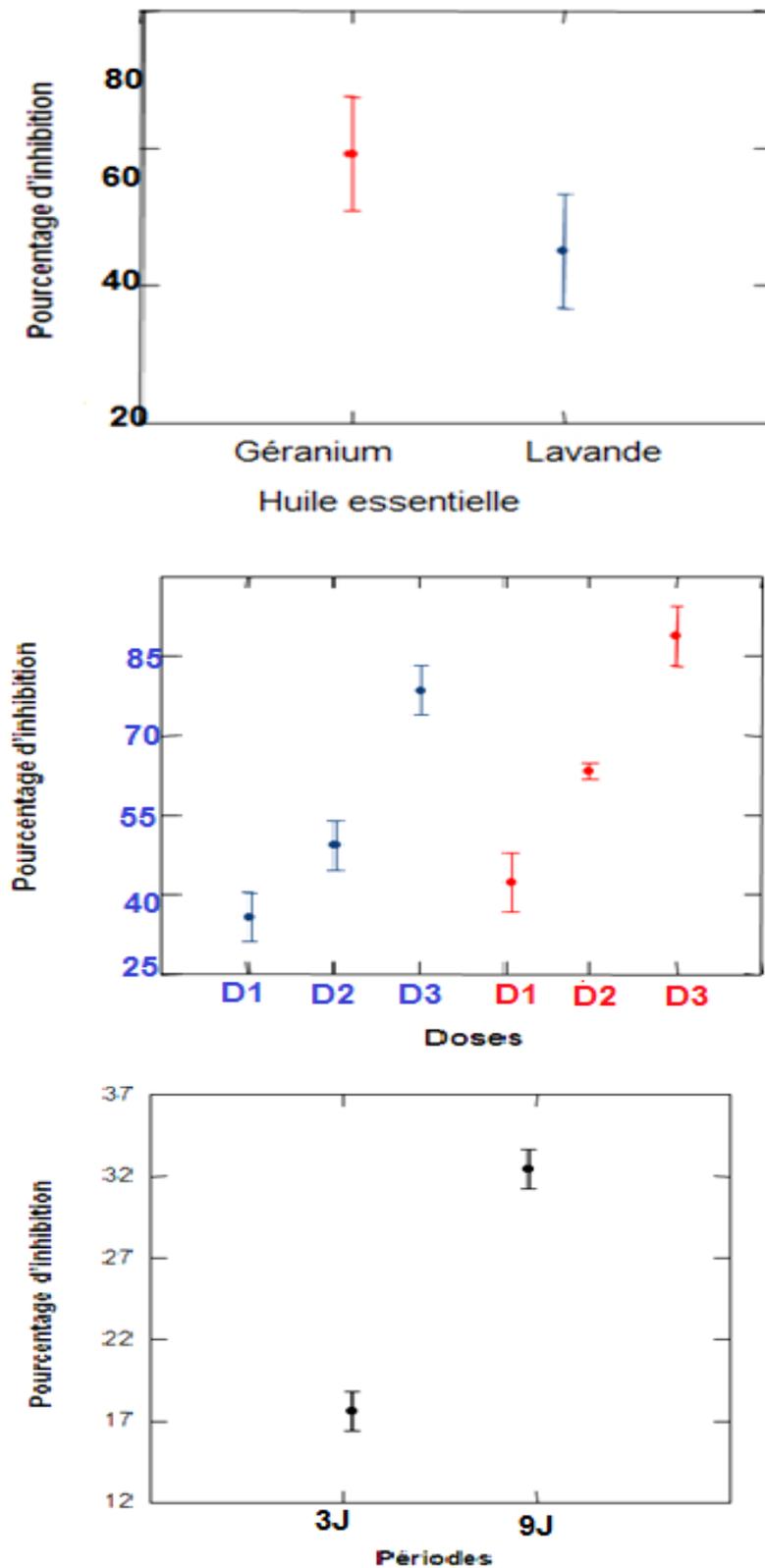


Figure. 20 : Étude comparée des taux d'inhibition de la croissance mycélienne de *Botryosphaeria obtusa* sous l'effet des huiles essentielles (a : huiles essentielles, b : doses c : périodes après traitement).

Résultats et discussions

L'étude de l'action antifongique des deux huiles essentielles sur *Botryosphaeria obtusa* montre que ce champignon présente une nette sensibilité au mode d'action (traitement direct) alors que l'activité volatile n'a montré aucune inhibition.

Les résultats obtenus indiquent que les concentrations les plus élevées pour les deux huiles essentielles inhibent plus efficacement que lorsqu'elles sont diluées. Cette efficacité se traduit par un pourcentage d'inhibition important pour l'huile essentielle de *Géranium rosat d'Algérie* par rapport à celui enregistré avec l'huile essentielle de *Lavandula agustifolia*. En revanche, la baisse du pourcentage d'inhibition va de paire avec la réduction de la concentration des doses des huiles essentielles utilisées mais toujours en faveur de l'huile essentielle de *Géranium rosat d'Algérie* (Fig. 20.b).

L'évolution temporelle des taux d'inhibition de la croissance mycélienne de *Botryodphaeria obtusa* montre un effet progressif des matières actives des deux huiles essentielles utilisés à savoir celui à base de *Géranium rosat d'Algérie* et celui à base d'huile essentielle de *Lavandula agustifolia*. Cependant, l'effet des deux produits traitement se révèle faible au bout de 3 jours avec un pourcentage d'inhibition (PI= 20,06% pour la *Géranium rosat d'Algérie* et PI= 16,47% pour *Lavandula agustifolia*, puis s'accroît fortement pour atteindre après 9 jours du traitement un pourcentage d'inhibition plus important (Fig. 20.c).

II. Discussions

Les organismes phytopathogènes sont responsables de nombreux dégâts et maladies affectant les grandes cultures, les cultures maraîchères et les arbres fruitiers et forestiers. L'utilisation des pesticides chimiques efficace contre les organismes a entraîné de multiples conséquences sur l'environnement et sur la santé humaine

Des études récentes ont montré que les produits naturels issus des plantes, des microorganismes et les métabolites secondaires représentent une importante source de molécules pouvant être exploitées dans différents domaines entre autres la bioprotection.

L'objectif de la présente étude est de tenter de trouver un éventuel pouvoir antifongique *in vitro* de deux huiles essentielles à l'égard d'un champignon phytopathogène responsables des maladies du bois.

Les résultats qui vont être discutés suite aux résultats révélés par cette étude, concernent l'évaluation du pouvoir antifongique sur un champignon phytopathogène; et de deux huiles essentielles. L'étude du pouvoir antifongique des deux huiles essentielles a été évalué *in vitro* sur *Botryosphaeria obtusa* en utilisant deux modes d'action, technique d'activité volatile et la technique de contact direct sur la gélose. Les résultats obtenus ont révélé un fort pouvoir antifongique des deux huiles essentielles en fonction de la nature des deux huiles essentielles, des concentrations des doses appliquées et du temps.

Les résultats de cette étude montrent que le rendement en huile essentielle de la partie aérienne et des racines de la *Géranium rosat d'Algérie* est relativement faible, il est de 0,011%. On constate que le rendement obtenu à partir de la *Géranium rosat d'Algérie* de région de Attatba (Tipaza), est très loin de celui cité dans la référence AFNOR. On peut dire qu'en termes de quantité, malgré que ce pourcentage semble inférieur par rapport aux normes AFNOR, ce rendement reste dans la pratique satisfaisant.

Les différences du rendement en huiles essentielles d'un organe à un autre ou d'une espèce à une autre ont été rapportées. Selon certains auteurs, divers facteurs tels que l'espèce de la plante, l'âge de la plante, l'origine de récolte de la plante, la période de récolte, la partie soumise à la distillation et la technique d'extraction, le degré de séchage, les conditions de séchage, la température et la durée de séchage, l'environnement, présence de parasites, de virus et mauvaises herbes, sont des facteurs parmi d'autres qui peuvent aussi avoir un impact direct sur les rendements en huile essentielle (Russo et al., 1998 ; Tonzibo, 1998 ; Vekiari et al., 2002 ; Karousou et al., 2005 ; Kouamé, 2012).

Résultats et discussions

L'étude des propriétés organoleptiques de l'huile essentielle de *Géranium rosat d'Algérie* présente un aspect liquide limpide de couleur jaune verdâtre avec une forte odeur rosée et légèrement citronnée, et concernant l'H.E *Lavandula agustifolia* est d'un aspect liquide limpide avec une couleur jaune pale et une odeur agréable. Ces résultats restent conformes avec les normes AFNOR.

L'activité antifongique des huiles essentielles est le sujet de plusieurs études scientifiques *in vitro* depuis plusieurs années. Cependant, les méthodes utilisées pour évaluer cette activité sont nombreuses et donnent parfois des résultats différents selon les conditions expérimentales par chaque manipulateur.

Nous rappelons que l'activité antifongique des deux huiles essentielles de *Géranium rosat d'Algérie* et de *Lavandula agustifolia* a été déterminée par deux méthodes, dont le test de l'activité volatile et la technique de contact direct sur la gélose.

Nos résultats indiquent que les molécules volatiles d'H.E de *Géranium rosat d'Algérie* et *Lavandula agustifolia* a une faible capacité inhibition de la croissance de la souche de *Botryosphaeria obtusa*, puisqu'aucune zone d'inhibition n'a été identifiée.

Sous l'hypothèse de différence de la qualité phytochimique des deux huiles essentielles, de nombreuses recherches se sont intéressées à la caractérisation des plantes à activité fongique. Les résultats se sont révélés très informatifs sur les molécules bioactives. L'huile essentielle de *Géranium rosat d'Algérie* contient des monoterpènes et des composants biochimiques elle est fortement dosés en : citronellol (18 à 30%), géraniol (9 à 17%), linalol (3 à 15%), citral (géraniol + néral) ($\leq 2\%$) et en limonène ($\leq 0,5\%$) lui confèrent à cette famille de géraniacée des effets antimicrobiens y compris antifongiques. La teneur en monoterpènes varie selon l'espèce, la partie de la plante et les conditions culturales et climatiques.

En ce qui concerne la composition chimique des huiles essentielles et ses caractères organoleptiques varient en fonction de différents facteurs tels que l'espèce, l'origine intrinsèques (spécifiques de l'équipement génétique de la plante) et extrinsèques (liées aux conditions environnementales de la plante), incluant le stade de développement des plantes, les organes prélevés, la période et la zone géographique de récolte (**Delaquis et al., 2002 ; Gonny et al., 2004 ; Burt, 2004 ; Boti et al., 2006 ; Oussou et al., 2009**).

Résultats et discussions

Cependant l'huile essentielle de *Lavandula agustifolia* est constituée principalement de : Linalyl acétate, Linalool, β -caryophyllène, Acétate de lavandulyle, Z- β -ocimène, terpinène-4 μ -ol, E- β -ocimène.

Des recherches ont démontré que les terpènes sont parmi les composés des huiles essentielles les plus actifs contre les champignons. Beaucoup de travaux ont souligné l'efficacité antifongique des phénols terpéniques et plus particulièrement celle du limonène et linalol.

Ces deux molécules possèdent un très large spectre d'activité antimicrobienne et ils sont naturellement présents dans les essences de la plupart des espèces de Thym. L'hypothèse de divergence des modes d'actions entre les deux huiles essentielles rejoint les différentes études qui ont été menées pour comprendre les mécanismes d'action des molécules bioactives des plantes, dont plusieurs attribuent cette fonction aux composants phénoliques en interaction avec la membrane plasmique des agents pathogènes.

Cristani et al. (2007) ont signalé que l'activité antimicrobienne est liée à la capacité des terpènes pour leur action non seulement sur la perméabilité, mais aussi sur d'autres fonctions de la membrane cellulaire. Ces composés peuvent traverser la membrane, pénétrer ainsi à l'intérieur de la cellule et interagir avec les sites intracellulaires critiques.

Par contre, à l'issue des résultats des tests de l'activité antifongique *in vitro* des huiles essentielles par méthode de contact direct sur la gélose montrent qu'il y a une différence d'efficacité entre les deux huiles essentielles vis-à-vis *Botryosphaeria obtusa*. Dont l'huile essentielle de *Géranium rosat d'Algérie* expose le plus important pouvoir inhibiteur par rapport au *Lavandula agustifolia*, où la souche fongique étudiée a manifesté une sensibilité différentielle à toutes les concentrations de ces deux huiles essentielles.

Les H.E permettent la protection contre les champignons phytopathogènes, et d'après les résultats obtenus sur l'effet des deux huiles essentielles utilisées, on constate qu'elles empêchent partiellement la croissance fongique.

Conclusion et perspectives

Conclusion et perspectives

Par le présent travail, nous avons essayé de contribuer à lever le voile sur les potentialités agro-phytosanitaires des plantes aromatiques pouvant être utilisées localement comme biopesticides dans la phytoprotection, afin de minimiser la contamination de l'environnement par les substances toxiques d'origine chimique.

Ce travail a été mené dans le cadre de l'étude de l'activité antifongique des huiles essentielles extraites de la partie aérienne et les racines de *Géranium*, et des sommités fleuries de Lavandin sur *Botryosephaeria obtusa*.

L'extraction des deux H.E de *Géranium rosat d'Algérie* et *Lavandula agustifolia* a été réalisée par l'entraînement à la vapeur d'eau à l'échelle industrielle, respectivement au niveau de la société des huiles essentielles Extral-bio et la société Bio-source. L'extraction de *Géranium rosat d'Algérie* a donné un faible rendement de 0,011%, pour l'H.E *Lavandula agustifolia* a été extraite et obtenue par la société des huiles essentielles Bio-source.

L'activité antifongique a été évaluée à travers deux méthodes, un test d'activité volatile, et la techniques de contacte directe sur le milieu de culture, les résultats obtenus montrent des effets antifongiques différents des deux H.E sur *Botryosephaeria obtusa*. L'H.E de la *Géranium rosat d'Algérie* révèle une activité antifongique plus élevé même à faible concentration que l'effet de l'H.E de *Lavandula agustifolia*. Il est à noter que plus que la dose est importante plus le diamètre de croissance est faible. Ainsi que l'inhibition de la croissance fongique par la technique de contact direct sur la gélose a été observée mieux que l'inhibition par le test d'activité volatile. Donc en conclu que la technique de diffusion sur gélose est un bon moyen pour détecter la sensibilité d'une souche à une huile essentielle.

En fin, l'ensemble de ces résultats obtenus *in vitro* ne constitue qu'une première étape dans la recherche de substances d'origine naturelle biologiquement active, également ils nous a permis de prédire que les H.E de *Géranium rosat d'Algérie* et de *Lavandula agustifolia* peuvent être une source non négligeable d'antifongiques utilisables en protection des maladies du bois.

Sachant que l'Algérie possède un patrimoine végétal très riche et diversifié l'implication des extraits végétaux dans la lutte éco-chimique comme facteurs de protection des plantes, pourrait s'insérer dans le cadre d'une stratégie alternative et / ou complémentaire dans la lutte contre les ravageurs des cultures en intégrant les autres méthodes de lutte et ceci dans le contexte d'une agriculture durable.

Conclusion et perspectives

Il serait ainsi envisageable de :

- Cibler les plantes à activité fongicide.
- Tester ces molécules naturelles dans des conditions contrôlées.
- Chercher des adjuvants adéquats pour une éventuelle bio formulation.



Références

Références

-A-

1. **Abbes, A. (2014)** .Evaluation De L'Activite Antioxidante Des Huiles Essentielles D'Ammoides Verticillata « Noukha » De La Region De Tlemcen,pp 69.
2. **Abdollahzadeh, J., Zare, R. et Phillips, A. J. (2013)**. Phylogeny and taxonomy of *Botryosphaeria* and *Neofusicoccum* species in Iran, with description of *Botryosphaeria scharifii* sp. nov. *Mycologia*, 105(1), 210-220.
3. **AL-reza S.M., RAhman A., Ahmed Y. and Kang S.G. (2010)**. Inhibition of plant pathogens in vitro and in vivo with essential oil and organic extracts of *Cestrum nocturnum* L. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 96: 86-92.
4. **Amarti, F., Satrani, B., Ghanmi, M., Farah, A., Aafi, Aarab, L., et Chaouch, A. (2010)**. Composition chimique et activité antimicrobienne des huiles essentielles de *Thymus ciliates* (Desf.) Benth. du Maroc. *BASE*.
5. **Ammad, F. (2006)**. Depistage et diagnostic des maladies de deperissement de la vigne (eutypiose et viroses dans quelques vignobles algeriens (Doctoral dissertation, Blida).
6. **Ammad, F., Benchabane, M., Toumi, M., Belkacem, N., Guesmi, A., Ameer, C. et Merah, O. (2014)**. Occurrence of *Botryosphaeriaceae* species associated with grapevine dieback in Algeria. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*, 38(6), 865-876.
7. **Ammad, F. (2015)**. *Etude épidémiologique et étiologique des maladies du bois ET de dépérissement de la vigne en Algérie*. Doc. Bio. Vég. Phyto., Ecole norm super du Kouba, Algérie
8. **Amponsah, N. T., Jones, E., Ridgway, H. J. et Jaspers, M. V. (2012)**. Evaluation of fungicides for the management of *Botryosphaeria* dieback diseases of grapevines. *Pest management science*, 68(5), 676-683.
9. **Anonyme.(1969)**.https://www.agro.basf.fr/fr/cultures/vigne/protection_fongicide_de_la_vigne/anti_maladies_du_bois/lutte-contre-les-maladies-du-bois/
10. **Anonymme. (2017)**. Revue suisse Viticulture, Arboriculture, *Horticulture* .49 (2):88–96, 2017.
11. **Anonyme. (2020)**. <https://www.plan-deperissement-vigne.fr/outils/fiches-techniques/recepage-de-la-vigne>

Références

12. **Arnaud G. et Arnaud M. (1931).** Traité de Pathologie Végétale. Tome I. Paul Lechevalier and Fils eds, Paris VI. 993 pages.
 13. **Aziz, A., Heyraud, A. et Lambert, B. (2004).** Oligogalacturonide signal transduction, induction of defense-related responses and protection of grapevine against *Botrytis cinerea*. *Planta*, 218(5), 767-774.
 14. **Aziz, A., Poinssot, B., Daire, X., Adrian, M., Bézier, A., Lambert, B. et Pugin, A. (2003).** Laminarin elicits defense responses in grapevine and induces protection against *Botrytis cinerea* and *Plasmopara viticola*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 16(12), 1118-1128.
 15. **Aziz, A., Trotel-Aziz, P., Dhuicq, L., Jeandet, P., Couderchet, M. et Vernet, G. (2006).** Chitosan oligomers and copper sulfate induce grapevine defense reactions and resistance to gray mold and downy mildew. *Phytopathology*, 96(11), 1188-1194.
- B-**
16. **Bai, W., Chern, M., Ruan, D., Canlas, P. E., Sze-to, W. H. et Ronald, P. C. (2011).** Enhanced disease resistance and hypersensitivity to BTH by introduction of an NH1/OsNPR1 paralog. *Plant biotechnology journal*, 9(2), 205-215.
 17. **Bajpal V.K. Rahman A., Ahmed Y. and Kang S.G. (2007).** Chemical composition and anti-fungal properties of the essential oil and crude extracts of *Metasequoia glyptostroboides* Miki ex Hu. *Industrial Crops and Products*. 26: 28-35.
 18. **Belhadj, A., Saigne, C., Telef, N., Cluzet, S., Bouscaut, J., Corio-Costet, M. F. et Mérillon, J. M. (2006).** Methyl jasmonate induces defense responses in grapevine and triggers protection against *Erysiphe necator*. *Journal of agricultural and food chemistry*, 54(24), 9119-9125.
 19. **Belyagoubi, L. (2006).** Effet de quelques essences végétales sur la croissance des moisissures de détérioration des céréales. *Mémoire en vue de l'obtention du diplôme de magistère en biologie. Option: produits naturels. Faculté des sciences, Algérie.*

Références

20. **Berraf, A. et Péros, J. P. (2005).** Importance of *Eutypa* dieback and esca in Algeria and structure of the associated fungal community. *OENO One*, 39(3), 121-128.
21. **Bertsch, C., Larignon, P., Farine, S., Clément, C., & Fontaine, F. (2009).** The spread of grapevine trunk disease. *Science*, 324(5928), 721-721.
22. **Bertsch, C., Ramírez-Suero, M., Magnin-Robert, M., Larignon, P., Chong, J., Abou-Mansour, E. et Fontaine, F. (2013).** Grapevine trunk diseases: complex and still poorly understood. *Plant Pathology*, 62(2), 243-265.
23. **Bertsch, 2014 Chong, J., Piron, M. C., Meyer, S., Merdinoglu, D., Bertsch, C., & Mestre, P. (2014).** The SWEET family of sugar transporters in grapevine: VvSWEET4 is involved in the interaction with *Botrytis cinerea*. *Journal of Experimental Botany*, 65(22), 6589-6601.
24. **Billones-Baaijens, R., Jaspers, M., Allard, A., Hong, Y., Ridgway, H. et Jones, E. (2015).** Management of *Botryosphaeriaceae* species infection in grapevine propagation materials. *Phytopathologia Mediterranea*, 355-367.
25. **Bolay, A. et Carter, M. V. (1985).** Newly recorded hosts of *Eutypa lata* (= *E. armeniacae*) in Australia. *Plant Protection Quarterly*, 1(1), 10.
26. **Billerbeck, A. E., Liborio, D. C., Kim, C. A., & Mendonca, B. B. (2007).** SHOX mutations in idiopathic short stature and Leri-Weill dyschondrosteosis: frequency and phenotypic variability. *Clinical endocrinology*, 66(1), 130-135.
27. **Boti, J. B., Muselli, A., Tomi, F., Koukoua, G., N'Guessan, T. Y., Costa, J. et Casanova, J. (2006).** Combined analysis of *Cymbopogon giganteus* Chiov. leaf oil from Ivory Coast by GC/RI, GC/MS and ¹³C-NMR. *Comptes Rendus Chimie*, 9(1), 164-168.
28. **Bouaine, A., et Rachik, M. (2017).** Advanced approach for observability of distributed systems using internal pointwise sensor. In *Procedings of the Computational Methods in Systems and Software* (pp. 298-309). Springer Cham.
29. **Boyraz, N., & Ozcan, M. (2005).** Antifungal effect of some spice hydrosols. *Fitoterapia*, 76(7-8), 661-665.

Références

30. **Brown, E., A., et Hendrix, F. F. (1981).** Pathogenicity and histopathology of *Botryosphaeria dothidea* on apple stems. *Phytopathology*, 71(4), 375-379.
 31. **Broydé, H, et Doré, T (2013).** Effets des pratiques agricoles sur la contamination des denrées par les mycotoxines issues de *Fusarium* et *Aspergillus* spp. *Cahiers Agricultures*, 22(3), 182-194.
 32. **Bruneton, J. (1999).** *Toxic plants dangerous to humans and animals*. Intercept Limited.
 33. **Bruez, E., Lecomte, P., Grosman, J., Doublet, B., Bertsch, C., Fontaine, F. et Rey, P. (2013).** Overview of grapevine trunk diseases in France in the 2000s. *Phytopathologia Mediterranea*, 52 (2), 262-275.
 34. **Burt, S. (2004).** Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. *International journal of food microbiology*, 94(3), 223-253.
- C-
35. **Caillot, S., Rat, S., Tavernier, M. L., Michaud, P., Kovensky, J., Wadouachi, A. et Petit, E. (2012).** Native and sulfated oligoglucuronans as elicitors of defence-related responses inducing protection against *Botrytis cinerea* of *Vitis vinifera*. *Carbohydrate polymers*, 87(2), 1728-1736.
 36. **Carson, C. F., et Riley, T.V. (1995).** Antimicrobial activity of the major components of the essential oil of *Melaleuca alternifolia*. *Journal of applied bacteriology*, 78(3), 264-269.
 37. **Carter MV. (1982).** Additional hosts of *Eutypa armeniacae* in Australia. *Australasian Plant Pathology* 11: 46-48.
 38. **Carter, M. V. (1991).** The status of *Eutypa lata* as a pathogen. International Mycological Institute. *Phytopathological paper*, 32.
 39. **Castillo-Pando, M., Somers, A., Green, C. D., Priest, M. et Sriskanthades, M. (2001).** Fungi associated with dieback of Semillon grapevines in the Hunter Valley of New South Wales. *Australasian Plant Pathology*, 30(1), 59-63.
 40. **Chen, B. et Nuss, D. L. (1999).** Infectious c DNA clone of hypovirus CHV1-Euro7: a comparative virology approach to investigate virus-mediated

Références

- hypovirulence of the chestnut blight fungus *Cryphonectria parasitica*. *Journal of Virology*, 73(2), 985-992.
41. **Chutia M., Deka bhuyan P., Pathak M.G., Sarma T.C. and Boruah P. (2009).** Antifungal ion of Citrus btuseate Blanco essential oil against phytopathogens from North East India. *LWT- Food Science and Technology* .42: 777-780.
42. **Cristani M., D'Arrigo M., Mandalari G., Castelli F., Sarpietro M.G., Micieli D., 2007-** Interaction of four monoterpenes contained in essential oils with modeles membranes: application for their antibacterial activity. *J. Agric Food Chem*, 55, pp: 6300-6308
43. **Cristinzio, G. (1978).** Gravi attacchi di *Botryosphaeria obtusa* su vite in provincia di Isernia. *Informatore fitopatologico*, 28, 21-23.
44. **Crous, P. W., Slippers, B., Wingfield, M. J., Rheeder, J., Marasas, W. F., Philips, A. J. et Groenewald, J. Z. (2006).** Phylogenetic lineages in the *Botryosphaeriaceae*. *Studies in mycology*, 55, 235-253.
45. **Cruz Cabral, L., Pinto, V.F., & Patriarca, A. (2013).** Application of plant derived compounds to control fungal spoilage and mycotoxin production in food. *International journal of food microbiology*, 166(1), 1-14.
- D-**
46. **DeWet, J., Preisig, O., Wingfield, B. D. et Wingfield, M. J. (2008).** Patterns of multiple virus infections in the conifer pathogenic fungi, *Diplodia pinea* and *Diplodia scrobiculata*. *Journal of phytopathology*, 156(11-12), 725-731. doi: 10.1111/j.1439-0434.2008.01439.x
47. **Delaunois, B., Farace, G., Jeandet, P., Clément, C., Baillieul, F., Dorey, S. et Cordelier, S. (2014).** Elicitors as alternative strategy to pesticides in grapevine? Current knowledge on their mode of action from controlled conditions to vineyard. *Environmental Science and Pollution Research*, 21(7), 4837-4846.
48. **Delaquis, P. J., Stanich, K., Girard, B. et Mazza, G. (2002).** Antimicrobial activity of individual and mixed fractions of dill, cilantro, coriander and eucalyptus essential oils. *International journal of food microbiology*, 74(1-2), 101-109.

Références

- 49. Djoukeng, J. D., Polli, S., Larignon, P. et Abou-Mansour, E. (2008).** Identification of phytotoxins from *Botryosphaeria obtusa*, a pathogen of black dead arm disease of grapevine. *European Journal of Plant Pathology*, in: 6th, 124(2), 303-308.
- 50. Dubos, B. (2002).** *Les maladies cryptogamiques de la vigne: les champignons parasites des organes herbacés et du bois de la vigne.* Éditions Féret. 200 p.
- 51. Dufour, M. C., Lambert, C., Bouscaut, J., Mérillon, J. M. et Corio-Costet, M. F. (2013).** Benzothiadiazole-primed defence responses and enhanced differential expression of defence genes in *Vitis vinifera* infected with biotrophic pathogens *Erysiphe necator* and *Plasmopara viticola*. *Plant Pathology*, 62(2), 370-382.
- E-**
- 52. El Ajjouri, M., Satrani, B., Ghanmi, M., Aafi, A., Farah, A., Rahouti, M., et Aberchane, M. (2008).** Activité antifongique des huiles essentielles de *Thymus bleicherianus* Pomel et *Thymus capitatus* (L.) Hoffm. Et Link contre les champignons se pourriture du bois d'œuvre. *Base*.
- F-**
- 53. Fourie, P., Schreuder, W., van der Vyver, J. et Halleen, F. (2001).** Effects of "Trichoderma" Treatments on the Occurrence of Decline Pathogens in the Roots and Rootstocks of Nursery Grapevines. *Phytopathologia Mediterranea*, 40: 5473-5478.
- 54. Ferhat, M. A., Vian, M.A., Bousbia, N., Petitcolas, E., Meklati, B. Y., & Chemat, F. (2009).** Comparison of two isolation methods for essential oil from rosemary leaves: Hydrodistillation and microwave hydrodiffusion and gravity. *Food chemistry*, 114(1), 355-362.
- G-**
- 55. Galet P. (1995).** Précis de pathologie viticole. *Imp. JF Impression*, Montpellier, 246 p.
- 56. Gerbore, J., Benhamou, N., Vallance, J., Le Floch, G., Grizard, D., Regnault-Roger, C. et Rey, P. (2014).** Biological control of plant pathogens: advantages and limitations seen through the case study of *Pythium*

Références

- oligandrum. *Environmental Science and Pollution Research*, 21(7), 4847-4860.
- 57. Glawe DA. (1983).** Isolation and identification of *Eutypa armeniacae* from *Malus domestica* in Washington state. *Mycotaxon* 18: 315-318.
- 58. Gonny, M., Bradesi, P. et Casanova, J. (2004).** Identification of the components of the essential oil from wild Corsican *Daucus carota* L. using ¹³C-NMR spectroscopy. *Flavour and fragrance journal*, 19(5), 424-433.
- 59. Gray, D. J., Li, Z. T. et Dhekney, S. A. (2014).** Precision breeding of grapevine (*Vitis vinifera* L.) for improved traits. *Plant science*, 228, 3-10.
- I-**
- 60. Inouye S., Uchida K. Maruyama N., Yamaguchi H. and Abe S. (2006).** A novel method to estimate the contribution of the vapour activity of the essential oil in agar diffusion assay. *Jpn. J. med. Mycol*, 47: 91-98.
- J-**
- 61. John, S., Wicks, T. J., Hunt, J. S., Lorimer, M. F., Oakey, H. et Scott, E. S. (2005).** Protection of grapevine pruning wounds from infection by *Eutypa lata* using *Trichoderma harzianum* and *Fusarium lateritium*. *Australasian Plant Pathology*, 34(4), 569-575.
- K-**
- 62. Kalemba, DAAK et Kunicka, A. (2003).** Propriétés antibactériennes et antifongiques des huiles essentielles. *Chimie médicinale actuelle*, 10(10), 813-829.
- 63. Kaloustian, J., & Hadji-Minaglou, F. (2012).** La connaissance des huiles: qualilogie et aromathérapie; *Entre science et tradition pour une application médicale raisonnée*. Springer.
- 64. Karousou, R., Koureas, D. N. et Kokkini, S. (2005).** Essential oil composition is related to the natural habitats: *Coridothymus capitatus* and *Satureja thymbra* in NATURA 2000 sites of Crete. *Phytochemistry*, 66(22), 2668-2673.
- 65. Kouamé-Bi K.F.P (2012).** *Valorisation de quatre plantes médicinales Ivoiriennes : étude phytochimique*. Thèse de doctorat, chimie organique, Université de Nantes et de l'Université de Cocody-Abidjan. 180 p.

Références

66. Kotze, C., Van Niekerk, J., Mostert, L., Halleen, F. et Fourie, P. (2011). Evaluation of biocontrol agents for grapevine pruning wound protection against trunk pathogen infection. *Phytopathologia Mediterranea*, 50, 247-263.
67. Kouyeas H. (1978). *Eutypa armeniacea* on lemon in Greece. *Phytopathologische Zeitschrift* 91: 235-237.
- L-
68. Lahlou, M. (2004). Method to study phytochemistry and bioactivity of essential oil. *Phytotherapy Research*, 18, 435-448.
69. Lambert, C. (2011). *Étude du rôle des stilbènes dans les défenses de la vigne contre les maladies du bois* (Doctoral dissertation, Bordeaux 2).
70. Larignon P. (2009). L'efficacité des Trichoderma contre les maladies du bois non démontrée. Lettre technique IFV, Janvier 2009, http://www.vignevin.com/fileadmin/users/ifv/publications/A_telecharger/Trichoderma09.pdf
71. Larignon P. (2016) Maladies cryptogamiques du bois de la vigne. *Symptomatologie et agents pathogènes*. Disponible sur « <http://www.vignevin.com> ». 2ème édition, janvier 2016.
72. Larignon, P. (2016). Maladies cryptogamiques du bois de la vigne : symptomatologie et agents pathogènes. <http://www.vignevin.com>, 2ème édition, janvier 2016.
73. Larignon, P. et Dubos, B. (2001). The villainy of black dead arm. *Wines Vines*, 82(1), 86-89.
74. Larignon, P., Darné, G., Menard, E., Desache, F. et Dubos, B. (2008). Comment agissait l'arsénite de sodium sur l'esca de la vigne?. *Le Progrès agricole et viticole*, 125(23), 642-651.
75. Larignon, P., Fontaine, F. et Bertsch, C. (2014). Les maladies du bois de la vigne: L'arsénite de sodium de nouveau à l'étude. *Le vigneron champenois*, 135(10), 27-29.
76. Larignon, P., Fontaine, F., Farine, S., Clement, C. et Bertsch, C. (2009). Esca and Black Dead Arm: two major actors of grapevine trunk diseases. *Comptes rendus Biologies*, 332(9), 765-783.
77. Larignon, P., Spagnolo, A., Bertsch, C. et Fontaine, F. (2015). First report of young grapevine decline caused by *Neofusicoccum parvum* in

Références

France. *Plant disease*, 99(12), 1859. <https://doi.org/10.1094/PDIS03-15-0280-PDN>

- 78. Laveau, C., Letouze, A., Louvet, G., Bastien, S. et Guerin-Dubrana, L. (2009).** Differential aggressiveness of fungi implicated in esca and associated diseases of grapevine in France. *Phytopathologia Mediterranea*, 48(1), 32-46.
- 79. Letousey, P., Baillieul, F., Perrot, G., Rabenoelina, F., Boulay, M., Vaillant-Gaveau, N. et Fontaine, F. (2010).** Early events prior to visual symptoms in the apoplectic form of grapevine esca disease. *Phytopathology*, 100(5), 424-431.
- 80. Liu, J. K., Phookamsak, R., Doilom, M., Wikee, S., Li, Y. M., Ariyawansa, H. et Hyde, K. D. (2012).** Towards a natural classification of *Botryosphaeriales*. *Fungal Diversity*, 57(1), 149-210.
- 81. Luque, J., Martos, S. et Phillips, A. J. (2005).** *Botryosphaeria viticola* sp. nov. on grapevines: a new species with a *Dothiorella* anamorph. *Mycologia*, 97(5), 1111-1121.

-M-

- 82. Martos, S., Andolfi, A., Luque, J., Mugnai, L., Surico, G. et Evidente, A. (2008).** Production of phytotoxic metabolites by five species of *Botryosphaeriaceae* causing decline on grapevines, with special interest in the species *Neofusicoccum luteum* and *N. parvum*. *European Journal of Plant Pathology*, 121(4), 451-461.
- 83. Molot B., Dubos, B., Larignon, P., Lecomte, P., Magnien, C., Panon, M. L., Grand, O. et Leguay, M. (2002).** Les maladies du bois en viticulture. Paris, INRA, 113, 32-35. <http://prodinra.inra.fr/record/74686>
- 84. Mortuza, M. G. et Ilag, L. L. (1999).** Potential for biocontrol of *Lasiodiplodia theobromae* (Pat.) Griff. & Maubl. in banana fruits by *Trichoderma* species. *Biological Control*, 15(3), 235-240.
- 85. Mugnai, L., Graniti, A. et Surico, G. (1999).** Esca (black measles) and brown wood-streaking: two old and elusive diseases of grapevines. *Plant disease*, 83(5), 404-418.

-N-

Références

86. Nakashita, H., Yasuda, M., Nitta, T., Asami, T., Fujioka, S., Arai, Y. et Yoshida, S. (2003). Brassinosteroid functions in a broad range of disease resistance in tobacco and rice. *The Plant Journal*, 33(5), 887-898.
87. Nuss, D. L. (2005). Hypovirulence: mycoviruses at the fungal–plant interface. *Nature Reviews Microbiology*, 3(8), 632-642.
- O-
88. Oussou K.R. (2009). *Etude chimique et activité biologiques des huiles essentielles de sept plantes aromatiques de la pharmacopée Ivoirienne*. Doctorat de l'Université de Cocody-Abidjan, 241p.
- P-
89. Phillips, A. J. (2002). Botryosphaeria species associated with diseases of grapevines in Portugal. *Phytopathologia Mediterranea* , 1000-1016.
90. Phillips, A., Alves, A., Correia, A. et Luque, J. (2005). Two new species of *Botryosphaeria* with brown, 1-septate ascospores and *Dothiorella* anamorphs. *Mycologia*, 97(2), 513-529.
91. Pitt, W. M., Sosnowski, M. R., Huang, R., Qiu, Y., Steel, C. C. et Savocchia, S. (2012). Evaluation of fungicides for the management of *Botryosphaeria* canker of grapevines. *Plant Disease*, 96(9), 1303-1308.
92. Poinssot, B., Vandelle, E., Bentéjac, M., Adrian, M., Levis, C., Brygoo, Y. et Pugin, A. (2003). The endopolygalacturonase 1 from *Botrytis cinerea* activates grapevine defense reactions unrelated to its enzymatic activity. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 16(6), 553-564.
93. Pouget R. (1990) . Histoire de la lutte contre le phylloxéra de la vigne en France : 1868-1895. *American Journal of Viticulture*, 25, 131-150.
- R-
94. Rey, P., Bertsch, C., Fontaine, F. et Larignon, P. (2016). Maladies du bois de la vigne avancées en France depuis 2010. *Phytoma-La Défense des végétaux*, 693, 7-10.
95. Robin, C., Anziani, C. et Cortesi, P. (2000). Relationship between biological control, incidence of hypovirulence, and diversity of vegetative compatibility types of *Cryphonectria parasitica* in France. *Phytopathology*, 90(7), 730-737.

Références

96. Rolshausen, P. E., Úrbez-Torres, J. R., Rooney-Latham, S., Eskalen, A., Smith, R. J. et Gubler, W. D. (2010). Evaluation of pruning wound susceptibility and protection against fungi associated with grapevine trunk diseases. *American Journal of Enology and Viticulture*, 61(1), 113-119.
97. Rovesti, L. et Montermini, A. (1987). Un deperimento della vite causato da *Sphaeropsis malorum* diffuso in provincia di Reggio Emilia. *Informatore Fitopatologico*, 1, 59-61.
98. Rumbos I.C. (1986). Isolation and identification of *Eutypa lata* from *Pistacia vera* in Greece. *Journal of Phytopathology* 116: 352- 357.
99. Rumbos I.C. (1993). Dieback symptoms on olive trees caused by the fungus *Eutypa lata*. *Bulletin OEPP* 23: 441-445.
100. Russo, M., Galletti, G. C., Bocchini, P. et Carnacini, A. (1998). Essential oil chemical composition of wild populations of italian oregano spice (*Origanum v ulgare* ssp. h irtum (Link) Ietswaart): a preliminary evaluation of their use in chemotaxonomy by cluster analysis. 1. Inflorescences. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46(9), 3741-3746.
- S-
101. Satrani, B., Farah, A., et Talbi, M. (2006). Effet de la distillation fractionnée sur la composition chimique et l'activité antimicrobienne des huiles essentielles du Myrte (*Myrtus communis* L.) du Maroc. *Acta Botanica Gallica*, 153(2), 235-242.
102. Sharma N. and Tripathi A. (2006). Fungitoxicity of the essential oil of *Cinensis* citrus on post-harvest pathogens. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 22(6) : 587-59.
103. Schmidt, C. S., Lorenz, D., Wolf, G. A. et Jäger, J. (2001). Biological control of the grapevine dieback fungus *Eutypa lata* II: Influence of formulation additives and transposon mutagenesis on the antagonistic activity of *Bacillus subtilis* and *Erwinia herbicola*. *Journal of Phytopathology*, 149(7-8), 437-445.
104. Slippers, B., Crous, P. W., Denman, S., Coutinho, T. A., Wingfield, B. D. et Wingfield, M. J. (2004 a). Combined multiple gene genealogies and phenotypic characters differentiate several species previously identified as *Botryosphaeria dothidea*. *Mycologia*, 96(1), 83-101.

Références

105. Slippers, B., Fourie, G., Crous, P. W., Coutinho, T. A., Wingfield, B. D. et Wingfield, M. J. (2004 b). Multiple gene sequences delimit *Botryosphaeria australis* sp. nov. from *B. lutea*. *Mycologia*, 96(5), 1030-1041.
106. Smith, B., Hendrix, F. F. (1984). Primary infection of appel buds by *Botryosphaeria obtusa*. *Plant disease*, 68(8), 707-709.
107. Spinosi, J., Févotte, J. et Vial, G. (2009). Éléments techniques sur l'exposition professionnelle aux pesticides arsenicaux. *Matrice cultures-expositions aux pesticides arsenicaux*. Institut de veille sanitaire disponible sur : « www.invs.sante.fr ».
108. Surico, G. (2009). Towards a redefinition of the diseases within the esca complex of grapevine. *Phytopathologia Mediterranea*, 48(1), 5-10.
- T-
109. Tonzibo Z.F. (1998). *Contribution à l'étude des huiles essentielles des espèces acclimatées en Côte d'Ivoire. Eucalyptus citrodora, Ocimum gratissimum et Ocimum basilicum*. Thèse de 3eme cycle, chimie organique, Université de Cocody-Abidjan, Côte d'Ivoire, 136 p.
- U-
110. Umemura K., Tanino S., Nagatsuka T., Koga J., Iwata M., Nagashima K. et Amemiya Y. (2004) . Cerebroside elicitor confers resistance to *Fusarium* disease in various plant Species. *Phytopathology*, Vol. 94(8): 813-818. [en ligne]. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1094/PHYTO.2004.94.8.813> > (consulté le + 11/07/2021).
- V-
111. Vekiari, S. A., Protopapadakis, E. E., Papadopoulou, P., Papanicolaou, D., Panou, C. et Vamvakias, M. (2002). Composition and seasonal variation of the essential oil from leaves and peel of a Cretan lemon variety. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(1), 147-153.
112. Viret et Gindro. (2014) . *La Vigne*. Maladies fongiques : Ed. AMTRA, Nyon, 255 p.
- W-

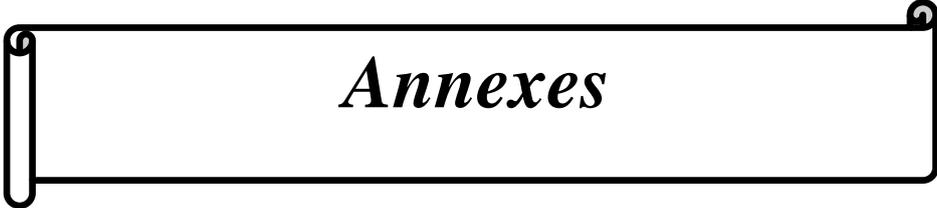
Références

113. Walters D.; Newton A. et Lyon G. (2007). Induced resistance for plant defence: a sustainable approach to crop protection. *The Quarterly Review of Biology*, Vol. 83 (2): 221 – 258.

114. Walters D.R., Newton A.C. et Lyon G.D., eds, (2014) .Induced resistance for plant defense: a sustainable approach to crop protection. 2nd ed. Oxford, UK: Wiley-Blackwell.

-Y-

115. Yacoub A., Gerbore J., Magnin N., Chambon P., Dufour M.C., Corio-Costet M.F., Guyoneaud R., et Rey P. (2016) .Ability of *Pythium oligandrum* strains to protect *Vitis vinifera* L., by inducing plant resistance against *Phaeomonella chlamydospora*, a pathogen involved in Esca, a grapevine trunk disease. *Biological control*, 92: 7-16.



Annexes

Annexes

Annexe I : l'extraction des huiles essentielles *Géranium rosat d'Algérie* et *Lavandula agustifolia*

A. L'extraction de *Géranium rosat d'Algérie* a été effectuée au niveau de la société Extral-bio

La société Extral-bio

Extral-bio est une société spécialisée dans la distillation des H.E, elle se situe en plein cœur de la Mitidja, jadis berceau des H.E.

La société a héritée d'une vieille tradition algérienne et d'un savoir faire dans le domaine des H.E que on nous invite à découvrir.

Ses H.E nous apportent les concentrés de la nature les plus précieux pour établir et conserver l'équilibre indispensable à notre santé.

Les H.E d'Extral-bio sont un heureux mélange de la sagesse ancienne et la science moderne. Pour satisfaire les besoins de ses clients en Algérie et à l'étranger, Extral-bio s'est dotée des moyens les plus modernes de distillation avec de grandes capacités de production (Fig. 1).



Figure. 1 : Centre de la société Etral-bio

Annexes

B. L'extraction d'H.E *Lavandula agustifolia* a été effectuée au niveau de la société bio-source :

La société bio-source

Bio-source est une société fondée en 2016 avec pour but de produire et commercialiser en grandes quantités les huiles essentielles et végétales et quelques plantes médicinales.

Au cours de cette période la société bio-source s'est positionnée en plusieurs acteurs dans le chaîne de valeurs des PPAM (Plantes à Parfum Aromatiques et Médicinales)

En amont et en aval, elle est dans la production des plantes de pépinière, dans la production agricole des PPAM tels que la Saugé, Géranium, Lemon grasse, et Bigaradier dans la Mitidja (Blida, Tipaza, et Alger).

Cette société a trois unités de production et de transformation des huiles essentielles à Blida, Tipaza et Zeralda. Elle ambitionne de redonner d'antan dans ce domaine.

C. Les méthodes d'extraction des huiles essentielles

Différentes méthodes sont mises en œuvre pour l'extraction des essences végétales. En général, le choix de la méthode d'extraction dépendra de la partie du végétal traitée (graines, feuilles, tiges, bourgeons, fruits) et ses caractéristiques botaniques, du rendement en huile et de la fragilité de certaines huiles aux températures élevées. Parmi les méthodes les plus utilisées :

C.1. Distillation

Selon (Piochou, 2008), il existe 3 différents procédés utilisant le principe de la distillation. On a l'hydrodistillation, vapo-hydrodistillation et l'entraînement à la vapeur d'eau.

Le tableau ci-dessous présente un comparatif des avantages et inconvénients des trois méthodes présentées précédemment.

Annexes

Tableau. Intérêts et inconvénients des différents procédés de distillation

	Hydrodistillation	Vapo- hydrodistillation	Entrainement à la vapeur
Type d'alambic	Simple, de faible coût, transportable et facilement installable dans les régions de production		De grande dimension pour augmenter la cadence de distillation
Type de matériel végétal	Fleurs principalement, Inadapté si présence de composés saponifiables, hydrosoluble ou à température d'ébullition élevé	Plantes entières et feuillages	Tous sauf matériel finement broyé. Adapté pour les composés à point d'ébullition élevé
Conditions de diffusion	Bonnes, surtout si le matériel végétal est totalement immergé et mobile dans l'eau	Bonnes, si la vapeur circule de manière homogène dans la matière végétale	Bonnes, si la vapeur est légèrement mouillée et si elle diffuse de manière homogène dans le matériel végétal
Température dans l'alambic	Proche de 100°C, risque d'endommagement du matériel végétal par contact direct avec la cuve	Autour de 100°C	Modulable, peut dépasser 100°C
Vitesse de distillation	Relativement faible	Assez bonne	Elevée
Hydrolyse	Vitesse d'hydrolyse d'esters élevée	Moindre problème (contact plante/eau limité)	Faible en général
Rendement	Souvent relativement faible	Bon en l'absence de mouillabilité importante de la plante	Bon si l'extraction est correctement conduite
Qualité de l'huile	Dépend des conditions	Toujours bonne	Bonne si l'extraction est correctement conduite

Annexes

C.2. Extraction à froid

Elle consiste le plus simple des procédés, mais elle ne s'applique qu'aux agrumes dont l'écorce des fruits comporte des poches sécrétrices d'essences. Ce procédé consiste à broyer, à l'aide de presses, les zestes frais pour détruire les poches et libérer l'essence.

C.3. Extraction par le corps gras

Elle est utilisée en fleurage dans le traitement des parties fragiles de plantes telles que les fleurs, qui sont très sensibles à l'action de la température. Le principe consiste à mettre les fleurs en contact d'un corps gras pour le saturer en huile essentielle. Dans cette technique, on peut distinguer l'enfleurage où la saturation se fait par diffusion à la température ambiante des arômes vers le corps gras et la digestion qui se pratique à chaud par immersion des organes végétaux dans le corps gras (Brian, 1995).

Annexe II : l'activité antifongique

A. étude *in vitro*

le terme *In vitro* qui vient de latin « sous verre » est utilisé pour caractériser toute mesure, exploration ou étude biologique en laboratoire, effectuée dans un milieu artificielle (milieu de culture, éprouvette,...) en dehors de l'environnement, de l'organisme vivant ou de la cellule, et en condition définies et contrôlées.

B. Le milieu de culture PDA

Le milieu PDA (Potato Dextrose Agar) est favorable pour la croissance des champignons phytopathogènes, dont la composition pour un volume de 1000 ml est ci-après, dans notre étude nous avons préparé le milieu PDA avec un volume de 2000 ml :

- Pomme de terre 400 g.
- Agar-agar 40 g.
- Glucose 40 g.
- Eau distillé 2000 ml.

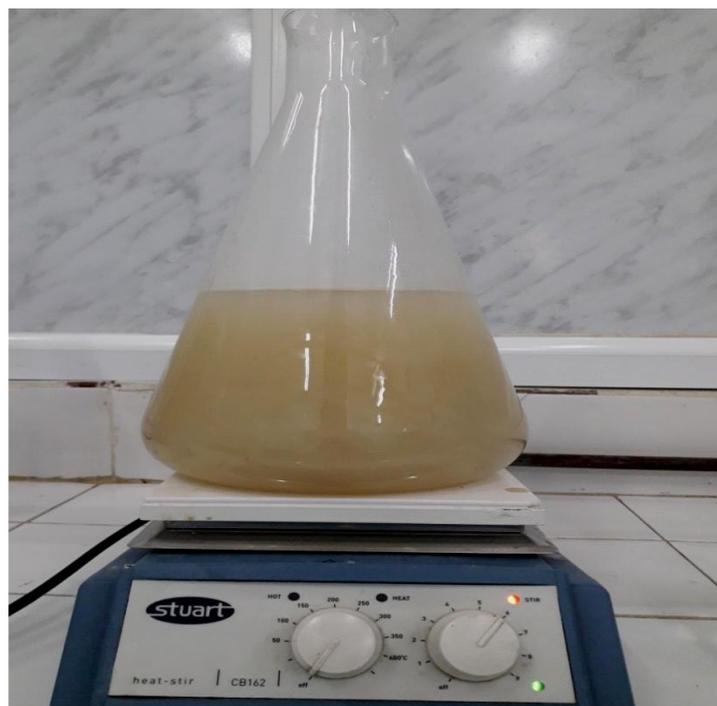
Annexes

La préparation de ce milieu est comme la suite :

1. Eplucher, laver, couper en petites morceaux les pommes de terre on les fait bouillir dans 2 L d'eau distillée pendant 15 à 20 min, puis récupérer le jus en rajoutant l'eau distillée pour obtenir 2 L en tout.



2. On ajoute 20 g de glucose et 20 g d'agar-agar et agiter.



Annexes

3. On verse le mélange dans des flacons, et on met ces derniers dans l'autoclave pendant 20 min à 120°C.



Annexes

4. En fin, on attend jusqu'au refroidissement des flacons pour couler le milieu PDA préparé sur les boites de Petri.



Annexe III : le rendement des huiles essentielles

A. Calcule de rendement

$$\text{Rd H.E} = (0,086/741,1) \times 100 = 0,001\%$$

La masse de la matière végétale utilisée (sèche) : M MV = 741, 1Kg

Volume de H.E = 0,086 Kg.

B. Le groupe AFNOR

AFNOR signifie Association Française de Normalisation, est l'organisation officielle en charge des normes en France. Depuis 2004 et sa fusion avec l'Agence française pour l'amélioration et le management de la qualité (AFAQ), elle rattachée au groupe AFNOR qui agit dans les domaines de la normalisation, la certification, l'édition spécialisée et la formation.

Annexes

Annexe IV : les appareils utilisés dans cette étude expérimentale

La réalisation de ce travail a nécessité l'utilisation des appareils suivant :

- Hydrodistillateur est l'alambic, pour l'extraction des huiles essentielles



Annexes

- Chaudière est la source de chaleur.



-Autoclave pour l'incubation de milieu de culture.



Annexes

- Agitateur à barreau magnétique non chauffant pour assurer l'homogénéisation des composants du milieu.

