

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

UNIVERSITE SAAD DAHLEB DE BLIDA
FACULTE DES SCIENCES AGRO-VETERINAIRES
DEPARTEMENT DES SCIENCES AGRONOMIQUES

Mémoire de fin d'étude en vue de l'obtention du diplôme de master académique en

Sciences de la nature et de la vie

Spécialité : phytopharmacie appliquée

Estimation de l'activité fongicide des huiles essentielles du thym et de l'eucalyptus à l'égard de trois isolats phytopathogènes (*Fusarium sp*, *Botrytis sp*, *Alternaria sp*)

Présenté par : Mlle. **BENSALEM Manel**

Devant les membres de jury composé de :

Mme AMMAD F.
Mr DJAZOULI Z.
Mme BENSAID F.
Mme BRAHIMI L.

M.A.A , U.S.D.B.
M.C.A, U.S.D.B.
M.A.A , U.S.D.B.
Docteur U.S.D.B.

Présidente
Promoteur
Examinatrice
Examinatrice

ANNEE UNIVERSITAIRE 2012/2013

Remerciement

Au terme de se modeste travail. Je tiens à remercier tous ceux qui ont contribué à la réalisation de ce projet.

Un grand merci tout spécial à mn cher papa et à ma maman, qui m'ont guidé dans l'aventure de la vie, qui m'ont donnée les conditions les plus parfaites pour mon évolution.

Ma gratitude à mon professeur Dr Djazouli, qui a su me redonner la force d'avancer jusqu'au terme de mon mémoire. Je lui dois cette réussite, que Dieu le protège et le garde à ses proches.

Merci à Mme la présidente Sahraoui Amade pour sa présence.

Merci aux examinatrices qui ont pris le temps d'examiner mon travail.

Je remercie Melle Amina ; la technicienne de laboratoire de zoologie, pour ces encouragements et sa gentillesse, ainsi que Mme Djamilia pour ses conseils.

J'exprime mes profondes remerciements à Mr Djamel et Melle Zhadidja ; les techniciens de laboratoire du bureau d'hygiène de Faroukha.

Et en final, je ne saurai remercier assez, ma meilleure amie, ma sœur Méchalikh Zhadidja, qui sans elle, je ne saurai présentée un telle travail convenablement, de m'avoir tenu la main jusqu'au dernier moment.

Je remercie Mr Saidani Fayçal de m'avoir soutenu même de loin dans les moments les plus difficiles dans mon parcours.

Dédicace

Je dédie ma réussite à mes chers parents que j'aime le plus au monde.

A ma sœur Affaf, à mn frère Samir et mes deux frères Rafik et Hamza.

A ma belle sœur Nesrine, et je lui souhaite la bienvenu dans la famille Bensalem.

A mes amis Jojo et Fayçal.

S. Manel

Résumé : activité antifongique de l'eucalyptus et du thym vis à vis de trois isolats phytopathogènes.

La lutte biologique par les huiles essentielles formulées présente un bénéfice à double tranchant, de fait de leur efficacité contre le ravageur cible, et de leur non toxicité envers l'environnement et l'être humain.

La présente étude vise à évaluer la sensibilité des trois souches fongiques *Fusarium sp*, *Alternarias sp* et *Botrytis sp* souches envers des formulation à base d'huiles essentielles complètes (Eucalyptus10% et Thym10%) et chémotypées (Thymol 14% et Thymol 7% + Carvacrol7%).

L'étude a été réalisée *in vitro* sur milieu OGA. Les résultats ont montré que les huiles essentielles chémotypées Thymol et synergie (Thymol+ Carvacrol) sont beaucoup plus actifs que les huiles essentielles complètes (eucalyptus, thym).

L'activité inhibitrice du Thymol + Carvacrol est puissante, les pourcentages d'inhibition varient entre 75,75 % dans le cas de l'*Alternaria sp*, et de 100% dans le cas de *Botrytis sp* et de 68.78% dans le cas du *Fusarium sp*. Les champignons phytopathogène ont montré une sensibilité accrue à l'augmentation des doses des hiles essentielles dans les formulations.

Mots clés : huiles essentielle, chémotype, activité antifongique, sensibilité, pathogènes, zone d'inhibition.

Abstract: antifungal activity of eucalyptus and thyme screw lives of three phytopathogenic isolates

Biological control by essential oils has made a profit double-edged, indeed their efficacy against the target pest, and their non-toxic to the environment and human beings. This study aims to assess the sensitivity of the three fungal strains *Fusarium* sp sp *Alternarias* and *Botrytis* sp strains to the formulation based on complete essential oils (Eucalyptus10% and Thym10%) and chemotyped (Thymol 14% and 7% + Thymol Carvacrol7 %).

The study was conducted in vitro OGA environment. The results showed that the essential oils thymol and synergy chemotyped (Thymol Carvacrol +) are much more active than the full essential oils (eucalyptus, thyme). The inhibitory activity of Thymol Carvacrol + is powerful, the percentages of inhibition ranging from 75.75% in the case of *Alternaria* sp, and 100% in the case of *Botrytis* sp and 68.78% in the case of *Fusarium* sp. The phytopathogenic fungi showed an increased sensitivity to increasing doses of essential hilum in the formulations.

Keywords: essential oils, chemotype, antifungal activity, sensitivity, pathogen inhibition zone.

ملخص

حققت المكافحة البيولوجية عن طريق الزيوت العطرية ربح ذو حدين بالإضافة إلى فعاليتها ضد الآفات المستهدفة فهي غير سامة للبيئة و البشر. تهدف هذه الدراسة إلى تقييم حساسية ثلاث سلالات فطرية متمثلة في *Alternaria sp - Botrytis sp - Fusarium sp* و هذا باعتماد صياغات لزيوت أساسية كاملة من الكاليتوس و الزعتر و زيوت *chémotypée* من الثيمول و الثيمول + الكارفاكروول. أظهرت النتائج أن الزيوت الأساسية للكاليتوس و الزعتر هي الأكثر نشاطا من الزيوت الثيمول و الثيمول + الكارفاكروول. كما أنها أظهرت قوة مثبطة أدت إلى زيادة الحساسية عند الفطريات الممرضة للنبات.

كلمات البحث: الزيوت الأساسية، *chemotype*، نشاط مضاد للفطريات، والحساسية، منطقة تثبيط العوامل المسببة للأمراض.

Abréviation :

- % : pourcentage
- Alt : Alternaria
- Btr : Botrytis
- Carv : carvacrol
- Euc : eucalyptus
- Fig. : figure.
- Fus : Fusarium
- g : gramme
- HE : huile essentielle
- HECT : huile essentielle chémotypée
- INRA : Institut National de la Recherche Agronomique.
- ml : millilitre
- OGA : Oxytetracycline Glucose Agar
- SDE : distillation par extraction simultanée.
- Thl : thymol
- Thy : thym
- CNRFinfo : centre notionnelle de la recherche française.

Liste des tableaux :

Tableau 01 : Les grandes étapes de la mise en place de la gestion intégrée des maladies et ravageurs dans le cadre plus général d'une production.	13
Tableau 02 : Moyens de lutte contre les principales maladies.	15
Tableau 03 : quelque micro-organisme enthomopathogènes contre les agents phytopathogènes.	18
Tableau 04 : Activités biologiques des composés polyphénoliques.	21
Tableau 05 : localisation des métabolites secondaires au niveau des tissus végétaux.	22
Tableau 06 : les différentes dilutions utilisées dans le traitement.	28

Liste des photos :

Photo 01 : huiles essentielles.	28
Photo 02 : disque de pépiée Wattmen.	29

Liste des figures :

Fig. 1 : Taches nécrotiques brunes foncées à noires, résultant d'une infection secondaire par <i>Alternaria</i> sur une feuille atteinte par la jaunisse virale.	5
Fig. 2 : Dégât important de cercosporiose : dessèchement complet du bouquet foliaire et formation de repousses.	5
Fig. 3 - A: Le mildiou sur le feuillage se caractérise par l'apparition de taches brunâtres auréolées d'un liseré vert clair sur la face supérieure de la feuille.	5
Fig. 3 - B: sur le pourtour des taches, sur la face inférieure des feuilles, un feutrage blanc grisâtre peut apparaître par temps humide.	5
Fig. 4 : Dessèchement de betteraves gravement atteinte par la ramulariose.	5
Fig. 5 : Déformation du bouquet foliaire occasionné par le mildiou : épaissement des feuilles du cœur et recouvrement par un duvet violacé.	5
Fig. 6 : Jaunisse et flétrissement foliaire dû à verticilliose.	6
Fig. 7 : Tumeurs foliaire provoquées par le champignon <i>Urophlyctis</i> .	6
Fig. 8 : Fusariose des épis et des tiges sur le maïs provoqués par une infestation par des espèces de <i>Fusarium</i> .	6
Fig. 9 : Cycle biologique de <i>Botrytis cinerea</i> .	7
Fig. 10 : a). grappe de raisin attaquée par <i>Botrytis cinerea</i> b). agrandissement présentant la destruction de la grappe de raisin et la sporulation de <i>Botrytis cinerea</i> .	7
Fig. 11 – A : <i>Alternaria alternata</i> sur tubercule. B : <i>Alternaria alternata</i> sur feuilles.	10
Fig. 12 : Les cinq approches de la protection intégrée des cultures.	12
Fig. 13 : importance des catégories des biopesticides.	16
Fig.14 : diagramme des zones d'inhibition	33
Fig. 15: Projection de la sensibilité des souches en vers les pathogènes sur les deux axes de l'ACP.	41
Fig. 16 : Effets comparés de l'activité des huiles essentielles envers les souches fongiques.	42
Fig. 17 : effet antifongique des quatre huiles essentielles formulées sur les trois souches fongiques.	43
Fig.18: Projection de l'activité antifongique en vers les pathogènes sur les deux axes de l'ACP.	44
Fig. 19 : effet inhibiteur en interaction avec les extraits, les pathogènes et les concentrations	46

Table des matières

Sommaire :	pages
Dédicace	
Remerciement	
Resumé	
Liste des abréviations	
Liste des tableaux	
Liste des photos	
Liste des figures	1
Introduction.....	3
I. Généralités sur les champignons phytopathogène.....	3
1. Symptomologie	6
2. Les maladies fongiques	8
2.1. La pourriture grise.....	9
2.2. La fusariose.....	10
2.3. L'altérioriose.	12
3. Mode d'action des phytopathogène.....	12
II. Stratégie préventif contres les champignons phytopathogène.....	14
1. Approche culturales.....	14
2. Approche physique.....	16
3. Approche biotechnologique.....	16
4. Approche biologique	17
4.1. Endomycorhizes.....	17
4.2. Rhizobacteries.....	19
4.3. Eliciteurs.....	19
5. Approche chimique.....	19
III. Biopesticides.....	19
1. Biopesticides d'origine végétal.....	20
1.1. Définition et fonction des métabolites secondaires....	20
1.2. Classification des métabolites secondaires.....	21
1.3. Localisation des métabolites secondaires.....	22
2. Biopesticides d'origine végétal à base lipidique.....	22
2.1. Définition des huiles essentielles.....	23
2.2. Mode d'action des huiles essentielles.....	23
2.3. Localisation des huiles essentielles dan les tissus....	23
2.4. Propriétés des huiles essentielles.....	23
2.4.1. Propriétés chimiques.....	24
2.4.2. Propriétés physiques.....	24
2.4.3. Propriétés antimicrobienne.....	25

2.5.	Les huiles essentielles chémotypées	26
2.6.	Méthodes d'extraction.....	
II.	Matériels et méthodes.....	27
1.	Matériel d'étude	27
1.1.	Extraction et formulation des huiles essentielles.....	27
2.	Méthodes d'étude	28
2.1.	Etude in vitro du pouvoir antifongique.....	28
2.2.	Sensibilité et zone d'inhibition.....	29
2.3.	Détermination de l'activité antifongique.....	30
3.	Analyse statistique.....	30
III.	Résultats.....	32
1.	Evaluation de la zone d'inhibition sous l'effet du bioproduits à base d'huiles essentielles.....	32
1.1.	Evaluation des zones d'inhibition sous l'effet des bioproduits à base d'HE.....	32
1.2.	Tendance d'évolution des zones d'inhibition sous l'effet des bioproduits à base d'HE.....	34
1.3.	Evaluation comparée de la zone d'inhibition sous l'effet des bioproduits à base d'HE.....	37
2.	Evaluation de l'activité antifongique des bioproduits à base des huiles essentielles.....	38
2.1.	Evaluation temporelle de l'activité antifongique sous l'effet des bioproduits à base HE.....	38
2.2.	Tendance de l'activité antifongique sous l'effet des bioproduits à base d'HE.....	39
	Etude comparé de l'activité antifongique sous l'effet de bioproduits à base d'HE.....	42
		43
		43
		44
		45
IV.	Discussion.....	47
1.	Effet des formulations des huiles essentielles sur la sensibilité des souches.....	47
2.	Evaluation de l'activité antifongique des formulations des huiles essentielles sur les pathogènes.....	48
	Conclusion.....	52
	Références bibliographiques	
	annexe	

Introduction

Introduction général :

La plante, comme tout organisme vivant, est influencée durant toute sa vie par les conditions climatiques et édaphiques du milieu. Ces conditions, vont lui assurer soit un environnement favorable à la croissance et au développement, soit la soumettre à des facteurs de stress abiotiques ou biotiques qui vont perturber son métabolisme et provoquer des anomalies ; Les stress de type biotiques sont dus à l'interaction de la plante avec d'autres organismes comme les champignons, les nématodes, les bactéries, les virus ,les viroïdes et les insectes. Comme tout stress, les maladies parasitaires affectent la croissance, la fertilité et la productivité des plantes (Ben hassena, 2009)

Les champignons parasites sont parmi les organismes nuisible qui peuvent affecter la plante, sont responsables des trois-quarts environ des maladies, et cela constitue également un important problème économique. On peut en effet estimer largement que 10 % des récoltes sont perdues à cause des maladies. Parmi celles-ci, on peut citer les mildious, les oïdiums, les rouilles, les chancres, les piétins. Le champignon pathogène peut se maintenir dans le sol, sur d'autres plantes, ou sur des débris végétaux, en attendant de se trouver en contact avec la plante-hôte (Anonyme, 1999)

Le concept de « lutte intégrée», ou mieux encore la « protection intégrée » (*Integrated Pest Management* ou IPM), est utilisée pour gérer les problèmes des maladies et des espèces nuisibles aux cultures de manière responsable pour l'environnement. Elle se caractérise par une action de lutte contre les ennemis des cultures prenant en compte les relations entre l'organisme nuisible et ses antagonistes, la plante et son environnement, tout en considérant les caractéristiques du contexte socio-économique local (Schiffers et Wainwright, 2001). Les pesticides ne seront toutefois utilisés que si aucune autre solution n'est disponible ou économiquement viable, et seulement si le risque pour le consommateur, pour l'environnement, pour la biodiversité ou pour l'apparition de résistances, n'est pas excessif par rapport au « bénéfice » (Renault-Roger, 2005)

Le rôle des plantes dans la protection phytosanitaire et la lutte contre les ravageurs est de même manière mentionné dans des textes antiques chinois, romains, grecs et indiens. Mais il a fallu attendre la fin de XIXe siècle pour que la conjugaison des pratiques empiriques et des observations scientifiques, ainsi que les progrès des techniques analytiques, conduisent au développement de la première génération des biopesticides d'origine végétal. (Renault-Roger, 2005) connaissent actuellement un développement

spectaculaire, en dépit de fait de leur hétérogénéité sur le plan chimique puisqu'un extrait recèle plusieurs dizaines de molécules et que sa composition est affectée par de nombreux facteurs (Regnault-Roger, 2002). Les huiles essentielles sont utilisées dans la lutte phytosanitaire et leurs usages se développent en particulier aux Etats-Unis, puisqu'elles sont exemptées de la procédure d'homologation auxquelles sont soumis les produits phytosanitaires (Renault-Roger et al., 2005).

L'activité antimicrobienne des huiles essentielles est principalement fonction de leur composition chimique, en particulier de la nature de leurs composés volatils majeurs. Les huiles essentielles et leurs composés constitutifs empêchent la multiplication, la sporulation et la synthèse des toxines. Sur les levures, ils agissent sur la biomasse et la production de pseudomycelium. Sur les moisissures, ils inhibent la germination des spores, l'élongation du mycélium, la sporulation et la toxino-génèse (Hulin et al., 1989).

Actuellement divers études de recherche scientifique traitent le développement du marché phytopharmaceutique, sont en voie de concrétisation, (Boukhatem et al., 2010). Notre recherche est cadrée sur la valorisation des nouvelles molécules extraites naturellement des plantes aromatiques de la flore sauvage Algérienne dans le plan agronomique.

Dans le cadre de notre recherche nous nous sommes intéressés au développement des méthodes de lutte biologique par le recours aux dérivés végétaux naturels notamment les huiles essentielles. On s'est intéressés à l'étude *in vitro* de l'effet antifongique des huiles essentielles formulées à différentes concentrations de deux plantes : *Eucalyptus* et *le Thym* sur une gamme de champignons phytopathogènes du genre: *Fusarium sp*, *Botrytis sp* et *Alternaria sp*. La principale approche dans cette problématique consiste à démontrer la sensibilité des pathogènes et à comparer l'activité antifongique à différentes doses des huiles essentielles complètes et chémotypées..

Chapitre I

Recherche bibliographique

I. Généralité sur les champignons phytopathogènes :

Aujourd'hui il y aura 100.000 espèces de champignons dont la grande majorité sont des champignons saprophytes, c'est à dire des champignons vivant dans la terre, et participant au cycle du carbone, de l'oxygène, ainsi que d'autres espèces organiques. (Charpy et Maquin, 2010). Une minorité des champignons ont des effets pathogènes et des virulences très différentes et sont susceptibles d'entraîner des désagréments, voire des maladies graves et/ou létales pour l'être humain, les animaux et les végétaux. (Cusstr, 2009).

Les parasites des cultures maraîchères peuvent être rangés dans deux groupes biologiques différents. Le premier comporte des espèces vivant dans le sol ou à la surface qui se rangent dans trois genres : *Pythium* (Siphomycètes), *Sclerotium* et *Rhizoctonia* (champignons stériles). Le second comprend les parasites qui s'attaquent aux organes aériens ; ils appartiennent à des groupements systématiques très divers tels que les Imparfais (*Cladosporium*, *Cercospora*, *Helminthosporium*, *Alternaria* et *Stemphylium*, *Septoria*, *Colletotrichum*), les Ascomycètes (*Oidium* et *Leveillula*), les Basidiomycètes (Rouilles) et les Mucorales (*Mildio* et *Choizephora*). (Boisson et Renard, 1957 ; Le Roux, 2005 ; Le Poivre, 2003 ; Ousmail et al., 2011).

L'appareil végétatif des champignons est un thalle composé de filaments (hyphes) ramifiés dont l'ensemble constitue le mycélium. Ils se reproduisent grâce à des spores. Celles-ci sont issues soit d'une reproduction sexuée (champignon téléomorphe) ou d'une multiplication asexuée (champignon anamorphe). Certains champignons, chez qui les deux formes coexistent sont appelés holomorphes. (Reis et Boiteux, 2007).

1. Symptomatologie :

D'après CNRFinfo (2001), les champignons représentent les principaux micro-organismes pathogènes des plantes. Ils sont responsables de nombreuses maladies, et causent des dommages économiquement importants dans toutes les régions du monde et sur tous les types de cultures.

Le développement du mycélium, qui détourne à son profit les substances élaborées par les cellules végétales, va se traduire par un certain nombre de symptômes, propres à chaque maladie : jaunissement, flétrissement, nécroses générales ou localisées, altération de la croissance des organes de la plante. (Anonyme 2, 1999). Les principaux symptômes d'après Zaïm et Bekkar ; Perret (2001)

Modifications de couleur :

- **Anthocyanose** : excès de pigments rouge violacé
- **Chlorose** : pâleur de la coloration du feuillage pouvant aboutir à une jaunisse
- **Mélanose** : production de substances foncées (mélanine)
- **Mosaïque** : alternance de zones de coloration vert pâle ou vert foncé et de zones chlorotiques ou jaunâtres

Altérations d'organes :

- **Nécrose** : altération résultant de la mort des cellules, nécroses locales ou complètes des tissus,
- **Pourriture** : altération résultant d'une décomposition des tissus
- **Flétrissement** : perte de turgescence

Modifications anatomiques des rameaux et des tiges

- **Balai de sorcière** : prolifération abondante des ramifications d'une tige
- **Chancre** : altération localisée de l'écorce

Modification au niveau des feuilles

- **Frisolée** : boursouflure et gaufrage du limbe foliaire

Modifications touchant les fleurs

- **Virescence** : pièces florales restant vertes
- **Chloranthie** : transformation de verticilles floraux en organes foliacés

Anomalies de croissance :

- **Nanisme et atrophie** : réduction de la taille de la plante ou de ses organes
- **Déformations d'organes** : une hypoplasie (retard dans le développement de la plante) ou une hyperplasie (croissance accrue d'une partie ou de la totalité de la plante).

Anomalies internes :

- **Tylose** : expansion vésiculeuse se formant dans le xylème à partir de cellules
- **callose** : Dépôts anormaux :

Excroissances pathologiques

- **Gale** : altération superficielle de l'épiderme de la plante
- **Galle** : excroissance dues aux insectes, bactéries et champignons
- **Tumeur** : prolifération anarchique des tissus suite à une modification génétique des ces cellules végétales



Fig. 1 : Taches nécrotiques brunes foncées à noires, résultant d'une infection secondaire par *Alternaria* sur une feuille atteinte par la jaunisse virale. (Hermann)



Fig. 2 : Dégât important de cercosporiose : dessèchement complet du bouquet foliaire et formation de repousses. (Hermann)



Fig. 3 - A : Le mildiou sur le feuillage se caractérise par l'apparition de taches brunâtres auréolées d'un liseré vert clair sur la face supérieure de la feuille. (Dereycke ; Dupuis et Vuylsteke, 2007)



Fig. 3 - B : sur le pourtour des taches, sur la face inférieure des feuilles, un feutrage blanc grisâtre peut apparaître par temps humide. (Dereycke; Dupuis et Vuylsteke, 2007)



Fig. 4 : Dessèchement de betteraves gravement atteinte par la ramulariose. (Hermann)



Fig. 5 : Déformation du bouquet foliaire occasionné par le mildiou : épaissement des feuilles du cœur et recouvrement par un duvet violacé. (Hermann)



Fig. 6 : Jaunisse et flétrissement foliaire dû à verticilliose. (Hermann)



Fig. 7 : Tumeurs foliaire provoquées par le champignon *Urophlyctis*. (Hermann)



Fig. 8 : Fusariose des épis et des tiges sur le maïs provoqués par une infestation par des espèces de *Fusarium*. (Tomke et al., 2001)

2. Maladies fongiques :

2.1. La pourriture grise :

La pourriture grise est une maladie aérienne provoquée par le champignon saprophyte *Botrytis cinerea*. Pers. Ce dernier représente la forme conidienne imparfaite de *Botryotinia fuckeliniana* qui fait partie des Deutéromycètes, classe des Hyphomycètes, ordre des Moniliales et à la famille des Moniliacées. (Ben hassena, 2009), on la retrouve sur les plantes les plus variées (INRA, 2009), ce champignon les affaiblissant ou les tuant à n'importe quel stade de leur développement ou même en période de stockage causant ainsi des pourritures caractéristiques de coloration

grise noire et aux contours imprécis au niveau des feuilles, du pédoncule, des fleurs, des sépales, des tiges et des fruits Les pertes provoquées par ce champignon sont estimées à 20% des récoltes mondiales (Ben hassena, 2009)

Les espèces *Botrytis* sont toutes pathogènes et saprophytes. La maladie se développe principalement sur les grappes de raisins, les petits fruits rouges, certains légumes (concombres, tomates) et les fleurs d'ornement. On dénombre actuellement plus de 235 espèces sensibles à l'attaque par *Botrytis cinerea* (Perret, 2001)

Les attaques de *B. cinerea* sont à redouter en condition humides, à des températures comprises entre 15°C à 20°C, sur des plantes étiolées par des conditions de luminosité insuffisante. (Messiaen et al., 1991). Il hiverne à l'état de mycélium ou de sclérotes dans les tissus végétaux infectés. Au printemps, de nombreuses spores se forment dans les tissus infectés et sont transportées par le vent vers les fleurs où surviennent les infections primaires. L'humidité favorise les infections. Ultérieurement au cours de la campagne, les spores atteignent le fruit en maturation où elles provoquent des infections. (Anonyme ; 2007)

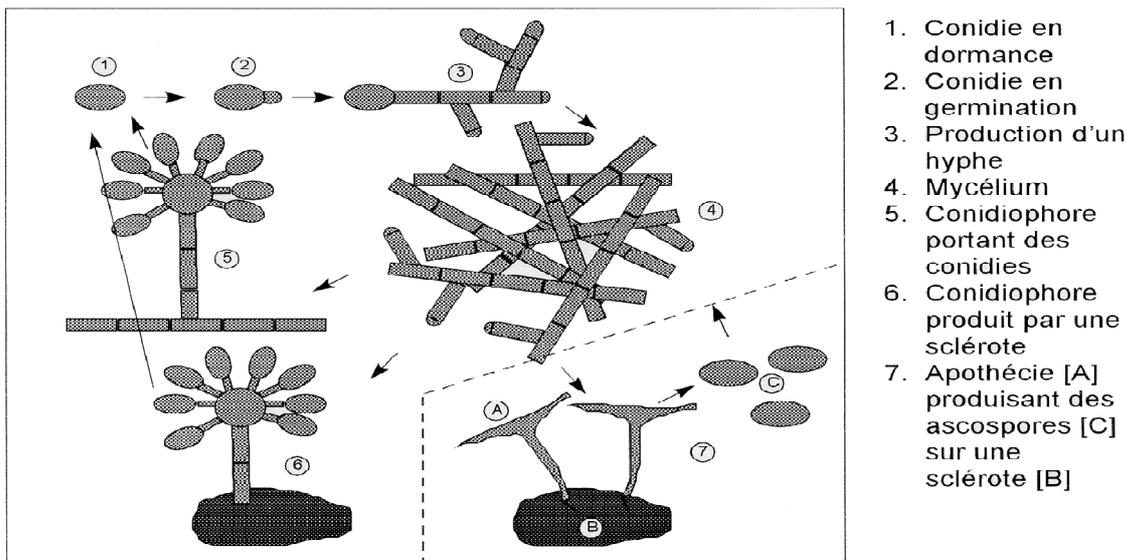


Fig. 9 : Cycle biologique de *Botrytis cinerea* (Perret, 2001)



Fig. 10 : a). grappe de raisin attaquée par *Botrytis cinerea*
b). agrandissement présentant la destruction de la grappe de raisin et la sporulation de *Botrytis cinerea* (Perret, 2001)

2.2. La Fusariose :

L'intérêt porté à la fusariose a été initialement dû aux répercussions de cette maladie sur les plantes cultivées, pouvant entraîner jusqu'à 50% de perte de rendement des cultures (Champeil, 2004). La fusariose est causée par certains champignons du genre *Fusarium*. Qui sont considérés comme étant les champignons telluriques les plus agressifs. (Michel et *al.*, 2007)

Les *Fusarium* appartiennent à la classe des Adélomycètes, à l'ordre des hyphales et à la famille des Tuberculariées. Ils représentent un grand nombre d'espèces comme le *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* qui attaque la culture de tomate, le *Fusarium oxysporum* f. sp. *Melonis* qui attaque la culture de melon ainsi que le *Fusarium solani* qui attaque les solanacées. Ces champignons, représentant des formes conidiennes d'Ascomycètes Hypocréacées, (Ben hassena , 2009). La fusariose résulte du développement de pathogènes susceptibles d'appartenir à l'un ou à l'autre de deux genres de champignon : *Fusarium* (du groupe Ascomycètes) et *Microdochium* (du groupe Deuteromycètes, phylogénétiquement proche des Ascomycètes) (Champeil, 2004)

Le pathogène de la fusariose est capable de se maintenir dans le sol, soit en menant une vie saprophytique sur des débris végétaux, soit sous forme d'organes de conservation comme les zygotes ou les sclérotés (Michel et *al.*, 2007).

Les *Fusarium* peuvent fructifier, c'est-à-dire produire des spores (particules microscopiques), sur les débris laissés à la surface du sol. par exemple Le *F. graminearum* produit deux types de spores, les macroconidies et les ascospores. Les macroconidies sont généralement transportées par les éclaboussures de pluie. Les ascospores, quant à elles, en plus d'être transportées par la pluie le sont également par les déplacements d'air ou le vent. Les insectes peuvent aussi transporter des spores jusqu'aux épis (Pageau et Filion, 2007).

L'invasion systémique du pathogène provoque des dommages sur le système vasculaire des plantes, induisent des perturbations dans la circulation de la sève par la détérioration des vaisseaux et / ou l'accumulation des substances toxiques, provoquant ainsi l'obstruction total ou partielle des tissus vasculaire (Mourichon, 2003 ; Mechouche et Saidi, 2010)

Les premiers symptômes de la fusariose sont détectables sous forme de zones rougeâtres à nécrotiques au niveau du système vasculaire des racines lesquels constituent les points d'entrée de l'agent pathogène. Ceux qui sont déjà visibles sur les limbes indiquent déjà un niveau avancé de la maladie. Les symptômes externes les plus typiques consistent en un jaunissement des feuilles les plus âgées. Ces jaunissements sont des stades transitoires qui évoluent ensuite en un flétrissement

des feuilles avec cassure au niveau de la base du pétiole. Différents degrés d'attaque du système vasculaire se traduisent par la présence encore fonctionnelle (couleur verte) des plus jeunes feuilles produites au centre du plant ; mais parfois tout le système aérien est atteint caractérisé par un flétrissement touchant l'ensemble du plant (Messiaen et *al.*, 1991 ; Mourichon, 2003).

2.3. Alternariose :

L'agent pathogène *Alternaria* est le genre de champignon dont les espèces peuvent se trouver en tous lieux, dans l'atmosphère, sur les plantes sénescents, sur des légumes, sur des débris organiques divers, sur le sol et sur des produits alimentaire ou ils hivernent (Bouneghou, 2011). Il se trouve a différentes profondeurs ; *A.altarnata* Fr Keiser peut arriver a une profondeur de 10 cm alors que *A.solani* arrive à 20 cm de profondeur. Ces espèces sont donc de loin les plus rependus et mènent le plus souvent une vie saprophytique, en dehors les hôtes principales. (Driss, 1990). Les conditions propices à son développement sont la Températures entre 20 et 30°C, accompagnées d'alternance de périodes chaudes et humides. L'aternariose est favorisée par des stress, entre autre la sécheresse. (Anonyme, 2011). c'est un agent pathogène de faiblesse (particulièrement pour *A. alternata*, qui se développe sur les feuilles déjà atteintes par *A. solani*, ou sur des feuilles vieilles (bas de tiges) ou abîmées par le vent et la grêle, plantes en manque d'eau, de lumière et/ou d'éléments nutritifs, particulièrement l'azote (N), le manganèse (Mn), le magnésium (Mg) et le soufre (S). (Ryckmans)

Les symptômes sur feuillage sont caractérisés par des taches dispersées, très bien délimitées, brunes à brun-noir, de type nécrotique avec un contour anguleux, de quelques millimètres jusqu'à 2 cm de diamètre. Sur les plus grosses taches, on voit à l'œil nu des anneaux concentriques, caractéristiques de cette maladie Les tiges attaquées par *Alternaria solani* présentent des plages superficielles colorées en brun, qui s'agrandissent avec le développement de la maladie, puis le dessèchement de la tige peut entraîner sa mort ou celle de toute la plante. Sur tubercules, l'alternariose provoque une pourriture sèche. Un pathogène apparenté (*Alternaria alternata*) se manifeste par de nombreuses petites taches d'un maximum de 0,5 cm. (Dupuis et Rolot, 2007) Les Principales maladies provoquées par l'agent pathogène *Alternaria sp* sont :

- **L'aternariose**, aussi appelée brûlure alternarienne, est causée par deux champignons du genre *Alternaria*: *Alternaria solani* et *Alternaria alternata*. Les premiers symptômes de brulure se présentent en grandes taches irrégulières noirs. Les tissus nécrosés entourés par des grandes zones jaunes, et les taches ont une apparence caractéristique de coquilles d'huitres ou œil de bœuf. Les lisions apparaissent simultanément sur les tiges et les pétioles, les dégâts causés sur les premières fruits par ce champignon, sont sous forme de creux noir. La pluie humide

favorise l'infection. L'irrigation peut contribuer à la propagation de la maladie. (Ryckmans)

• **Chancre à l'*alternaria***, cette maladie est causée par l'agent phytopathogène *Alternaria alternata* f. sp. *Lycopersic*. Les symptômes induits sont des chancres sur les tiges d'une coloration brune foncé sec, divisé et ceinturent la tige, sur les feuilles des chancres bruns ou noir se développent avec des lésions nécrotiques sur des vastes régions du limbe et entre les nervures. Les fruits sont infectés avant leur maturité (stade vert), mais mes symptômes apparaissent durant la période de maturation. Des chancres et des lésions grisâtes apparaissent sur les fruits (Attabe et Haddadou, 2009)

• **Taches alternariennes**, les taches brunes tirant vers le brun jaunâtre, circulaires, de petites à grandes, dispersées sur la feuille peuvent être causées par des champignons des genres *Alternaria*. Ce sont généralement des agents pathogènes faibles, qui peuvent également vivre en saprophytes sur les tissus morts. Les taches foliaires causent rarement d'importants dégâts dans les cultures (Bouneghou, 2011).



Fig. 11 – A : *Alternaria alternata* sur tubercule.
(Bouneghou , 2011)



Fig. 11 – B : *Alternaria alternata* sur feuilles.
(Bouneghou, 2011)

3. Mode d'action des phytopathogène :

Certains des composés libérés par les champignons influencer les organismes qui interagissent avec des champignons conduisant à une interprétation anthropocentrique de la fonction dans le champignon. Certains métabolites, appelés toxines, sont des composés qui ont le potentiel de tuer un organisme. (Anonyme, 2004), L'analyse des génomes des champignons montre que ces organismes présentent une abondance en voies de biosynthèse de métabolites secondaires. (Collemare et al., 2011). On distingue actuellement surtout trois groupes de métabolites:

• **Les alcaloïdes** sont des molécules riches en azotes et qui souvent dérivent d'acides aminés. Un exemple célèbre est le LSD (dont le précurseur est produit par l'ergot de seigle, le *Pezizomycotina Claviceps purpurea*) connu pour ses effets hallucinogènes. (Anonyme 1, 2012)

• **Les polykétides** sont synthétisés par des enzymes multifonctionnels par addition de molécules à deux carbones plus ou moins modifiées et dérivées de l'acétyl-CoA (comme la synthèse des acides gras, Les produits dérivés des polykétides les plus connus sont des DHN mélanines qui sont des grosses molécules insolubles, colorées et sans activité biologique autre que la protection des organismes contre les UV, les dérivés actifs de l'oxygène et autres dommages. Par contre, il existe des polykétides hautement toxiques: ochratoxines, sterimagicystine, aflatoxine (Anonyme 2, 2012)

• **Les peptides cycliques ou cyclopeptides** sont assemblés par de gigantesques protéines en dehors de la traduction. (Anonyme 3, 2012)

Les interactions entre la plante et le champignon intervenant dans cette spécificité ont lieu dans les premières cellules infectées, juste après la pénétration. La spécificité d'hôte de certains champignons dépend de leur capacité à produire des toxines sélectives. Ces toxines sécrétées pendant et après la pénétration ne sont toxiques que pour la plante-hôte du champignon pathogène, Après leur pénétration dans la plante-hôte, le champignon peut être identifié par les systèmes de reconnaissances de la plante. Cette étape de reconnaissance plante-champignon est primordiale pour le succès de l'infection, car seuls les champignons qui n'auront pas été reconnus par les nombreux gènes de résistance de la plante pourront continuer leur processus infectieux. (Lebrun, 2011). La plante répond à la pénétration du champignon dans ses cellules de diverses manières. Sa résistance à cette agression est une caractéristique génétique (et un critère important dans la sélection des variétés de plantes cultivées), mais dépend aussi de plusieurs autres facteurs (lumière, âge de la plante, nutrition, présence de blessures) (De Jeude, 2004)

II. Stratégie de lutte contre les champignons phytopathogène :

Les progrès accomplis dans l'efficacité de la protection des cultures contre leurs parasites, ravageurs et adventices ont largement contribué à l'amélioration quantitative et qualitative de la production agricole. Dans le cadre d'une lutte intégrée, la protection des plantes peut être divisée suivant cinq approches :

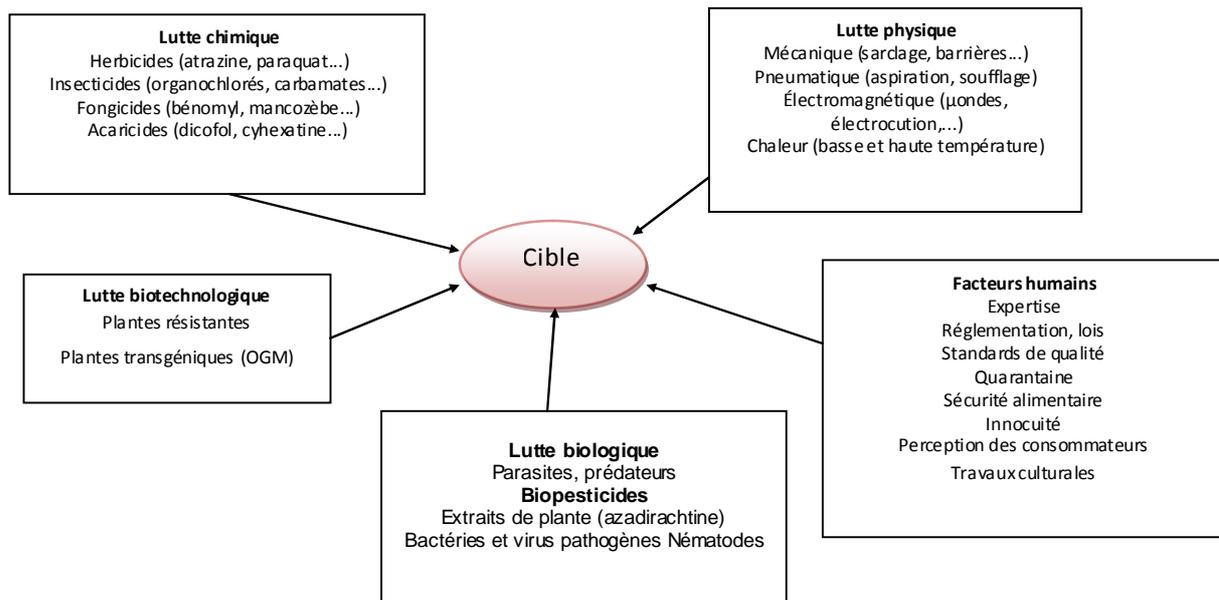


Fig. 12 : Les cinq approches de la protection intégrée des cultures. (Vincent et *all.*, 2000)

D'après la CTA (Centre de Technique Agricole) en 2008, la lutte intégrée dispose de plusieurs méthodes : la prévention de la prolifération des organismes nuisibles, l'emploi de méthodes culturales (comme par exemple la rotation des cultures ou la résistance variétale), la lutte biologique qui fait appel aux ennemis naturels des ravageurs et l'épandage modéré de pesticides, de préférence naturels — c'est-à-dire à base de plantes — dont la rémanence est faible, et en dernier ressort les pesticides de synthèse utilisés de façon ciblée.

En diminuant la dépendance des producteurs envers les pesticides, la lutte intégrée permet de réduire les coûts de production tout en réduisant significativement le risque de résidus dans l'environnement et sur la santé humaine (Schiffers et Wainwright, 2001)

Tableau 1 : Les grandes étapes de la mise en place de la gestion intégrée des maladies et ravageurs dans le cadre plus général d'une production.

Pratiques agroenvironnementales	Actions à mettre en place lors de la :		
	Première étape	Seconde étape	Troisième étape
Etude du site et des conditions environnementales	Identification des risques environnementaux (érosion, pollution des eaux,...)	Aménagement parcellaire (disposition des parcelles, plantation de haies, mises-en place de dispositifs enherbés,...)	Adaptation de l'écosystème : utilisation de moyens visant à rendre l'écosystème favorable aux organismes utiles et aux cultures, mais difficile à vivre pour les ennemis des cultures
Analyse des pratiques culturelles	Identification des pratiques à risque pour l'environnement	Adoption de pratiques culturelles favorables pour l'environnement (sens du labour, semis direct, fractionnement des apports azotés,...)	
Suivi des champs et évaluation de la situation générale	Visite des champs et diagnostic des parasites observés (1-2 fois/semaine)	Suivi permanent des champs et monitoring des ravageurs selon des techniques reconnues pour chacune des cultures	
Identification des ennemis et de leurs auxiliaires	Identification précise des ravageurs	Identification des ravageurs et de leurs auxiliaires	Identification des auxiliaires et des ravageurs primaires et secondaires
Utilisation de seuils d'intervention	Utilisation d'un pesticide ou de tout autre moyen de lutte		
	Au bon moment (pas de seuil)	Au bon moment et justifié par l'emploi de seuils d'intervention	
Intégration de diverses méthodes de lutte	Peu souvent	Souvent	Presque toujours
	Utilisation de pesticides de synthèse principalement	Utilisation de pesticides de synthèse et de moyens alternatifs	Utilisation de moyens alternatifs principalement
Gestion des pesticides	Choix approprié des pesticides appliqués. Respect des doses et du DAR. Tenue d'un registre.	Rotation des familles chimiques (selon mode d'action des pesticides). Restriction d'usage	Choix de pesticides sélectifs pour les auxiliaires et respect de certaines périodes d'application
	Calibrage et réglage des appareils	Emploi de techniques d'application des pesticides visant la réduction des quantités et l'optimisation du traitement	
	Entreposage dans un endroit réservé à cette fin, fermé à clé	Adoption de mesures d'hygiène. Maintien des stocks de pesticides au minimum.	
	Application dans des conditions météorologiques favorables	Emploi de buses permettant de réduire la dérive des pesticides	
Formation	Triple rinçage et élimination des contenants de pesticides de façon sécurisée et respectueuse de l'environnement		
	Reconnaissance des ennemis et des auxiliaires. Formations sur les BPP et les BPA. Formation sur l'hygiène personnelle.		

(Schiffers et Wainwright , 2001)

1. Approche culturales :

Des mesures préventives doivent être adoptées pour limiter le développement des maladies cryptogamiques : entretien et travail du sol, techniques culturales, il faut créer des conditions qui leur soient défavorables, tout en favorisant au maximum un développement vigoureux des cultures. Pour cela, il faut placer les cultures dans un sol bien travaillé, correctement équilibré en éléments nutritifs (Fe, Mg, Mn...), la composition en azote, phosphate et potassium (N-P-k) et riche en microorganismes et en matière organique. (MADRPM/DERD, 1999). Un travail adéquat au bon moment évitera un stress des racines pouvant être lié à une compaction du sol ou un mauvais drainage. (Pageau et Fillion, 2007). Ainsi, Faire une association des cultures à action répulsive de certaines plantes vis-à-vis de certains insectes nuisibles ou maladies a été mise en évidence. Ce sont les toxines ou l'odeur dégagée par la plante associée qui provoquent cette action répulsive (Anonyme, 2006 ; Haouagu, 2009).

L'emploi d'espèce et/ou des variétés résistantes ou tolérants aux maladies, le greffage permet de lutter contre les parasites du sol en greffant une variété sensible sur une variété porte greffe résistant. L'utilisation des semences, rejets et tubercules sains diminuent considérablement le degré de propagation des maladies (Schiffers et Wainwright, 2001)

Le tableau si dessous résume toutes les pratiques culturales de différentes cultures en mesures général : rotation, contrôle de l'humidité, bonnes conditions de croissance.

2. Approches physiques :

La protection des végétaux faisant appel à des techniques de lutte physique, autant au niveau de la production que de la conservation, présente un intérêt accru. En effet, la plupart des techniques de lutte physique n'ont pas d'impact sur l'environnement. Lorsqu'il y a un impact, il est généralement circonscrit à un espace restreint et au moment de l'application du traitement (Vincent et *al.*, 2000).

La solarisation est une désinfection solaire du sol, obtenue en recouvrant celui-ci d'un film plastique transparent. Avant la pose du plastique le sol doit être préparé et humidifié comme pour la réalisation d'un semis. La bâche plastique assure la transmission du rayonnement solaire au sol et permet l'élévation de la température au-delà de 40°C. L'objectif de désinfecter les sols par solarisation permet principalement de protéger les cultures des attaques de champignons telluriques et de l'envahissement par les adventices (Schifers et Wainwright, 2001).

Tableau 2 : Moyens de lutte contre les principales maladies.

Culture	Ravageurs	Moyens de lutte
crucifères	Nervation noire	Variétés résistantes, traitement eau chaude semences, destruction des résidus
	Hernie	pH élevé, Ca, Mg,
	Pourriture molle (Br)	Choix des variétés, moment de récolte
	Alternariose	Traitement eau chaude semences, aération
	Rhizoctonie	Traitement eau chaude semences, aération
	mildiou	Aération, éviter aspersion
	Sclérotiniose	Aération, billons
Cucurbitacées	Flétrissement bactérien	Contrôle de la chrysome
	Oïdium	Parcelles séparées, variétés résistantes, soufre, huiles végétales et bicarbonate
	Anthraxose	Gestion des résidus, semences saines
Pomme de terre	Gale commune	Semences saines, éviter autres légumes racines précédent, variétés résistantes, garder sol humide
	Rhizoctonia	Semences saines, engrais vert sorgo/moutarde, éviter sol froid et humide au semis,
	Mildiou	Gestion rejets., cuivre
Solanacées	Verticilliose	Traitement eau chaude semences, désinfection équipement, attention conditions humides, cuivre
	Maladies bactérienne	cuivre
	Septoriose	Qualité semences, aération, cuivre
	Pourriture blanche	Billons, aération
Liliacées	Alternarise	Gestion résidus, conditions récolte, variétés
	Mildiou	Gestion résidus, aération, cuivre
laitue	Jaunisse	Contrôle cicadelle, fauche des m.h., enfouissement résidus
	mildiou	Aération, drainage, labour
	Rhizoctone	Engrais vert graminées, labour, billons
	Pourriture grise	Attention blessures, aération, billons
Ombellifères	Pourriture molle	Drainage, soin à la récolte, entreposage
	Alternariose	Qualité de la semence, variétés résistantes

(Duval, 2006)

Cette technique détruit un grand nombre de pathogènes au delà de 30-35°C pendant une longue période : certains champignons du sol sur salade (*Olpidium*, vecteur des virus du Big Vein et de la maladie des taches orangées, *Sclérotonia*, *Rhizoctonia*, *Pythium*), sur melon (*Sclérotonia*, *Rhizoctonia*), sur courgette (*Fusarium solani*) (Mazollier; 2009) et contre le *Botrytis* en serre (Vincent et *al.*, 2000)

L'inondation de sol peut être utilisée comme méthode de lutte contre certains ennemis de culture. Dans un sol inondé, beaucoup de ravageurs et de maladies ne peuvent pas survivre. En effet la quantité de germes de pathogène dans le sol diminue après la période d'inondation. (Scheffers et Wainwright, 2001 ; Andanson, 2010)

3. Approche biotechnologique :

La recherche agronomique a participé à l'accroissement dans ce domaine, en mettant au point des méthodes d'identification et de détection des bioagresseurs en sélectionnant des variétés et des géniteurs plus résistants ou plus tolérants (Lucas et Gril, 2008). L'inconvénient de cette méthode est la possibilité de l'apparition de lignées de plantes résistantes. L'utilisation de variétés résistantes est souvent limitée par leurs autres caractéristiques telles que le rendement ou la qualité, qui ne correspondent pas aux attentes de la production, du commerce ou des consommateurs. (Michel et *al.*, 2007)

4. Approche biologique :

L'EPA (*Environmental Protection Agency*) en 2004, distingue les biopesticides des autres pesticides à partir de critères précis et les classe en trois catégories :

- Les biopesticides microbiens, dont l'élément actif est un microorganisme ;
- Les composés protecteurs des plantes dont le génome a été modifié ;
- Les pesticides biochimiques qui sont des substances naturelles et qui contrôlent les bio-agresseurs par des mécanismes non toxiques comme les phéromones et les composés allilochimique d'origine végétal

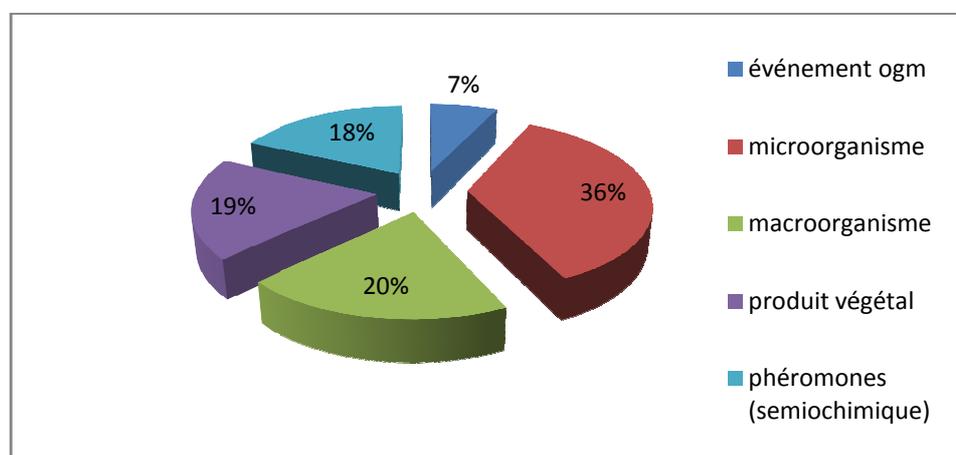


Fig. 13 : importance des catégories des biopesticides (Renault-Roger et *al.*, 2005)

Pour lutter contre les maladies d'origines telluriques, deux stratégies différentes découlent de ces recherches d'écologie microbienne démontrant l'implication de nombreux micro-organismes dans le phénomène de résistance de sol, la 1^{er} consiste à favoriser les populations autochtone bénéfiques qui existent dans les sols sensibles, la seconde consiste à développer des préparations commerciales à partir de micro-organismes antagoniste (Alabouvette et *al.*, 2005).

4.1. Endomycorhizes :

Ces champignons sont une excellente alternative aux produits chimiques. (Dechamplain et Gosselin, 2002). Les champignons du sol du genre *Trichoderma* sont des auxiliaires potentiels des « antagonistes » contre de nombreux champignons phytoparasites : *Trichoderma virens* est par exemple agréé pour lutter contre *Rhizotocnia solani* et *Pythium ultimum* en cultures maraîchères, peut contrôler le *Botrytis cinerea* sur les grappes de raisin, les fraises, les pommes et la tomate, le *Gliocladium roseum*. En conditions contrôlées, les tomates colonisées par *Glomus mosseae* ont un bon niveau de protection vis-à-vis de *Phytophthora parasitica* (Vincent et *al.*, 2000)

4.2. Rhizobactéries :

Les rhizobactéries, par leurs effets bénéfiques résultent des actions de phytostimulation et de biocontrôle de divers agents phytopathogène. Les actions directes résultent des activités rhizobactériennes par solubilisation de divers éléments minéraux, régulateurs de croissance (Benchabane et *al.*, 2012), La reconnaissance par la plante de certaines bactéries de la rhizosphère peut conduire à une réaction d'immunisation lui permettant de mieux se défendre vis-à-vis d'une attaque ultérieure par un organisme pathogène ; l'induction de la résistance systémique (ISR) (Jourdan et *al.*, 2008). Les actions indirectes se résument dans la gestion des équilibres microbiens rhizosphériques eu profit des plantes (Benchabane et *al.*, 2012), Par des mécanismes antibiose par lequel une antagoniste inhibe le développement d'une souche cible grâce à la production de métabolites secondaires toxiques, ou par compétition pour les éléments nutritifs indispensables au développement des micro-organismes (Alabouvette et *al.*, 2005 ; Benchabane et *al.*, 2011)

4.3. Eliciteurs :

L'utilisation des éliciteurs dans la protection des cultures est une démarche très récente. Elle est basée sur les progrès accomplis dans la connaissance des mécanismes d'action de la résistance induite des plantes aux bio-agresseurs (Regnault-Roger et *al.*, 2005).

Tableau 3 : Quelque micro-organisme enthomopathogènes contre les agents phytopathogènes.

Micro-organismes	Cible	reference
Champignon antagoniste contre champignon phytopathogènes		
-Trichoderma harzianum et T. polysporum	– <i>Botrytis cinerea</i> , <i>Rhizoctonia solani</i> , <i>Stereum purpureum</i> (maladie de plomb de pécher)	Lefort et <i>all...</i> 2010 Corbaz 1990
-T. viride	- <i>Sclerotium rolfsii</i>	
-Coniothyrium minitans	– <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> et <i>S. minor</i> ,	
-Ampelomyces quisqualis	l'oïdium sur vigne, <i>Cucurbitaceae</i> et <i>Rosaceae</i>	
-Fusarium roseum	- <i>Claviceps purpurea</i> (l'ergot de seigle)	
Bactérie automopathogène contre champignon phytopathogènes		
Beauveria bassiana : un champignon endosymbiotique combine activités entomophage et mycoparasite de champignons et oomycètes	Actif contre les champignons et oomycètes suivants : - <i>Gaeumannomyces graminis</i> var. <i>tritici</i> - <i>Fusarium oxysporum</i> - <i>Septoria nodorum</i> - <i>Rhizoctonia solani</i> - <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>cepa</i> - <i>Botrytis cinerea</i> - <i>Pythium ultimum</i> - <i>Pythium myriotylum</i>	Lefort et <i>all...</i> 2010
-Pseudomonas fluorescens et Ps putida -Erwinia herbicola	- <i>Pythium ultimum</i> (fonte de soumis de coton), <i>Rhizoctonia solani</i> , <i>Fusarium</i> . - <i>Pythium ultimum</i> (fonte de soumis de coton) - <i>Pythium ultimum</i> (fonte de soumis de coton), <i>Uromyces phaseoli</i> (<i>Rouille de haricot</i>)	
-Bacillus subtilis et Enterobacter cloacae		
Virus contre champignon phytopathogènes		
virus	- Gaeumannomyce graminis (pietin échaudage sur blé) - <i>Endothia parasitica</i> (dépérissement du chataignier) - <i>Helminthosporium victoriae</i>	Corbaz 1990

La présence d'un éliciteur déclenche chez la plante toute une série de réactions cellulaires avec notamment la production de molécules destinées à renforcer la résistance des parois, mais aussi d'antibiotiques végétaux tels que des phytoalexines ou des protéines de défense. Ces molécules ont des propriétés antifongiques et antibactériennes, La plante, ainsi « vaccinée », se tient prête à riposter en cas d'attaque. (Mallet, 2008 ; Jourdan et *al.*, 2008)

Grace à une connaissance suffisante des mécanismes de défense, il a été possible d'identifier les éliciteurs ou les messages chimiques induisant la résistance des plantes, on appelle ces composés qui présentent un grand intérêt en protection des cultures, des stimulateurs des défenses naturelles des plantes (SDN) (Blanchard

et Limache, 2005). En effet, selon INRA (2010) les cellules végétales reconnaissent des molécules appelées communément *éliciteurs* ou effecteurs présentes à la surface des pathogènes ou excrétées par ces derniers.

Dans la nature il existe de nombreux éliciteurs produits par des micro-organismes (éliciteurs exogènes) ou par la plante elle-même lorsqu'elle est agressée (éliciteurs endogènes) (Mallet, 2008), ils peuvent être d'une part des éliciteurs naturels produits par les microorganismes phytopathogènes comme les virus ou par Les éliciteurs de phytopathogènes (virus ou les champignons), de nature chimique variée (oligomères de chitine, de pectine, des glucanes, des (glyco) protéines et des lipides), (Ben hassena, 2009)

5. Approche chimique :

Plusieurs stratégies chimiques permettent de lutter contre l'invasion d'une plante par un champignon, de façon directe ou indirecte. En effet, certains fongicides agissent sur le système énergétique de cellules fongiques en inhibant le processus respiratoires, d'autre agissent sur la synthèse des constituant du champignon. Des substances ont encore pour but de désorganiser les cellules et leurs divisions aux sains des tissus fongiques (Rocher, 2004)

III. Les biopesticides :

Un biopesticides se définit comme tout produit de protection des plantes à base d'organismes vivants ou substances, d'origine naturelle c'est-à-dire issus de la co-évolution des espèces et donc qui ne sont pas issus de la chimie, dont l'utilisation pour le contrôle d'organismes fléaux ou bio-agresseurs, est préconisée pour un meilleur respect des biocénoses et de l'environnement. En effet, les biopesticides présentent plusieurs avantages écologiques : biodégradabilité, sélectivité de leur activité et diminution des effets non intentionnels sur les espèces non cibles, diminution des résistances pour certains d'entre eux. (Anonyme, 2005)

1. Biopesticides d'origine végétal :

La plante est le siège d'une intense activité métabolique aboutissant à la synthèse de principes actifs les plus divers. Ce processus métabolique est lié aux conditions mêmes de vie de la plante : la plante doit faire face à de multiples agressions de l'environnement dans lequel elle vit : prédateurs, microorganismes pathogènes, etc. On conçoit donc que la plante puisse développer un métabolisme particulier lui permettant de synthétiser les substances les plus diverses pour se défendre : les métabolites secondaires (Cuendet, 1999 ; Kansole, 2009).

1.1. Définition et fonctions des métabolites secondaires :

Les métabolites secondaires ne sont pas vitaux pour l'organisme mais jouent nécessairement un rôle important de part la machinerie enzymatique complexe nécessaire à leur production. Ils ont des rôles écologiques (allomone, phéromone...). Ces molécules furent sélectionnées au cours de l'évolution pour l'interaction qu'elles ont avec un récepteur d'un autre organisme. Elles représentent donc une grande source potentielle d'agents thérapeutiques (Thomas, 2009).

1.2. Classification des métabolites secondaires :

Les métabolites secondaires sont produits en très faible quantité, il existe plus de 200 000 métabolites secondaires classés selon leur appartenance chimique en l'occurrence, les terpènes, les alcaloïdes, les composés acétyléniques, les cires, et les composés phénoliques (Cuendet, 1999 ; Vermerris, 2006). On distingue trois classes principales :

- **Les composés phénoliques**

Les composés phénoliques sont des molécules hydrosolubles présentes dans tous les végétaux. Ils ont divers effets sur la physiologie végétale de part leurs actions antibactériennes et antifongiques (Adrian et Frangne, 1991 ; Milane, 2004). Ils constituent un des groupes le plus nombreux et largement distribué des substances dans le royaume des végétaux avec plus de 8000 structures phénoliques présents dans tous les organes de la plante (Lugasi et *al.*, 2003). Les polyphénols sont des métabolites secondaires présents chez toutes les plantes vasculaires. (Lebham, 2005). Les composés phénoliques (acides phénoliques, flavonoïdes simples et proanthocyanidines) forment le groupe des composés phytochimiques le plus important des plantes. (Beta et *al.*, 2005). Ces substances sont dotées de certaines activités résumées dans le tableau 4.

- **Les alcaloïdes**

Les alcaloïdes sont un groupe de composés azotés et faiblement basiques issus principalement des végétaux. Ils présentent des réactions communes de précipitation. Après extraction, ils sont détectés par des réactions générales de précipitation fondées sur leur capacité de se combiner avec des métaux (Kansole, 2009).

Tableau 4 : Activités biologiques des composés polyphénoliques.

POLYPHENOLS	ACTIVITES
Acides Phénols (cinnamiques et benzoïques)	Antibactériennes Antifongiques Antioxydantes
Coumarines	Protectrices vasculaires et antioedémateuses
Flavonoïdes	Antitumorales Anticarcinogènes Anti-inflammatoires Hypotenseurs et diurétiques Antioxydantes
Anthocyanes	Protectrices capillaro-veineux
Proanthocyanidines	Effets stabilisants sur le collagène Antioxydantes Antitumorales Antifongiques Anti-inflammatoires
Tanins galliques et catéchiques	Antioxydantes

(Bahorun, 1997)

- **Les isoprénoïdes (Terpénoïdes)**

Les isoprénoïdes sont des composés issus de la condensation d'unités de base à 5 carbones de type isoprène. On parle également de composés terpéniques ou terpenoïdes, l'unité monoterpène correspondant à des molécules à 10 carbones formées à partir de deux unités isoprènes. De façon analogue à la famille des composés phénoliques, les isoprénoïdes regroupent à la fois des molécules de faibles poids moléculaires, volatiles et composants principaux d'huiles essentielles, et des molécules hautement polymérisées (Bruneton, 1999 ; Harbone, 1998).

1.3. Localisation des métabolites secondaires :

Les métabolites secondaires existent dans toutes les parties des plantes mais ils sont distribués différemment selon leurs rôles défensifs. Cette distribution varie d'une plante à l'autre. (Anglade, et Vivant, 2006)

Tableau 5: localisation des métabolites secondaires au niveau des tissus végétaux.

Type de tissu	Molécules retrouvées	Exemple de plantes
trichomes	monoterpènes	Lamiacées
	sesquiterpènes	solanancées
	Flavonoïdes	
cires	Triterpènes	Asclépiadacées
	Phénols	Rosacées
Epiderme	Alcaloïdes	<i>Genista</i>
Parois cellulaires	Tanins	Beaucoup d'arbres
Cellules mortes	Tanins	Plantes ligneuses
Vacuoles	Glycosides cyanogénique	Beaucoup de plantes
	Alcaloïdes	
Glandes à l'huile	Furanocoumarines	<i>Citrus</i>
	sesquiterpènes	<i>Gossypium</i>
Latex	Di- et triterpènes	Euphorbiacées
	Alcaloïdes	
	sesquiterpènes	Astérsacées
Canaux résinifères	Diterpènes	Gymnospermes
Semence	Aminoacides non protéiques	Légumes
Paroi des semences	Furanocoumarines	<i>Pastinaca</i>
Ecorce	Quinine	<i>Cinchona</i>

(Anglade et Vvivant, 2006)

2. Les biopesticides d'origine végétal à base lipidique (les huiles essentielles) :

Dans les domaines phytosanitaires et agro-alimentaires, les huiles essentielles ou leurs composés actifs pourraient également être employés comme agents de protection contre les champignons phytopathogènes et les microorganismes envahissant les denrées alimentaires. Les huiles essentielles les plus étudiées dans la littérature pour leurs propriétés antibactériennes et antifongiques appartiennent à la famille des Lamiacées : thym, origan, lavande, menthe, romarin, sauge, etc...L'HE de thym d'Espagne (*Thymus capitatus*) est souvent rapporté comme étant parmi les huiles les plus actives (El kalamouni, 2010)

2.1. Définition d'une huile essentielle :

La norme AFNOR NF T 75-006 définit l'huile essentielle comme: « un produit obtenu à partir d'une matière première végétale, soit par entraînement à la vapeur d'eau, soit par hydro-distillation (Brunton, 1999). La majorité des huiles essentielles sont des liquides très peu colorés, volatils à température ambiante, ils dégagent une

odeur caractéristique et sont, en général plus légères que l'eau tout en possédant des caractéristiques hydrophobes. (El kalamouni, 2010).

2.2. Mode d'action des huiles essentielle :

Les huiles essentielles agissent en empêchant la multiplication des bactéries, leur sporulation et la synthèse de leurs toxines. Pour les levures, elles agissent sur la biomasse et la production des pseudomycéliums alors qu'elles inhibent la germination des spores, l'élongation du mycélium, la sporulation et la production de toxines chez les moisissures (El kalamouni, 2010). Comme elles vont servir de signaux chimiques permettant à la plante de contrôler ou réguler son environnement (rôle écologique): attraction des insectes pollinisateurs, action répulsive sur les prédateurs, inhibition de la germination des graines, voire communication entre les végétaux (émission de signaux chimiques signalant la présence d'animaux herbivores par exemple). (Heinrich et *al.*, 1983).

2.3. Localisation des HE dans les tissus :

Les huiles essentielles s'accumulent dans tous les types d'organes végétaux, les fleurs, les feuilles et moins communément dans les branches, les bois, les racines, les rhizomes, les fruits et les graines. Même si tous ces organes sont susceptibles de contenir des huiles essentielles, la composition chimique de ces dernières peut être variable en fonction de la localisation. (Brunton, 1999). Ils peuvent s'accumuler dans des cellules isolées qui se distinguent des cellules banales par leur teinte plus jaune et leurs parois épaisses, légèrement subérifiées. C'est le cas chez les Lauracées. Elles peuvent former de fines gouttelettes parsemant le protoplasme de cellules épidermiques (épiderme supérieur des pétales de Rose). (Binet et Brunel, 1968)

2.4. Propriété des HE :

2.4.1. Propriétés chimiques :

Les huiles essentielles sont complexes et possèdent une haute variabilité en matière de composition chimique. Elles comprennent en particulier des terpènes (hydrate de carbone non aromatiques) et des composés oxygénés (alcools, aldéhydes, cétones). De manière générale, Les constituent des huiles essentielles appartiennent à deux groupes caractérisés par des origines biosynthétiques différentes : le groupe des terpénoïdes et celui des composés aromatiques qui dérivent du phénylpropane. (Binet et Brunel, 1968 ; Brunton, 1999)

- **Les terpénoïdes** : les HE contiennent uniquement les terpènes volatils les plus importants, ceux dont le poids moléculaire n'est pas très élevé : les mono et les sesquiterpènes.

- **Les composés aromatiques** : ce sont des phenylpropanoïdes (C6- C3) qui sont moins communs que les terpénoïdes. Les lactones qui dérivent de l'acide cinnamique peuvent être entraînés par la vapeur d'eau et être retrouvé dans les HE.

- **Les composés d'origines mucilagineuses** : ces composés proviennent de la conversion des constituants non volatils. On les trouve dans les HE lorsqu'ils sont extraits par entraînement à la vapeur d'eau.

2.4.2. Propriété physique :

Les HE sont généralement liquides à la température ordinaire, d'odeur aromatique, rarement colorées quand elles sont fraîches. Leur densité est le plus souvent inférieure à celle de l'eau. Elles ont un indice de réfraction élevé et, le plus souvent, sont douées de pouvoir rotatoire. Elles sont volatiles et entraînaibles par la vapeur d'eau. Très peu solubles dans l'eau, elles lui communiquent leur odeur. Elles sont solubles dans l'alcool, l'éther, la plupart des solvants organiques, les huiles fixes. (Anonyme 3, 2012)

2.4.3. Propriétés antimicrobiennes :

Les effets antimicrobiens de différentes espèces de végétaux. Ces propriétés antimicrobiennes sont dues à la fraction d'huile essentielle contenue dans les plantes. (Hulin et *al.*, 1989)

- **Antibactérienne**

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

- **Antivirale**

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

- **Antifongique**

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

sesquiterpéniques. Par ailleurs, les mycoses ne se développent pas sur un terrain acide. Ainsi il faut chercher à alcaliniser le terrain.

- **Antiparasitaire**

Le groupe des phénols possède une action puissante contre les parasites.

- **Antiseptique**

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

2.5. Les huiles essentielles chémotypées (HECT) :

L'AFSSAPS a donné une définition du chémotype dans sa recommandation de mai 2008. Pour une même espèce botanique, il peut exister plusieurs races chimiques ou chimiotypes (ou chémotype) aboutissant à l'accumulation de métabolites secondaires différents au sein d'une même famille botanique. Le chémotype est utilisé en biologie, surtout dans ses applications médicales (aromathérapie) et agricoles, mais également en parfumerie. (Mulon, 2011). Au sein d'une même espèce botanique il peut se produire des variations chimiques en fonction des conditions de vie spécifiques à la plante (pays, climat, exposition), en fonction de la période de récolte, en fonction de facteurs phytosociologiques, Le chémotype désigne donc la molécule majoritairement présente dans une huile essentielle. (Videlier, 2011)

Cette notion fondamentale de chémotype est parfaitement illustrée par l'exemple du THYM de l'espèce botanique *Thymus vulgaris L.* à l'ancienne dénomination d'essence de thym rouge et d'essence de thym jaune ou d'essence de thym fort et d'essence de thym doux, se substitue la notion de chémotype à Linalol , à Thuyanol, à Carvacrol , à Acétate de Terpényle , à Géraniol, à Thymol , à Paracymène. (Bonnet-Alves, 2002)

On distingue sept races chimiques ou chimiotypes de thym vulgaire : à thymol, carvacrol, linalol, thuyanol, alpha terpinéol, géraniol, et paracymène.

- **Chémotype Thymol** : c'est la variété la plus répandue car elle pousse dans la majorité des climats et possède l'odeur typique du thym que l'on utilise pour aromatiser les plats.

- **Chémotype Carvacrol** : plus spécifique des zones très chaudes et arides et dont l'odeur forte est semblable à la précédente, le thymol et le carvacrol étant des molécules chimiquement voisines.

- **Les chimiotypes Linalol et Géraniol** : sont plus fréquents en moyenne montagne et dans les zones fraîches de la garrigue. (Anonyme 2, 2012)

2.6. Méthodes d'extraction des huiles essentielles :

Depuis les temps les plus reculés, les hommes se sont ingénies à trouver des techniques d'extraction des essences des plantes afin de pouvoir les utiliser pour en faire des médicaments, des cosmétiques, des parfums (Padrini et Lucheroni, 1996)

Le choix de type d'extraction doit permettre de :

- Retirer des végétaux des essences aromatiques avec le rendement le plus élevé.
- Conserver aussi intact que possible les parfums les plus délicats (Khelfane et Yousfi, 1987).

Ainsi, la méthode d'obtention des huiles essentielles intervient de façon déterminante dans le rendement en huile et dans sa composition (Benjilali, 2004).

Parmi les différents procédés d'extraction, nous citerons principalement :

- La technique de la pression.
- Extraction par solvants
- La distillation.
- D'autres procédés sont possibles tels que : l'hydrodiffusion, l'extraction assistée par micro-ondes, l'extraction à l'eau surchauffée et la distillation par extraction simultanée(SDE) (Benkhechi et Abdelouahid, 2010).

Chapitre II

Matériels et méthodes

II. Matériels et Méthodes :

Notre travail consiste à évaluer l'activité antifongique des huiles essentielles complètes et des chémotypées formules ; Eucalyptus, Thym, Thymol et la synergie du Thymol et Carvacrol contre trois souche fongiques phytopathogène ; *Fusarium sp*, *Alternaria sp* et *Botrytis sp*

1. Matériel d'étude :

• Matériel végétal :

Deux plantes on été arrêtées pour les investigations, *Eucalyptus sp* appartenant a la famille des myrtacées, caractérisée par une huile aromatique d'une odeur balsamique, camphrée, forte et très agréable qui peut être extraite de petites poches sécrétrices répartie sur toutes les parties vertes de la plante. La deuxième et *Thymus sp* appartenant à la famille des lamiacée. (Ali-delille, 2010).

• Matériel microorganique :

Concernant les souches phytopathogènes. Les champignons appartiennent essentiellement aux genres : *Fusarium*, *Alternaria* et *Botrytis* nous ont été fournis par le laboratoire de mycologie du département d'Agronomie (Université de Blida), ils ont était choisis pour leur fréquence élevées à contaminer les cultures maraichères de grande consommation (pomme de terre, tomate...etc.), la culture céréalière (blée tendre, blé dure...etc.), les cultures fruitière (vigne, fraisier...etc.) .

1.1. Extraction et formulation des huiles essentielles :

Les huiles essentielles d'*Eucalyptus* et de Thym sont extraites par la méthode d'entraînement à la vapeur, qui consiste à découper, peser, puis macérer le végétale. Dans un ballon contenant 1,5l litre d'eau mise en chauffage, on place 400g de matière végétale fraîche sur une grille. La vapeur d'eau traverse le matériel végétal en entraînant les produits volatils vers la colonne de condensation. La vapeur condensée est le mélange d'eau et de l'huile essentielle. Celle-ci est recueillie dans une burette contenant de l'eau. L'huile est séparée de l'eau par décantation. La phase organique est récupérée et conservée dans des tubes opaques en verres à une température de 0°C à 6°C.

Les biopesticides utilisés dans cette étude sont deux huiles essentielles complètes d'*Eucalyptus sp* et de *Thymus sp* et deux huiles essentielles chémotypées à Thymol et Thymol/Carvacrol. A partir des huiles essentielles obtenues, nous avons procédé à leur formulation selon le protocole établi par Mr MOUSSAOUI K du laboratoire de phytopharmacie

Matière active (HE) + Tensioactif + Protecteur → Produit formulé



Photo 01 : huiles essentielles
(original ; 2013)

A partir des huiles essentielles formulées (Thym 10%, Eucalyptus 10%, Thymol 14% et Thymol+Carvacrol 7%), nous avons préparé une gamme de concentration pour les tests antifongiques. Pour cela nous avons choisie trois doses pour chaque molécule selon le tableau si dessous :

Tableau 06 : Différentes dilutions utilisées dans le traitement

Bioproduits	Dose 1	Dose 2	Dose 3
Eucalyptus 10%	5%	2%	1%
Thym 10%	5%	2%	1%
Thymol 14%	7%	2%	1%
Thymol+carvacrol7%	4%	2%	1%

2. Méthodes d'étude :

2.1. Etude *in vitro* du pouvoir antifongique :

Les champignons appartient essentiellement aux genres : *Fusarium*, *Alternaria* et *botrytis*, les souches fongique ont étaient entretenues sur le milieu nutritif OGA (Oxytetracycline glucose agar) à pH= 6.8-7, le milieu est procuré de laboratoire pasteur, les flacons de milieu ont étai fondu au bain marré et refroidis à 45°C afin de les coulé à proximité du bac benzène

La mise en culture des champignons a été effectuée à partir de cultures préalablement purifiées afin d'assurer la pureté des souches fongiques à inoculer. L'incubation se fait à 25° à l'obscurité. La période de croissance pour les trois souches est de 7 jours. (Lmegharbi et Mahdi, 2011)

2.2. Sensibilité et zones d'inhibitions :

Le principe consiste à estimer l'inhibition des microorganismes développés sur des milieux de culture bien définie et soumis au contact à des disques imbibés d'huiles essentielles, par la méthode de diffusion sur gélose selon la méthode Vincent modifié (Rhayour, 2002).

Sur milieu OGA, coulés sous forme d'une couche plus ou moins épaisse en boîte Pétri de 9 cm de diamètre, on inocule des deux extrémités de la boîte deux disques de mycélien par coté, découpé a l'aide d'un emporte pièce de 8 mm de diamètre à partir d'une culture âgée de 7 jours pour les trois souches.



Photo 02 : disque de pépiée Wattmen imbibés (original ; 2013)

Le dépôt de disque de papier Wattman de 8 mm de diamètre imbibé d'huile essentielle formulé (eucalyptus 10%, thym 10%, thymol 14% et thymol7% + carvacrol 7%) est fait deux jours après ensemencement pour éviter l'évaporation des HE formulés avant le développement de mycélium dans chaque boîte Pétrie au centre de chaque boîte Pétrie qui seront incubées à 25°C, le suivie se fera pendant 3 jours. Chaque essai est répété 3 fois.

Le diamètre de la zone d'inhibition est estimé selon Leclerc (1975) et Lmegharbi et Mardi (2011). Une souche est dite :

- Sensible lorsque la zone d'inhibition est supérieur ou égale à 15mm
- Limite lorsque la zone d'inhibition est inférieure ou égale à 15 mm
- Résistante lorsque la zone d'inhibition est inexistante

Le dépôt de disque de papier Wattman de 8 mm de diamètre imbibé d'huile essentielle formulé (Eucalyptus 10%, Thym 10%, Thymol 14% et Thymol 7% + Carvacrol 7%) est fait deux jours après inoculation pour éviter l'évaporation des HE formulés avant le développement de mycélium dans chaque boîte Pétrie au centre de chaque boîte Pétrie qui seront incubées à 25°, le suivie se fera pendant 3 jours. Chaque essai est répété 3 fois.

2.3. Détermination de l'activité antifongique :

Sur le milieu OGA, coulé sous forme s'une couche plus au moins épaisse en boîte de pétrie de 9 cm de diamètre, on dépose au centre de la boîte les disques mycélien (trois disque par boîte) découpé à l'aide d'un emporte pièce de 8 mm de diamètre à partir d'une culture âgé de 7 jour pour les trois souches.

Les disques du papier Wattman de 8 mm de diamètre, on était stérilisé a l'autoclave (120° pendant 20 min), sont imbibé dans les chaque dilution puis attaché au couvercle de la boîte, à raison de un disque imprégné par couvercle pour chaque souche.

Le teste a été répété 3 fois, le témoin est correspond à un disque de papier Wattman imbibé a l'eau distillée stérile pour chaque souche. Les boîtes pétrie inocules et traites ont était fermées avec du parafilm pour éviter la perte des composés volatiles, puis incubes à l'obscurité dans l'étuve à 25° pendant 7 jours pour les trois souches étudiées.

La croissance radiale est exprimée en pourcentage d'inhibition de la croissance mycélien ne en utilisent la formule décrite par Pandey et *al.* (1982)

$$= \frac{\text{PI}}{\text{DC} - \text{Dt}} \times 100$$

PI : pourcentage d'inhibition de la croissance des champignons testés (%)

DC : diamètre moyen de la croissance mycélienne du champignon non traité (eau distillée stérile) (cm)

Dt : diamètre moyen de la croissance mycélienne du champignon traité (différentes doses)

3. Analyses statistiques des données :

Pour plus de précision dans les mesures des distances, des diamètres de la zone d'inhibition et la croissance ont été mesuré par le logiciel Image Tool (alpha 3).

La zone d'inhibition a été indiquée par la mesure des diamètres d'inhibition des colonies fongiques. Les prélèvements des mesures ont été fais 24h après le traitement et nous a permis d'obtenir un diagramme des zones d'inhibition pour chaque matière active.

L'activité antifongique a été indiquée par la moyenne de croissance qui nous a permis de calculer le pourcentage antifongique à partir de la moyenne du 7^{ème} jour, afin de déterminer le pouvoir antifongique, si la croissance des colonies diminue par rapport au témoin, cela veut dire que la matière active a un pouvoir antifongique. Pour vérifier l'efficacité des matières actives étudiées vis-à-vis des souches fongiques et la comparaison entre les trois matières actives tout en considérant les doses et les pathogènes, nous avons utilisé le logiciel SYSTAT, ver. 12, SPSS 2009, en déterminant la variance à l'aide de GLM (General Linear Model), les différences ont été considérées significatives à $P < 0.05$.

Les corrélations existantes entre les différents extraits et leurs dilutions ainsi que les souches fongiques sont mises en évidence par une analyse en composantes principales (ACP). Dans ce type de test, les différents extraits et leurs dilutions ont des coordonnées comprises entre -1 et +1, l'hypothèse de l'efficacité antifongique des extraits est testée par le modèle de la distance euclidienne à un facteur contrôlé par le logiciel PAST (Paleoantological Statistics, ver. 1.81).

Chapitre III

Résultats

III. Résultats :

1. Evaluation de la de la zone d'inhibition sous l'effet du bioproduits a base d'huiles essentielles :

1.1. Evaluation des zones d'inhibition sous l'effet des bioproduits à base H.E. :

Nous avons constaté d'après les diagrammes que la zone d'inhibition des trois champignons phytopathogènes varie selon la nature des huiles essentielles (figure 18).

Les diamètres des zones d'inhibition dépassent largement les 15 mm. Ces valeurs estiment que les différents pathogènes présentent une sensibilité accrue envers les huiles essentielles chémotypées (Thymol 14%, Thymol7%+ Carvacrol 7%). Les diagrammes indiquent que le *Fusarium sp* et l'*Alternaria sp* présentent une faible sensibilité au Thymol 7%+ Carvacrol 7% par rapport au *Botrytis sp*. Concernant les effets d'huile essentielle au thymol, les sénilités des souches s'inversent.

La variabilité des diamètres des pathogènes exposés à l'huile essentielle du Thym 10%, signifie une faible sensibilité du *Fusarium sp* et *Alternaria sp*. Tandis que le *Botrytis sp* est sensible où il enregistre un diamètre d'inhibition qui dépasse les 15 mm. L'exposition des pathogène à l'eucalyptus 10% nous a démontré une sensibilité faible d'*Alternaria sp* par rapports au *Botrytis sp*. Le *Fusarium sp* présente une sensibilité avoisinante

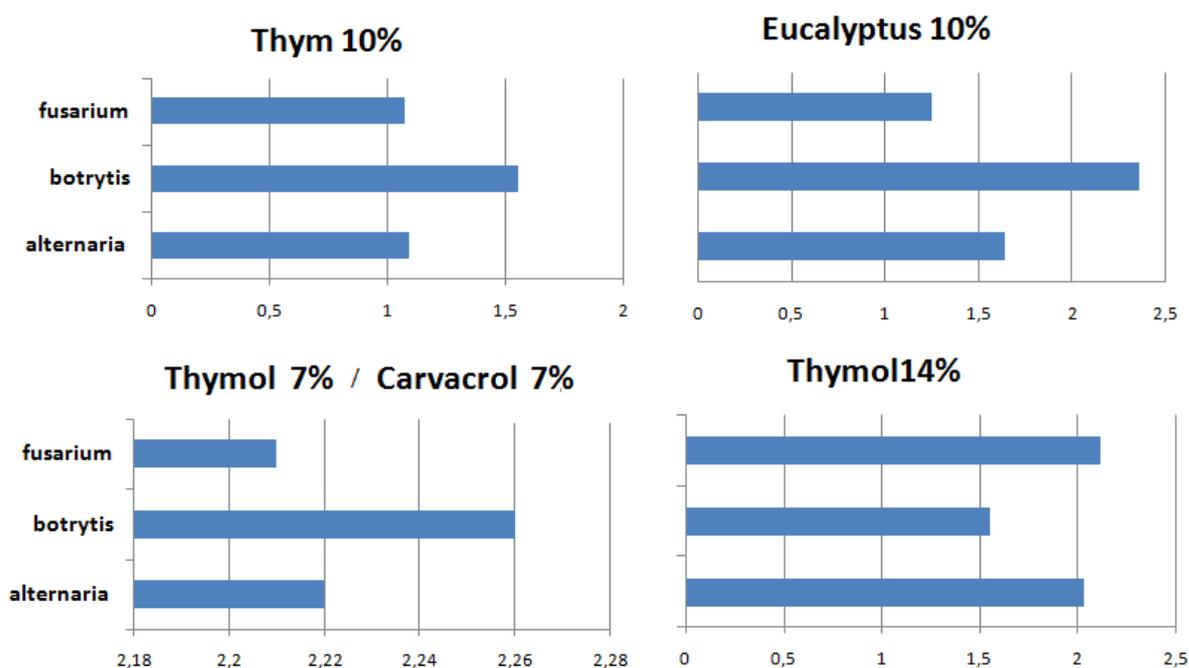


Fig. 18 : diagramme des zones d'inhibition

1.2. Tendance d'évolution des zones d'inhibition sous l'effet des bioproduits a base d'HE :

La projection des variables relatifs à la zone d'inhibition à travers l'axe1, montre que l'effet d'Eucalyptus 10%, du Thym 10% et du Thymol 14% réagissent d'une façon similaire sur l'*Alternaria sp* (figure a), tandis que le Thymol 7%+ Carvacrol 7% réagis différemment (Figure 19-a)

Il est à signaler que l'effet des huiles essentielles ne s'exteriorise pas durant les deux premiers jours d'exposition. Cet effet tardif est confirmé par l'existence d'une corrélation positive entre les quatre matières actives (figure 19-a, b et c). Les valeurs du coefficient de Pearson confirment cette tendance.

La projection des variables relatifs à la zone d'inhibition sur l'axe 2 (84.17%) démontre que l'huile essentielle d'Eucalyptus 10% et du Thymol 14% agissent différemment que la l'huile essentielle du Thym 10% et du Thymol 7%+ Carvacrol 7% sur l'*Alternaria* (Figure 19-a).

La corrélation négative enregistrée confirme cette discrimination d'effet temporel. La projection estime que l'effet inhibiteur s'installe dès le premier jour chez l'Eucalyptus 10% et le Thymol 14% alors que le même effet dure jusqu'au deuxième jour pour le Thym 10% et Thymol 7%+ Carvacrol 7% (Figure 19-a).

La projection sur l'axe 2 (9.81%) démontre que l'huile essentielle d'Eucalyptus 10% et du Thym 10% et du Thymol 7%+ Carvacrol 7% agissent différemment que l'huile essentielle du Thymol 10% sur *Botrytis sp* (Figure 19-b).

La corrélation négative enregistrée confirme cette discrimination d'effet temporel. La projection estime que l'effet inhibiteur s'installe dès le premier jour chez l'Eucalyptus 10% et le Thym 10% et Thymol 7%+ Carvacrol 7% alors que le même effet dure jusqu'au deuxième jour pour le Thymol 14% et (Figure 19- b).

La projection des résultats d'inhibition sur l'axe 2 (9.81%) démontre que l'huile essentielle d'Eucalyptus 10% et du Thymol 7% agissent différemment que la l'huile essentielle du Thymol 10% et du Thymol 7%+ Carvacrol 7% sur le *Fusarium sp* (Figure 19-c)

La corrélation négative enregistrée confirme cette discrimination d'effet temporel. La projection estime que l'effet inhibiteur s'installe dès le premier jour chez l'Eucalyptus 10% et le Thymol 14% et alors que le même effet dure jusqu'au deuxième jour pour le Thym 10% et Thymol 7%+ Carvacrol 7% (Figure 19-c).

1.3. Etude comparée de la zone d'inhibition sous l'effet des bioproduits a base d'HE :

Nous avons utilisé le modèle générale linéaire (G.L.M) pour étudier la variation temporelle de la zone d'inhibition des trois pathogènes sous l'effet des huiles essentielles formulées (Eucalyptus 10%, Thym 10%, Thymol 14% et du Thymol 7%+ Carvacrol 7%).

La variation temporelle de moyenne de la zone d'inhibition des souches pathogènes présente des différences marginalement significatives. La même considération est affichée pour l'activité antifongique des différents bioproduits. En revanche la probabilité associée aux valeurs moyennes de la sensibilité des souches fongiques affiche une différence non significative (Figure 20).

Une lecture globalisant la sensibilité temporel des pathogène et l'effet comparé des huiles essentielles sur les zone d'inhibition, permet de dire que les bioproduits expriment leur effet temporelles d'une manière plus ou moins différentes. L'association des coefficients de corrélation de Pearson aux présentations graphiques de l'analyse de la variance type GLM permet de signaler un effet marquant d'une part, des deux substances Thymol 10% et du Thymol 7%+ Carvacrol 7%, d'autre part le pathogènes *Alternaria sp* qui exprime une forte sensibilité que le *Botrytis sp* et le *Fusarium sp* qui ont une sensibilité avoisinante vis-à-vis des quatre formulations.

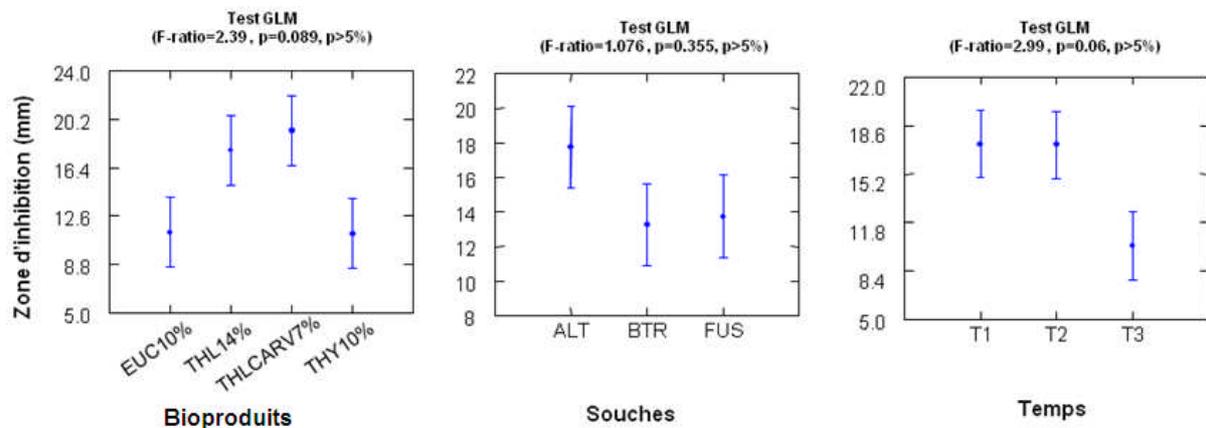


Fig. 20 : Effets comparés de l'activité des huiles essentielles envers les souches fongiques

2. Evaluation de l'activité antifongique des bioproduits à base des huiles essentielles :

3.1. Evaluation temporelle de l'activité antifongique sous l'effet des bioproduits à base HE :

L'activité antifongique des quatre bioproduits des plantes étudiées (*Eucalyptus sp* et *Thym sp*) a été évaluée *in vitro* avec la technique d'activité volatile sur trois souches fongiques.

D'après la figure 22, on constate que les souches fongiques régissent différemment d'une huile à l'autre. Les résultats révèlent une activité antifongique importante des huiles essentielles chémotypées que les huiles essentielles complètes vis-à-vis des souches testées. Les formulations du Thym et de l'Eucalyptus ont présenté une faible activité cela est traduit par une croissance mycélienne modérée, contrairement aux formulations (Thymol et Thymol+Carvacrol) qui ont révélé une réduction importante de la croissance fongique.

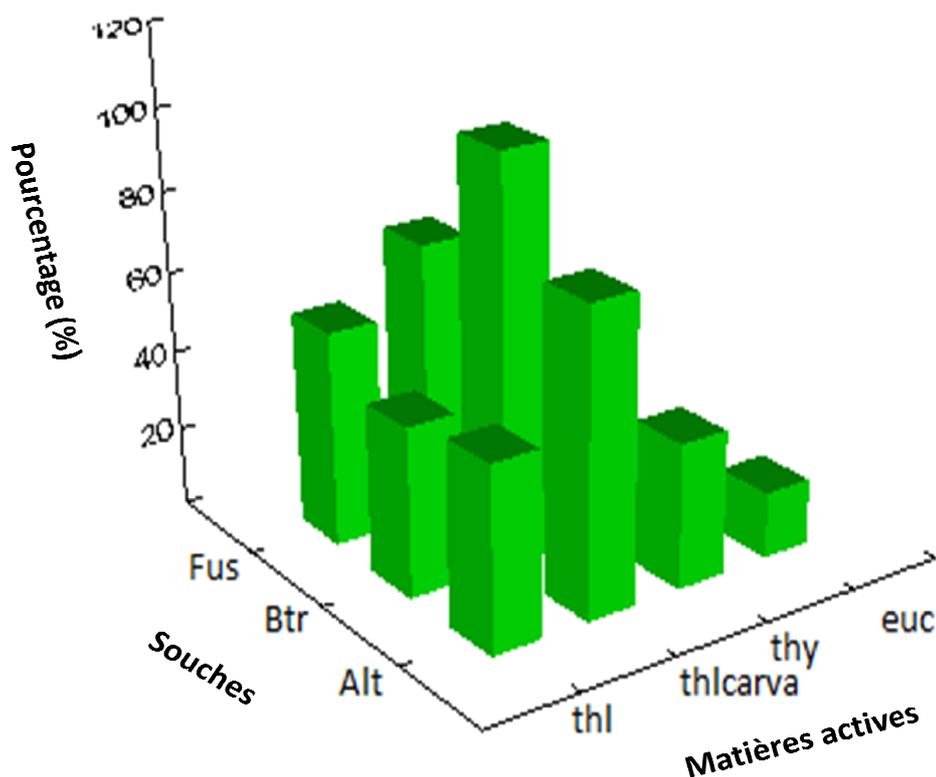


Fig. 21 : Effet antifongique des quatre huiles essentielles formulées sur les trois souches fongiques.

2.2. Tendance de l'activité antifongique sous l'effet des bioproduits a base d'HE :

La projection des variables relatifs au pourcentage de croissance mycélienne à travers l'axe1 de l'ACP, montre que les trois doses du Thymol+ Carvacrol et le Thymol 7% présentent un effet marqué sur le *Fusarium sp*, tandis que les le Thymol 2% et à 1%, l'Eucalyptus 5% et le Thym 2% ont un effet sur la souche du *Botrytis sp*, quand à la croissance mycélienne d'*Alternaria sp*, elle est affectée par le Thym 5% et l'Eucalyptus 1% (figure 23).

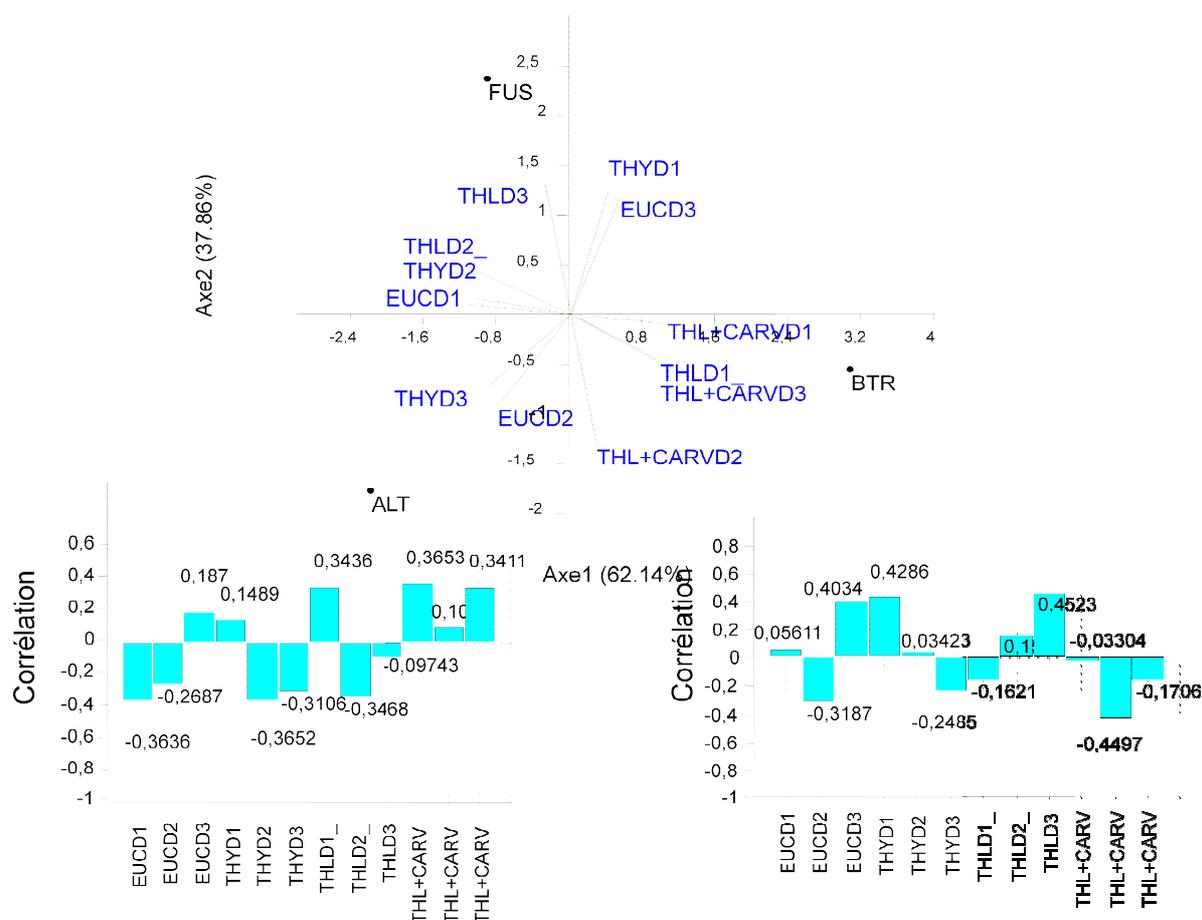


Fig. 22 : Projection sur les deux axes de l'ACP de l'activité antifongique des bioproduits en vers les souches phytopathogènes

La même analyse montre une différenciation de l'effet des huiles essentielles selon les facteurs doses et nature de la formulation. Ceci est confirmé par l'existence d'une corrélation négative entre le Thym 5% et 2%, Thymol 7% et 2%, l'Eucalyptus 5% et 1%, et les trois dose du Thymol+ Carvacrol, Thymol 7%, Thym 1% et l'Eucalyptus 2%.

La projection des valeurs sur l'axe 2 (37,86%) démontre que Thymol 2% et 1%, le Thym 2% et l'Eucalyptus 5% agissent plus efficacement contre le *Botrytis sp*, et que les trois doses de la synergie du Thymol+ Carvacrol et le Thymol 7% ont un effet sur le *Fusarium sp*, alors que l'*Alternaria sp* est plus affectée par l'activité microbienne de thym 5% et de l'Eucalyptus 1%

La corrélation négative enregistrée confirme cette discrimination d'effet selon la souche fongique et la dose. La projection estime que l'effet antifongique varie au dépend des bioproduits et des différentes doses (dilution).

2.3. Etude comparé de l'activité antifongique sous l'effet des bioproduits à base d'HE :

La variation temporelle de l'effet antifongique globale présente des différences hautement significatives avec des valeurs de probabilité associée plus au moins élevé (figure 24). Dans un autre volet, l'analyse exprime des différences non significatives pour l'effet comparé des pathogènes entre elles mêmes tels est le cas des efficacités signalées sur pour la sensibilité des pathogènes vis-à-vis des extraits a différente dose.

Une lecture globalisant l'effet temporel et l'effet comparé des huiles essentielles sur la croissance mycélienne des souches permet de dire que les huiles essentielles expriment leur activité antifongique temporelle d'une manière très différente. Bien que les probabilités ne les confirme pas, mais l'association des coefficients de corrélation de Pearson aux présentations graphiques de l'analyse de la variance type GLM permet de signaler l'effet marquant d'une part, de l'huile essentielle chémotypé formulée du Thymol+ Carvacrol sur la croissance mycélienne, d'autre part il apparaît que les deux formulations à base d'huiles essentielles pures expriment un effet antifongique faible sur la croissance fongique

Parmi les quatre huiles étudiés ceux des huiles essentielles chémotypées Thymol et Thymol+ Carvacrol sont beaucoup plus actifs que les huiles essentielles complètes (Eucalyptus, Thym). L'activité inhibitrice du Thymol+ Carvacrol est puissante, les pourcentages d'inhibition varient entre 75.75 % dans le cas de l'*Alternaria sp*, et de 100% dans le cas de *Botrytis sp* et de 68.78% dans le cas du *Fusarium sp*. Quant a l'extrait de Thymol est plus au moins actives. Avec un pourcentage d'inhibition qui ne dépasse pas le 50% pour le *Botrytis sp* et l'*Alternaria sp*, et qui dépasse le 50% pour le *Fusarium sp*. D'autres parts, les souches fongiques se comportent d'une façon similaire en réponse aux confrontations aux bioproduits, avec un pourcentage de sensibilité qui ne dépasse pas les 50%.

Cependant, les champignons phytopathogènes ont montré une sensibilité accrue à l'augmentation des doses des bioproduits où le diamètre des colonies se réduit à chaque fois qu'on augmente la dose de la matière bioactive. Globalement, les valeurs des probabilités associées montrent la présence de différences significatives pour l'ensemble des paramètres étudiés à l'exception du facteur souches. Par conséquent, la D1 s'avère la plus efficace chez l'Eucalyptus et le Thym.

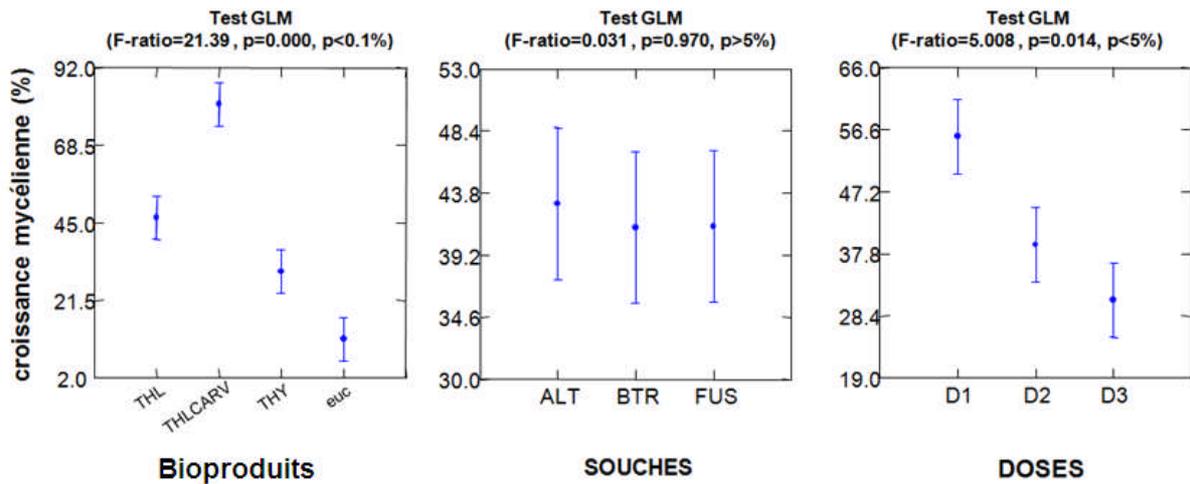


Fig. 23 : effet inhibiteur en interaction avec les extraits, les pathogènes et les concentrations

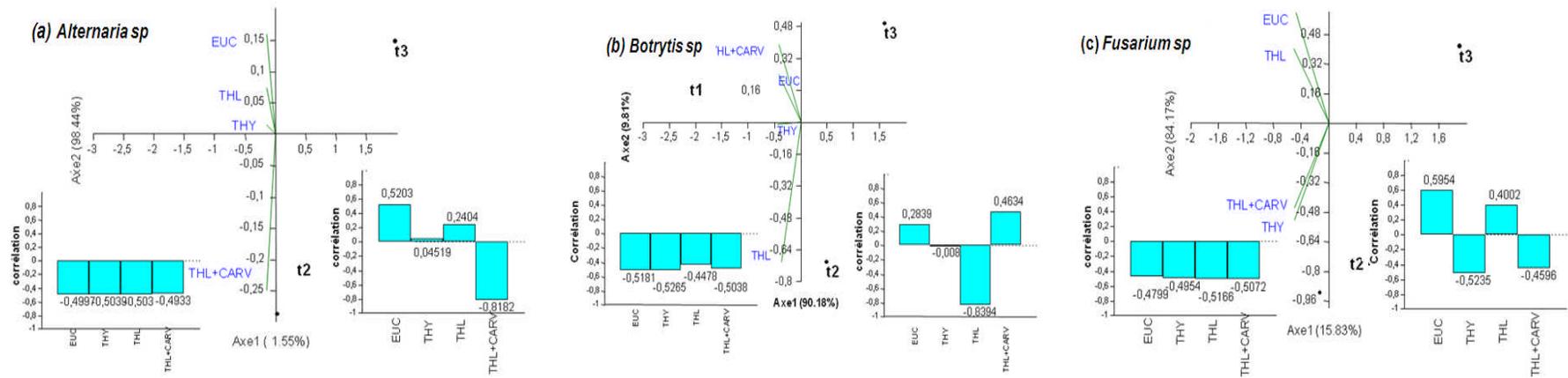


Fig.20 : Projection sur les deux axes de l'ACP de la sensibilité des souches pathogènes en vers les bioproduits

Chapitres IV

Discussion

IV : Discussion :

Les Huiles Essentielles sont des produits de composition complexe, renfermant des produits volatils contenus dans les végétaux. Ils sont un assemblage de molécules complexes qui ont toutes des propriétés particulières (Girard, 2010). Depuis deux décennies, des études ont été menées sur le développement de nouvelles applications et l'exploitation des propriétés naturelles des huiles essentielles dans le domaine agro- alimentaire (Caillet et Lacrois, 2009). Dans cette optique, la présente étude vise à mettre au point de nouvelles formulation à base d'huiles essentielles. Les résultats de l'évaluation de l'efficacité de ces formulations nous ont permis de supposer que les huiles essentielles ont un effet fongicide et que cela dépend de leur formulation, de leur nature et de leurs concentration ainsi de la sensibilité des champignons phytopathogène envers ces biomoécules.

1. Effet des formulations des huiles essentielles sur la sensibilité des souches :

Les souches fongiques pathogènes testées expriment leurs sensibilités temporelles d'une manière plus ou moins différentes. *Alternaria sp* présente une forte sensibilité que le *Fusarium sp* et *Botrytis sp*. Ces deux derniers, expriment une sensibilité avoisinante vis-à-vis des quatre matières actives. *Fusarium sp* et *Botrytis sp* révèlent une sensibilité similaire que celui d'*Alternaria sp* en vers les trois huiles essentielles formulés de l'Eucalyptus 10%, le Thymol 14% et le Thymol 7% plus Carvacrol 7%, tandis qu'en présence du Thym 10%, le *Botrytis sp* et l'*Alternaria sp*. ont la même sensibilité par rapport au *Fusarium sp*. Cette sensibilité ne s'extériorise durant les deux premiers jours d'exposition. Les deux substances Thymol 10% et du Thymol 7%+ Carvacrol 7% ont un effet marquant. l'huile essentielle d'Eucalyptus 10% et du Thymol 14% agissent différemment que l'huile essentielle du Thym 10% et du Thymol7%+ Carvacrol 7% sur l'*Alternaria sp* , l'huile essentielle d'Eucalyptus 10% et du Thym 10% et du Thymol 7%+ Carvacrol 7% agissent différemment que la l'huile essentielle du thymol 10% sur le *Botrytis sp*. L'huile essentielle d'Eucalyptus 10% et du Thymol 7% agissent différemment que la l'huile essentielle du Thymol 10% et du Thymol 7%+ Carvacrol 7% sur le *Fusarium sp*.

Les résultats obtenus nous permettent d'avancer l'hypothèse de la variabilité de la sensibilisé des pathogène envers la nature des biomolécules, cette sensibilité est relaté par rapport à la qualité de leurs métabolite secondaire. L'hypothèse avancée, rejoint de nombreuses études touchant à la réaction des pathogènes face a une exposition aux substances fongicides. Chaque huile essentielle possède une activité spécifique variable selon les microorganismes et les conditions environnementales (Caillet et Lacrois, 2009). Les champignons phytopathogène sont grâce à certaines caractéristiques de leur histoire de vie, des organismes capables de s'adapter très rapidement à des modifications de leur environnement (McDonald et Linde 2002), Grace a leurs métabolites secondaires qu'on appel les toxines ou

bien mycotoxine qui renferme un fort pouvoir pathogène qui procure aux champignons sa résistance, ces substances fongique/ mycotoxines sont produites lorsque la croissance du pathogène s'arrête ou se ralentit fortement : elles sont des produits d'adaptation du champignon à une situation du stress, certain des composés libérés par les champignons influences les organismes et leurs fonction métabolite qui interagissent avec des pathogènes conduisant à une interprétation anthropocentrique de la faction dans le champignon (Chempeil, 2004).

2. Evaluation de l'activité antifongiques des formulations des huiles essentielles sur les pathogènes :

La formulation à base d'huile essentielle complète de Thym et de l'Eucalyptus ont présenté une faible activité, cela c'est traduit par une croissance mycélienne modérée, contrairement a la formulation à base d'huile essentielle chémotypée (Thymol et Thymol+Carvacrol) qui ont révélé une réduction importante de la croissance fongique. L'activité antifongique présente une variabilité d'effet inhérent aux doses et la nature des formulations. Thymol+ Carvacrol et le Thymol 7% présentent un effet sur le *Fusarium sp*, tandis que les le Thymol 2% et à 1%, l'Eucalyptus 5% et le thym 2% ont un effet sur la souche du *Botrytis sp*, quand à la croissance mycélienne d'*Alternaria sp* est affectée par le Thym 5% et l'Eucalyptus 1%. Ce dernier est confirmé par l'existence d'une corrélation négative entre le Thym 5% et 2%, Thymol 7% et 2%, l'Eucalyptus 5% et 1%, et les trois doses du Thymol+ Carvacrol, Thymol 7%, Thym 1% et l'Eucalyptus 2%

Les doses du Thymol 2% et 1%, le Thym 2% et l'Eucalyptus 5% agissent plus efficacement contre le *Botrytis sp*, et que les trois doses de la synergie du Thymol+ Carvacrol et le Thymol 7% ont un effet sur le *Fusarium sp*, alors que l'*Alternaria sp* est plus affectée par l'activité microbienne de Thym 5% et de l'Eucalyptus 1%

Parmi les quatre huiles étudiés ceux des huiles essentielles chémotypées Thymol et Thymol+ Carvacrol sont beaucoup plus actifs que les huiles essentielles complètes (Eucalyptus, Thym). L'activité inhibitrice du Thymol+ Carvacrol est puissante, les pourcentages d'inhibition varient entre 75.75 % dans le cas de l'*Alternaria sp*, et de 100% dans le cas de *Botrytis sp* et de 68.78% dans le cas du *Fusarium sp*. Quant a la formulation à Thymol, elle est plus au moins actives, avec un pourcentage d'inhibition qui ne dépasse pas 50% pour le *Botrytis sp* et l'*Alternaria sp*, et qui dépasse 50% pour le *Fusarium sp*. Cependant, les champignons phytopathogène ont montré une sensibilité accrue à l'augmentation des doses de l'extrait dans la dilution, ou le diamètre des colonies se réduit à chaque fois qu'on augmente la dose de l'extrait. Donc, toutes les concentrations utilisées présentent un effet inhibiteur remarquable par apport à la croissance mycélienne, mais la cadence de celle-ci diminue avec l'augmentation de la concentration.

Selon la croissance mycélienne sous l'effet des formulations d'huiles essentielles complètes (Thym et Eucalyptus), et les huiles essentielles chémotypées (Thymol et Thymol+ Carvacrol), nous estimons que la formulation à base de bioactive chémotypée dosée à différentes concentrations a plus de pouvoir antifongique que les substances bioactives complètes à différentes doses. Cela est dû à leur composition chimique. On se basant sur l'hypothèse avancée, nous pouvons l'accorder avec les travaux de plusieurs chercheurs. L'activité antimicrobienne des huiles essentielles est principalement fonction de leur composition chimique, en particulier de la nature de leurs composés volatils majeurs. Ses derniers empêchent la multiplication, la sporulation et la synthèse des toxines. Sur les moisissures, ils inhibent la germination des spores, l'élongation du mycélium, la sporulation et la toxino-génèse (Hulin et al., 1998)

Les composés chimiques ayant une efficacité à large spectre antifongique appartiennent très majoritairement à trois grandes familles chimiques : les phénolpropanoïdes et substances phénoliques, les terpanoïdes, stéroïdes, les alcaloïdes et les composés azotés (Starianakou et al., 2005)

Une huile essentielle est un mélange complexe de plusieurs composés d'arômes volatils qui appartiennent aux différentes classes de la chimie organique : phénols (Carvacrol), hydrocarbures (composés terpéniques comme le limonène), alcools (Linalol), aldéhydes (Cinnamaldéhyde), cétone (Menthone), esters (Acétate de linalyle) et éthers. La plupart de ces composés est dotée de propriétés antimicrobiennes, mais ce sont les composés volatils majeurs qui présentent les propriétés antimicrobiennes les plus importantes, et en particulier les phénols, les alcools et les aldéhydes: Carvacrol (Thym), Thymol (Thym). Il est important de noter que des huiles essentielles à chémotypes différents présenteront non seulement des activités différentes mais aussi des toxicités très variables (Caillet et Lacroix, 2009).

L'huile essentielle du thym est riche en composés phénoliques comme l'eugénol, le thymol et le carvacrol. Ces composés possèdent une forte activité antifongique. Le thymol, le carvacrol, et l'eugénol sont encore ici les composés les plus actifs. Un grand nombre de composés volatils ont été testés contre une large gamme de champignons: *Candida* (*C. albicans*), *Aspergillus* (*A. niger*, *A. flavus*, *A. fumigatus*), *Penicillium chrysogenum*, et bien d'autres (Piochon, 2008)

Plusieurs études ont été menées pour comprendre les mécanismes d'action des bioproduits extraits des plantes, sont plusieurs attribuent cette fonction avec des composants phénoliques en interaction avec la membrane plasmique des agents pathogènes (Veldhuizen et al., 2006), Il est couramment admis que c'est l'effet toxique des extraits de composants sur la fonctionnalité et la structure de la membrane cellulaire qui est responsable de l'activité précitée. Plusieurs mécanismes

d'action possibles par lequel la croissance du mycélium peut être réduite ou totalement inhibée ont été proposés. (Sikkema et *al.*, 1995).

Des études ont prouvé que les composants de la membrane cellulaire traversent la paroi en interagissant avec les enzymes et les protéines de la membrane, produisant ainsi un flux de protons vers l'extérieur de la cellule qui provoque des changements dans la cellule. On signale que l'activité antimicrobienne est liée à la capacité des terpènes pour son action non seulement sur la perméabilité, mais aussi d'autre fonctionne la membrane cellulaire. Ces composés peuvent traverser la membrane, pénétrer ainsi a l'intérieur de la cellule et interagir avec les cites intra cellulaires critique (Omidbeygi et *al.*, 2007). Lucini et *al.*, (2006), à indiqué que l'inhibition de la croissance mycélienne est causée par les monoterpènes présent dans les extrais des plantes qui provoquent ainsi la mort cellulaire. D'après Tripathi et Sharma (2006), les composants des huiles essentielles agiraient sur les hyphes du mycélium, provoquant la sortie des composant des cytoplasmes, la perte de la rigidité et l'intégrité de la paroi cellulaire des hyphes, se qui entraine sa chute et la mort du mycélium.

Conclusion

Conclusion :

Depuis toujours, l'homme a eu recours aux plantes pour se maquiller, se parfumer, mais aussi pour se soigner sans connaître réellement les propriétés de ces plantes, ni avoir la moindre connaissance scientifique, même sommaire, expliquant leurs vertus. Ce n'est qu'au Moyen Age que les Huiles Essentielles ont été réellement découvertes grâce aux premières distillations et plus tard, grâce aux progrès de la science et tout particulièrement à l'apparition de la chimie. Les qualités antimicrobiennes des plantes aromatiques et médicinales sont connues depuis l'antiquité. Toutefois, il aura fallu attendre le début du 20^{ème} siècle pour que les scientifiques commencent à s'y intéresser. Ces propriétés antimicrobiennes sont dues à la fraction d'huile essentielle contenue dans les plantes. Il existe aujourd'hui approximativement 3000 huiles, dont environ 300 sont réellement commercialisées, destinées principalement à l'industrie des arômes et des parfums. Mais la tendance actuelle des consommateurs à rechercher une alimentation plus naturelle, a entraîné un regain d'intérêt des scientifiques pour ces substances. Au terme de cette étude qui intéressée à l'évaluation de l'activité fongicide de nouvelles formulations à base d'huiles essentielles complètes et chémotypées d'Eucalyptus et de Thym, nous pouvons dégager les principaux résultats ci dessous

La formulation à base d'huile essentielle complète de Thym et de l'Eucalyptus ont présenté une faible activité, cela c'est traduit par une croissance mycilienne modérée, contrairement a la formulation à base d'huile essentielle chémotypée (Thymol et Thymol+Carvacrol) qui ont révélé une réduction importante de la croissance fongique. L'activité antifongique présente une variabilité d'effet inhérent aux doses et la nature des formulations. Thymol+ Carvacrol et le Thymol 7% présentent un effet sur le *Fusarium sp*, tandis que les le Thymol 2% et à 1%, l'Eucalyptus 5% et le thym 2% ont un effet sur la souche du *Botrytis sp*, quand à la croissance mycélienne d'*Alternaria sp* est affectée par le Thym 5% et l'Eucalyptus 1%. Ce dernier est confirmé par l'existence d'une corrélation négative entre le Thym 5% et 2%, Thymol 7% et 2%, l'Eucalyptus 5% et 1%, et les trois doses du Thymol+ Carvacrol, Thymol 7%, Thym 1% et l'Eucalyptus 2%

Les doses du Thymol 2% et 1%, le Thym 2% et l'Eucalyptus 5% agissent plus efficacement contre le *Botrytis sp*, et que les trois doses de la synergie du Thymol+ Carvacrol et le Thymol 7% ont un effet sur le *Fusarium sp*, alors que l'*Alternaria sp* est plus affectée par l'activité microbienne de Thym 5% et de l'Eucalyptus 1%

Parmi les quatre huiles étudiés ceux des huiles essentielles chémotypées Thymol et Thymol+ Carvacrol sont beaucoup plus actifs que les huiles essentielles complètes (Eucalyptus, Thym). L'activité inhibitrice du Thymol+ Carvacrol est puissante, les pourcentages d'inhibition varient entre 75.75 % dans le cas de l'*Alternaria sp*, et de 100% dans le cas de *Botrytis sp* et de 68.78% dans le cas du

Fusarium sp. Quant à la formulation à Thymol, elle est plus au moins active, avec un pourcentage d'inhibition qui ne dépasse pas 50% pour le *Botrytis sp* et l'*Alternaria sp*, et qui dépasse 50% pour le *Fusarium sp*. Cependant, les champignons phytopathogènes ont montré une sensibilité accrue à l'augmentation des doses de l'extrait dans la dilution, ou le diamètre des colonies se réduit à chaque fois qu'on augmente la dose de l'extrait. Donc, toutes les concentrations utilisées présentent un effet inhibiteur remarquable par rapport à la croissance mycélienne, mais la cadence de celle-ci diminue avec l'augmentation de la concentration.

En perspective, il serait intéressant de vérifier l'efficacité fongicide des formulations *in planta* afin de voir le comportement et la stabilité des formulations sous l'effet des facteurs biotiques naturels.

Il est important d'évaluer l'efficacité des formulations sur les trois souches fongiques sur différentes spéculations.

Etablir les DL_{50} et les TL_{50} des formulations à base d'huiles essentielles complètes et chémotypées.

Références bibliographiques

Références bibliographiques

Adrian et Frangne, 1991 : La science Alimentaire de A à Z, Ed. *Lavoisier, Paris*

Alabouvette ; Olivain C. ; Steinberg C., 2005 : Maitrise des communautés microbiennes pour lutter contre les maladies d'origine tellurique *in Philogène B. JR. ; Fabres G. ; Regnault-Roger C., 2005* : Enjeux phytosanitaires pour l'agriculture et l'environnement, chap26, Ed Lavoisier Tec&Doc, Paris.

Ali-delille L., 2010 : Les plantes médicinales d'Algérie, 2^{ème} édition, Ed. Berti Algerie, pp : 114 – 226.

Andanson A., 2010 : Evolution de l'agressivité des champignons phytopathogènes, couplage des approches théorique et empirique. Thèse Doc, Université Nancy I - Henri Poincaré 7 Juillet 2010 p.5

Anonyme , 2005 : Dictionnaire environnement et développement durable

Anonyme , 2009 : désinfection de sol : la solarisation

Anonyme 1, 1999: Les champignons. <http://www.tachenon.com/Html/champi.html>

Anonyme 1, 2012: Les eucaryotes: origine, évolution, diversité, biologie et Métabolisme secondaire.

Anonyme 2, 1999. Fiche Technique Tomate sous serre : bulletin mensuel d'information et de liaison du pnnta. mdrpm/derd, pnnta. transfert de technologie en agriculture. Rebat, Maroc N°57/Juin

Anonyme 2, 2012 : Huiles essentielles et Aromathérapie. popups.ulg.ac.be/Base/document.php?id=322

Anonyme 3, 2012: <http://www.phytomania.com/thym.htm>

Anonyme : Manuel sur l'application du système de l'analyse des risques- point critiques (HACCP) pour la prévention et le contrôle des mycotoxines. Etude FAO alimentation et nutrition 73. pp 1-9.

Anonyme, 2004: Métabolites secondaires. Université de Sydney. <http://bugs.bio.usyd.edu.au/learning/resources/Mycology/Feeding/secndryMetabolites.shtml>

Anonyme, 2006 : les ravageurs et les maladies de sol dans le potage : « *Magazine Adalia* », N°13 Juil.2006

Anonyme, 2007: Profil de la culture du bleuets en corymbe au Canada. Agriculture et Agroalimentaire Canada (Centre pour la lutte antiparasitaire).Programme de réduction des risques liés aux pesticides. Canada. Janvier 2007 p12

Anonyme, 2011: Bulletin de la santé végétal: pomme de terre, Picardie, France <http://draaf.picardie.agriculture.gouv.fr/Bulletin-de-Sante-du-Vegetal-2011,668>

Références bibliographiques

Attabe M. et Haddadou O., 2009: Suivi phytosanitaire des maladies fongiques de la tomate dans quelques exploitations marichaires de la wilaya de TIPAZA. Thèse ing, en science agronomique. USDB, Blida. pp 8-9.

Bahorun T., 1997: Substances Naturelles actives: La flore mauricienne une source d'approvisionnement potentielle. Université de Maurice. AMAS, *Food and Agricultural Research Council, Réduit, Mauritius*, p 83.

Ben hassena A., 2009: Induction de la réaction de défense chez les plantes pour lutter contre les maladies. Mém. Ing, Institut national agronomique de Tunisie

Benayad, 2008: Les huiles essentielles extraites des plantes médicinales marocaines: moyen efficace de lutte contre les ravageurs des denrées alimentaires stockées

Benchabane M. ; Toua D. et Ameur D., 2012 : Exploitation et valorisation des rhizobactéries et biotechnologie végétale : phytostimulation et amélioration de la nutrition des plantes. *Agrobiologia* N°2 USDB de Blida, Algérie.

Benchabane M. ; Toua D. et Bensaid F., 2011 : action des *Pseudomonas spp. fluorescents* dans la modulation de la réceptivité du sol à *Fusarium oxysporum*, in *AGROBIOLOGIA* : Revue scientifique éditée par le laboratoire de recherche en biotechnologies des productions végétales USDB – Blida, Algérie, N°1 du 1^{er} workshop international du 2-3 Juin 2010.

Beta T. ; Nam S. ; Dexter J.E. et Sapirstein H.D., 2005 : Phenolic content and antioxidant activity of pearled ulreat and roller – milled fractions, *Creal Chem*: 390 - 393.

Binet P. et Brunel J.P., 1968 : Physiologie Végétale, Ed. Doin. Tome II. Paris.

Blanchard A. et Limache F, 2005 : Les stimulateurs des défenses naturelles des plantes (SDN), ENSAM, ENSAR et INA PG.

Boisson C. et Renard J.L., 1957 : Les maladies cryptogamiques des plantes marichaires en Côte-d'Ivoire. ORSTOM, collection de référence N°/ 1739ex. 30octobre 1957. pp 701-740.

Bonnet-Alves L., 2002 : Chémotypes ou race chimique
<http://www.aromalves.com/article2.html>

Boukhatem M.N. ; Hamaidi M.S. ; Hakim Y. et Saidi F., 2010 : Extraction, composition et propriétés physico-chimiques de l'huile essentielle du Géranium Rosat (*Pelargonium graveolens* L.) cultivé dans la plaine de Mitidja in *Nature et Technologie*, Vol 3, Algérie.

Références bibliographiques

Bouneghou S.B., 2011: L'effet inhibiteur de *Pythium sp.* sur la croissance mycélienne de *Fusarium roseum* et d'*Alternaria alternata*. Mém. Master en microbiologie. Université Mentouri Constantine, Algérie, pp15-16.

Bremmess L., 2005 : Plantes aromatiques et médicinales, Ed. Larousse, France, pp: 54- 133.

Brunton J., 1999 : Pharmiognosie et phytochimie, plantes médicinales, *Tec et Doc Lavoisier*. Paris, pp 278-279.

Caillet S. et Lacroix M., 2009 : Professeur et Responsable de Laboratoire de Recherche en Sciences Appliquées à l'Alimentation (RESALA) INRS-Institut Armand-Frappier. 531, Boul. des Prairies. Monique.Lacroix@iaf.inrs.c

Champeil A., 2004 : Contribution à la compréhension des effets des systèmes de culture sur l'infection des cultures de blé tendre d'hiver par la fusariose et la contamination des grains par les mycotoxines associées. Thèse de doctorat, UMR d'Agronomie INRA/INA P-G,p ;15

Charpy E. et Maquin G., 2010 : Mycologie II, RONEO

CNRFinfo (2001) : vers une identification des facteurs génétiques impliqués dans le cycle infectieux des champignons pathogènes, CNRS Univ., Paris 11. N°392. [http // :www.cnrs.fr/cnrspresse/n392/html/n392a02.htm](http://www.cnrs.fr/cnrspresse/n392/html/n392a02.htm)

Collemare J. ; Billard A. ; Pianfetti M. ; Tharreau D. et Lebrun M-H., 2011 : Le métabolisme secondaire fongique joue un role complexe dans les interactions entre *Magnaporthe grisea* et le riz. ORAL N°88, Lyon, France.

CTA (Centre de Technique Agricole) 2008 : programme de radio rurale : lutte intégré contre les ravageurs, Pays bas.

Cuendet M., 1999 : Recherche de nouveaux composés capteurs de radicaux libres et antioxydants à partir d'une plante d'Indonésie : « *Fagraea blumei* » (Loganiaceae) et de trois plantes d'altitude : « *Bartsia alpina* » (Scrophulariaceae), « *Loiseleuria procumbens* » (Ericaceae) et Camp, Thèse de doctorat, p 24.

Cusstr, 2009 : Danger et risque biologique. *Commission Universitaire de Sécurité et Santé au Travail Romande ; Verssion2*

De Jeude J.V.L., 2004 : Identification des dégâts causés aux cultures, par les maladies, les animaux nuisibles et les carences minérales. 1^{er} ed. Agrobok 28. fondationAgromisa. Wageningen. pp: 27-34.

Dechamplain N. et Gosselin L., 2002 : Les champignons mycorhiziens. Université Laval.

Références bibliographiques

Dereycke C. ; Dupuis B. et Vuylsteke I., 2007 : Fiches pratiques En Agriculture biologique : Essais pommes de terre Utiliser la résistance variétale pour lutter contre le mildiou en production biologique (synthèse 2002-2006).France p36

Driss S., 1990 : Etudes morphologique, biologique et essai d'efficacité de quelque fongicides sur *Alternaria alternata*, agent causal de l'aternariose des solanacées dans le littoral Algerois. Mém. Ing. en agronomie, USDB de Blida, p03

Dupuis B. et Rolot J.L., 2007 : Avis pommes de terre n°12. Centre wallon de recherches agronomiques .libramont, le 18 juillet 2007p2-3 <http://cra.wallonie.be>

Dupuis B. et Vuylsteke I., 2007 : Fiches pratiques En Agriculture biologique : Essais pommes de terre Utiliser la résistance variétale pour lutter contre le mildiou en production biologique (synthèse 2002-2006).France p36

Duval J., 2006 : Les besoins en phytoprotection des maraîchers biologiques. Club agroenvironnemental Bio-Action

El kalamouni, 2010 : Caractérisations chimiques et biologiques d'extraits de plantes aromatiques oubliées de Midi-Pyrénées ; Thèse de doctorat de l'université de Toulouse. France

EPA (Environmental Protection Agency), 2004 : <http://www.epa.gov/pesticides/biopesticides>

Girard G., 2010 : Les propriétés des huiles Essentielles dans les soins bucco - Dentaires d'hier à aujourd'hui : Mise au point d'un modèle préclinique de lésion buccale de type aphte pour tester les effets thérapeutiques des huiles essentielles. Diplôme d'Etat de Docteur en Pharmacie Univ. Henri Poincare - Nancy 1.

Haouagu A., 2009 : Les pratiques culturales et leurs effets sur les ennemis des cultures. INRAN. Niamey

Harbone J.B., 1998: Phytochemical methods: *A guide to modern techniques of plants analysis*. 3rd Edition. ISBN: 0-412-57260-5 (HB) and 0-412-57270-2 (PB).

Heinrich G.; Schultze W.; Pfa I. et Boettger M., 1983: The site of essential oil biosynthesis in *Poncirus trifoliata* and *Monarda fistulosa*." *Physiologie Vegetale*, 21: 257-268.

Hermann O: Reconnaître les maladies foliaires de la betterave au champ *Institut Royal Belge pour l'Amélioration de la Betterave (IRBAB/KBIVB) Tienen (Tirlemont), Belgique*

http://cgdc3.igmors.upsud.fr/microbiologie/partie1/chap7_3_metab_secon.htm

http://www.memoireonline.com/04/10/3441/m_Induction-de-la-reaction-de-defense-chez-les-plantes-pour-lutter-contre-les-maladies2.html

Références bibliographiques

Hulin V. ; Mathot A-G ; Mafart P. et Dufosse L., 1989 : Les propriétés antimicrobiennes des huiles essentielles et composés d'arômes, Ed. Tec&Doc, Lavoisier, Paris, FRANCE. Vol. 18, n°6, pp. 563-582

INRA, 2009 : Un champignon indésirable des tomates sous serre : *Botrytis cinerea*.

INRA, 2010 : Comment stimuler les défenses naturelles des plantes ?

Jourdan E. ; Ongena M. et Thonart P., 2008 : Caractéristiques moléculaires de l'immunité des plantes induite par les rhizobactéries non pathogènes, *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* 12, p437-449

Kansole M.M.R., 2009 : Etude ethnobotanique, phytochimique et activités biologiques de quelques lamiaceae du Burkina Faso: cas de *Leucas martinicensis* (Jacquin) R. Brown, *Hoslundia opposita* vahl et *Orthosiphon pallidus* royle ex benth. Mémoire pour obtenir un diplôme d'Etudes Approfondies (D.E.A) en Sciences Biologiques Appliquées, Burkina Faso.

Le Poivre P. et Nasraoui B., 2003 : Phytopathologie, chap 6. De Boeck Université. Bruxelles. P : 112

Le Roux P., 2005 : Mode d'action et sélectivité des fongicides in **Bernard JR. Philogène, Gérard Fabres, Catrine Regnault-Roger** : enjeux phytosanitaires pour l'agriculture et l'environnement, chap6, Ed. Lavoisier Tec&Doc, Paris.2005

Lebham, 2005 : Thèse au laboratoire d'Ecophysiologie et de Biotechnologie des Halophytes et des Algues au sein de l'Institut Universitaire Européen de la Mer. (IVEM). Université de Bretagne Occidentale (UBO).

Lebrun M.H., 2011 : Biologie moléculaire du pouvoir pathogène des champignons. CNRS ural354, institut de génétique et microbiologie, Université Paris-1, Orsay, France

Lmegharbi A. et Mardi S., 2011 : Activités antifongiques des huiles essentielles d'*Artémisia absinthium* sur trois champignons phytopathogènes : *Fusarium colmorum* ; *Botrytis cinerea* et *Helminthosporium* sp

Lucas P. et Gril J-J., 2008 : Vers une réduction de l'utilisation des pesticides et de leurs impacts environnementaux in Expertise scientifique collective « pesticides, agriculture et environnement (chp6)

Lugasi A. ; Hovari J. ; Sagi K.V. et Biro L., 2003 : The role of antioxidant phytonutriments in the prevention of diseases. "Acta. Biologica Szegediensis" 1-4: 119-125.

Mallet A., 2008 : Les Stimulateurs naturels de défense (SDN) de la Vigne. Chambre d'agriculture, INDRE- et -LOIRE

Références bibliographiques

Mazollier C., 2009 : La solarisation. Réf. bio maraîchage PACA - fiche SOLARISATION. Provence-alpe-coted d'azur, juin 2009

Mechouche H. et Saidi K., 2010 : Effect de la co-inoculation de *pseudomonas flutoscens* ET *Bacillus subtilis* sur la fusariose vasculaire de la tomate, Mém. Ing. en Agronomie. USDB de Blida. Algérie.

Messiaen C.M. ; Blanchard D. ; Rouxel F. et Lafon R., 1991 : Du labo au terrain : maladies des plantes marichaires. 3eme etidition. INRA. 1991. pp : 30-40.

Michel V. ; Ahmed H. et Dutheil A., 2007 : La biofumigation, une méthode de lutte contre les maladies du sol. Station de recherche Agroscope Changins-Wädenswil ACW, Centre des Fougères, CH-1964 Conthey. Revue suisse Vitic. Arboric. Hortic. Vol. 39 (2): 145-150.

Milane H., 2004 : La quercétine et ses dérivés : molécules à caractère pro-oxydant ou capteurs de radicaux libres, études et applications thérapeutiques. Thèse en vue de l'obtention du grade de docteur en science. Université Louis Pasteur. Strasbourg

Mourichon X., 2003 : Analyse du Risque Phytosanitaire (ARP). CIRAD. Juin 2003. P : 8

Mulon L., 2011 : Les huiles essentielles : les connaître pour mieux les conseiller <http://www.biolineaires.com/articles/cosmetique/309-les-huiles-essentiellees.html>

Ousmail ; Baba A. et Bay, 2011 : Contribution à l'inventaire des maladies et ravageurs des cultures maraichères dans la vallée du M' Zab, Centre universitaire de Ghardaia Algérie –Mém. Licence http://www.memoireonline.com/01/12/5177/m_Contribution--linventaire-des-maladies-et-ravageurs-des-cultures-maracheres-dans-la-vallee8.html

Padrini et Lucheroni, 1996 : La lutte chimique contre les champignons pathogènes des plantes : évaluation du systémier phloémienne de nouvelles molécules à effet fongicides et d'activateurs de réaction de défense. Université de Poitiers.

Pageau D. et Filion P., 2007 : Fusariose : réduire les risques aux champs!, MAPAQ Montérégie Ouest journé d'information sur les mycotoxine, pp : 1-2.

Pandey D.K., Tripathi N.N., Tripathi R.D. et Dixit S.N, 1982 : fungitoxic and phytotoxic properties of the essential oil of *Caesulia axillaris Roxb.* (compositae). Angerwandt Botanik, 56 : 256-257.

Perret C., 2001 : Analyse de tanins inhibiteurs de la stilbène oxydase produite par *Botrytis cinerea* Pers.: Fr. Université de Neuchâtel. Institut de chimie. pp : 17-24.

Piochon M., 2008 : Etude des huiles essentielles d'espèces végétales de la flore laurentienne: composition chimique, activités pharmacologiques et hémi-synthèse. Chap. I, Univ. du Quebec, pp : 15-18.

Références bibliographiques

Regnault-Roger C., 2002 : De nouveaux insecticides pour le troisième milliaire, *in* **Regnault-Roger C. ; Phylogène B.J.R, Vincent C.** : Biopesticides d'origine végétale. Ed. Lavoisier Tec&Doc, Paris, pp : 10-40

Reis A. et Boiteux L., 2007 : Outbreak of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* race 3 in commercial fresh-market tomato fields in Rio de Janeiro State, Brazil. *Horticultura Brasileira*, pp : 451-454.

Renault-Roger C. ; Siluy C. et Alabouvette C., 2005 : Enjeux phytosanitaires pour l'agriculture et l'environnement, chapitre 41 : biopesticides : réalités et perspectives commerciales, Ed. Lavoisier Tec&Doc, Paris, pp : 850-978

Rhayour K., 2002 : Etude du mécanisme de l'action bactéricide des huiles essentielles sur *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* et sur *Mycobacterium phlei* et *Mycobacterium fortuitum*, Thèse de doctorat d'état en sciences naturelles. Université Sidi Mohammed Ben Abdallah, Fès.

Rocher F., 2004 : Lutte chimique contre les champignons pathogènes des plantes : évaluation de la systémie phloémienne de nouvelles molécules à effet fongicide et d'activateurs de réactions de défense, Thèse Doc., Univ. Poitiers, France.

Ryckmans D : L'alternariose : le point sur la question. pro.ovh.net/~fiwap/uploads/File/.../Maldies/0606Alternariose.pdf

Schiffers B. et Wainwright H., 2001: Lutte biologique et protection intégrée, PIP, COLEACP, Belgique www.coleacp.org/pip

Sikkema j. ; de bont J.A.M ; Poolman B., 1995 : Mechanisms of membrane toxicity of hydrocarbons. *Microbiol Mol Biol.* 59 : 201-222.

Starianakou S. ; Liakopoulos G. et Karabourniotis, 2005 : Boron, deficiency effects on growth, photosynthesis and relative concentration of phenolics of *Dittrichia viscosa* (Asteraceae). *Environmental and Experimental botany* (Elsevier). P : 293-300)

Thomas O.P., 2009 : Métabolisme secondaire et Biosynthèse. Master 2 VEM. Université Nice Sophia Antipolis.

Tomke M. ; Jenny E. ; Forrer H-R. et Vogelgsang S., 2001 : Fusaries et mycotoxines dans le maïs-grains en Suisse, *Production végétale. Recherche Agronomique Suisse*, pp : 520–525

Tripathi A. et Sharma N., 2006 : Fungitoxicity of the essential oil of citrus cinensis on post-harvest pathogens. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 22 : 587-593.

Vermerris W., 2006 : Phenolic compound biochemistry, Springer, Dordrecht. ISBN-10 1-4020-5163-8 (HB).

Références bibliographiques

Videlier H., 2011 : Le chémotype c'est quoi? Exemple avec le thym. <http://www.huiles-essentielles-lyon.com/index.php?tag/ch%C3%A9motype>

Vincent C. ; Panneton B. et Flemat-Lessard F., 2000 :Lutte phisique en phytprotection. INRA, Paris

Walker A. S., 2009 : Biologie et Gestion du Risque – Champignons Phytopathogènes (BIOGER-CPP) Equipe Antifongiques : Mode d'action et résistance (AMAR), Versailles. UMR1290. walker@versailles.inra.fr

Annexes

Annexe 01

Milieu OGA (Oxytetracycline Glucose Agar) :

Extrait de levure5g

Glucose20g

Agar16g

Eau distillée1000mL

pH = 6,8 - 7

Annexe 02



A+B+F traité au thym 10%

A+B+F traité à l'eucalyptus 10%

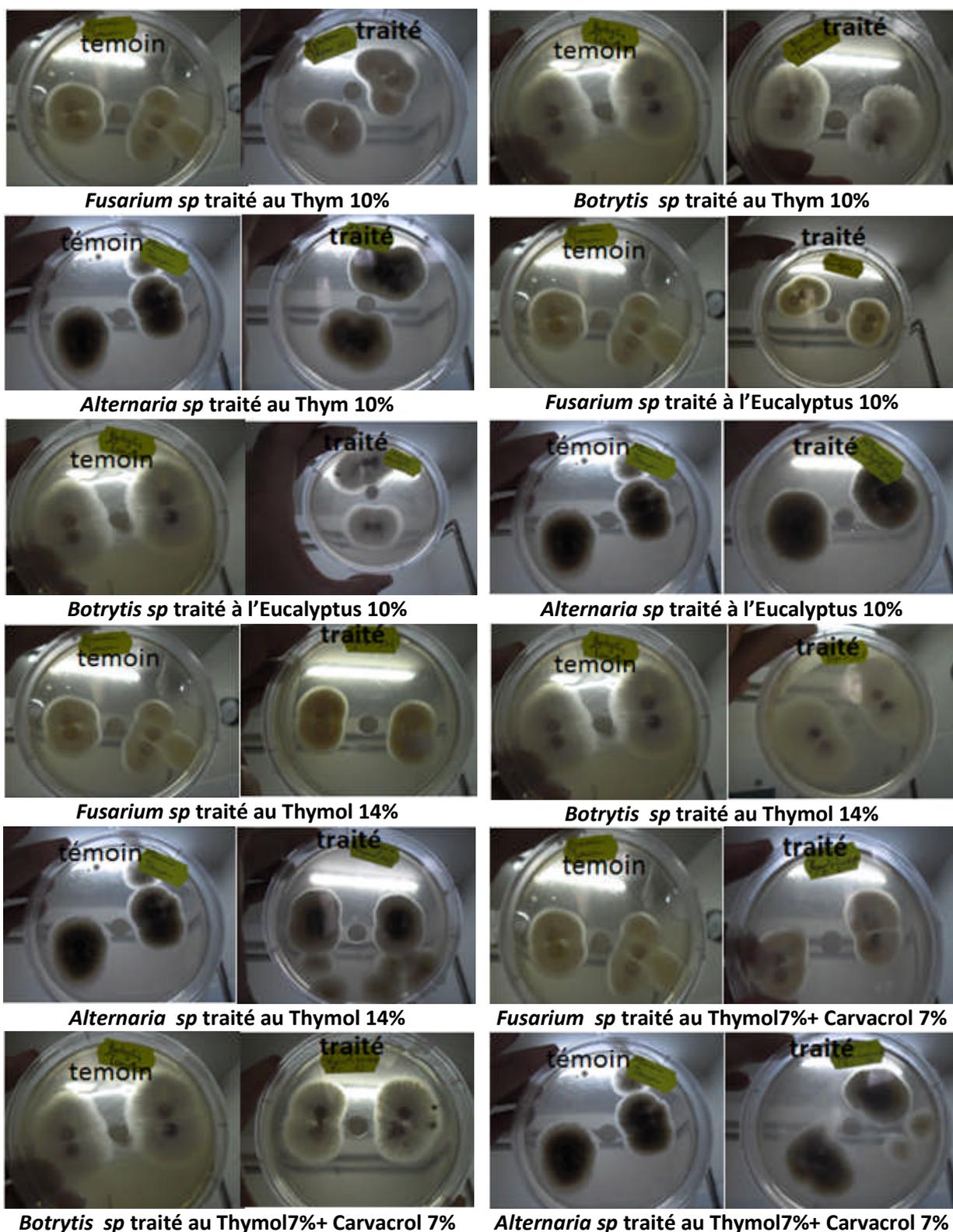


A+B+F traité au thymol 14% après

A+B+F traité au thymol 7%+ carvacrol 7%

Titre : illustration de la zone d'inhibition des souches pathogènes après 24 heures d'exposition aux bioproduits

Annexe 03

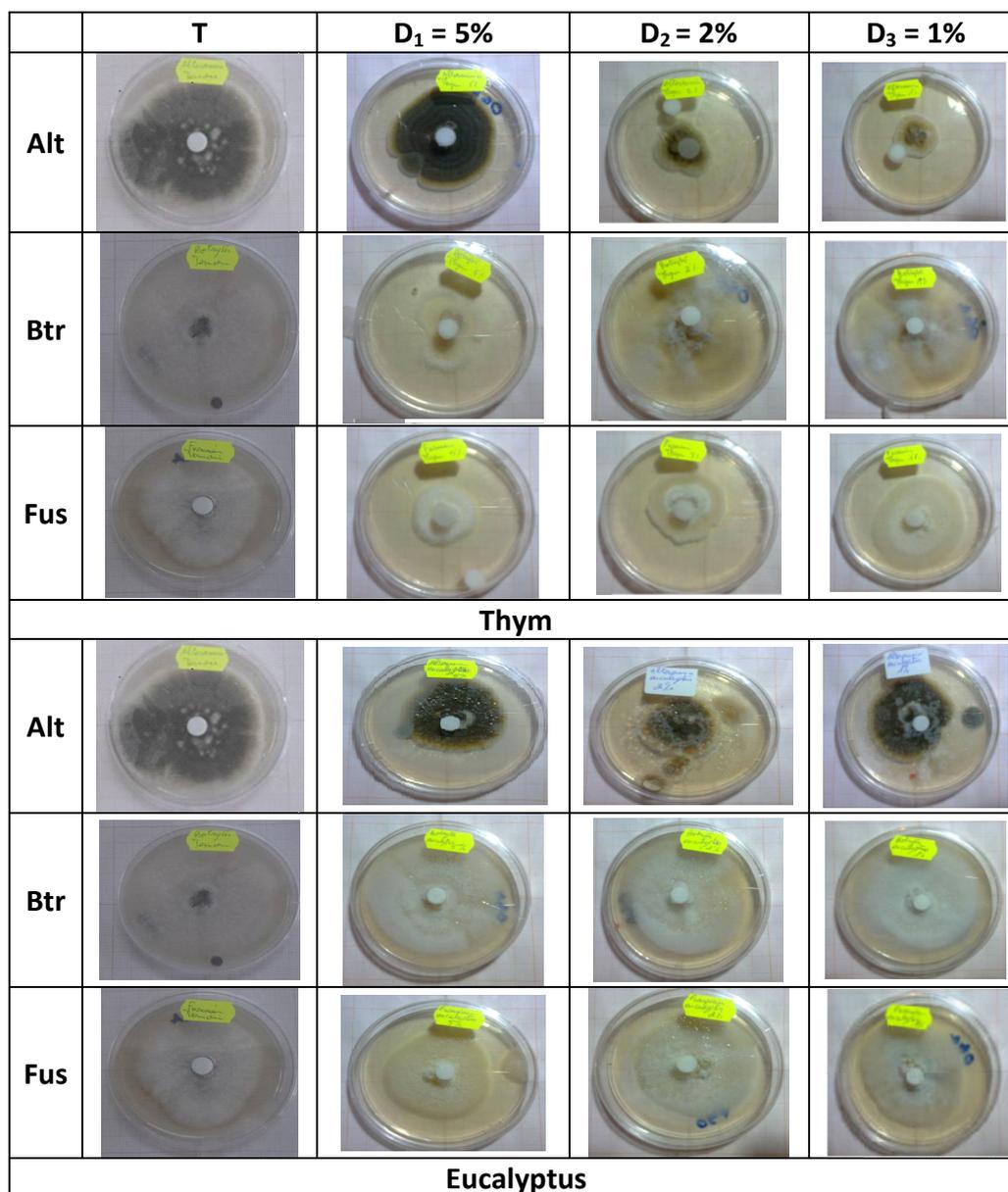


Titre : illustration des zones d'inhibitions des souches fongique après 24 heures

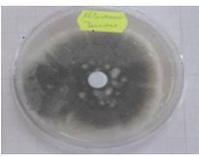
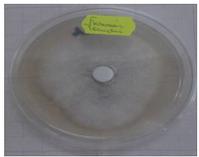
Annexe 04

Titre : Pouvoir antifongique des extraits testés représenté par l'inhibition de la croissance mycélienne par rapport au témoin.

A : champignons traités par le Thym et l'eucalyptus



B : champignons traités par le Thymol et le Thymol + carvacrol

	T	D ₁ = 7%	D ₂ = 2%	D ₃ = 1%
Alt				
Btr				
Fus				
Thymol				
	T	D ₁ = 4%	D ₂ = 2%	D ₃ = 1%
Alt				
Btr				
Fus				
Thymol + carvacrol				