

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
UNIVERSITÉ « SAAD DAHLAB » DE BLIDA 1



Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

Département des Biotechnologies

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

Spécialité : Biotechnologie végétale

Thème

Évaluation de l'activité antimicrobienne *in vitro* de l'huile essentielle de *Rosmarinus tournefortii* de la région de Bouira

Présenté par : M^{me} Ammam Selma

Devant le jury composé de :

M ^{me} Belguendouz R.	Maître de conférences B	USDB1	Présidente
M ^{elle} Taffet L.	Doctorante	USDB1	Examinatrice
M ^{me} Mohamed Mahmoud F.	Maître assistant A	USDB1	Examinatrice
M ^{me} Bouchenak F.	Maître assistant A	USDB1	Promotrice

Promotion : 2013-2014

Dédicaces

Avec un plus grand respect, je dédie ce modeste travail au plus grand trésor que je possède, à ceux qui m'ont appris à aimer la vie et à affronter ses problèmes avec courage et patience à toi chère mère et à la mémoire de mon père que Dieu le bénisse.

À celui qui a su donner goût à ma vie, mon âme sœur mon mari Raouf

À mes très chers enfants : Tasnim, Mohamed Moatez, Sara Nour.

À mes très chères sœurs : Mounia, Mériem, Nadjiba et Soumia.

À mes très chers frères : Khalil et Abdel Hadi.

À ma deuxième maman « Salîha » et mon deuxième père « Mohamed »

Et mes sœurs : Amel, Hind, Zola et Nassima.

Et mon frère Amine.

À toute la famille.

À tous mes ami(e)s ; Nadia, Khalida, Souhila, Fetouma, Fella, Nesrine, Sabrina, Nazîha, F.Zohra, Zohra, Stambouli, Yousra, Hayat, Dalîla, Houria, Amina ;

Abdel Rahmane, Siham, Sara.

À tous mes enseignants.

À tous les Biologistes et les Agronomes.

À tous ceux dont l'absence n'exclut pas leur présence dans mon cœur.





Remerciements

*Tout d'abord, je remercie Dieu le tout puissant de m'avoir donné
le courage, la force et la volonté pour bien mener ce travail.*

*Je tiens à remercier les membres de jury de thèse d'avoir accepté 'honorer
et d'enrichir mon travail pour cela je leur exprime ma profonde reconnaissance.*

*Je tiens à exprimer ma gratitude, mes sincères remerciements et mes respects
à ma promotrice Mme Bouchenak F. de m'avoir dirigée, orientée
et aidée par ses précieux conseils tout en long de ce travail, sa
rigueur scientifique, sa patience ainsi que sa disponibilité.*

*Mes vifs remerciements vont au Dr Belquendouz R, qui
m'a fait l'honneur de présider le jury.*

*Je voulais remercier humblement Mme MOHAMED MAHMOUD .F et Melle Tafifet.L
d'avoir bien voulu accepter d'être membre de jury et d'examiner ce travail.*

*Mes remerciements vont sans doute à mes collègues de travail
et surtout à Dalila Brahim RAHMANI qui m'a aidé à
réaliser ce travail, à M^{me} BEN OUAKLIL pour ses conseils.*

*Je remercie également toutes personnes ayant contribué de près ou de loin
à la réalisation de ce modeste travail.*

Liste des abréviations

Abs : absorbance.

AFNOR : Association Française de normalisation.

CG/MS : Chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse.

CMI : concentration minimale inhibitrice.

D_{20}^{20} : densité relative à 20 °c.

Fig : figure .

HCl : acide chlorhydrique.

H.E : huile essentielle.

I_A : indice d'acide.

I_E : indice d'ester.

I_I : indice d'iode.

I_{OH} : indice d'hydroxyde.

I_P : indice de peroxyde.

I_R : indice de refraction .

I_S : indice de saponification.

KOH : hydroxyde de potassium.

ml : millilitre.

mm : millimètre.

N : normalité.

Na OH : hydroxyde de sodium.

α_{20}^{20} : pouvoir rotatoire à 20 °c.

DMSO :Dimethylsulfoxyque

Résumé :

Cette étude a pour objectif de déterminer la composition chimique et d'évaluer l'activité antimicrobienne de l'huile essentielle de *Rosmarinus tournefortii*.

Le rendement, les caractéristiques chimiques de l'huile essentielle de *R.tournefortii* ont été déterminés.

L'extraction de l'huile essentielle a été réalisée par hydrodistillation ; La composition de l'huile essentielle a été analysée par Chromatographie . Elle a permis d'identifier 05 composés terpéniques qui sont : camphor (35,123%) , camphène (18,636%) , α pinène (17%) , carène (10,132%) , cinéol (9,701%) .

Les résultats relatifs à l'étude de l'activité antibactérienne de l'huile essentielle obtenue ont montré une action et degrés de sensibilité variable vis-à-vis des souches utilisées *Pseudomonas syringae*(19mm) , *Pseudomonas savastoni* (30mm), *Pectobacterium carotovorum*(16mm) , *Erwinia amylovora*(36mm).

L'huile essentielle de *Rosmarinus tournefortii* Possède une efficacité moyennement marquée sur une gamme de champignons phytopathogènes à savoir *Fusarium sp*(44,33%) , *Phytophthora sp* (39%) , *Cladosporium sp* (21%) , *Rhizoctonia solani* (11%), et une efficacité très marquée sur *Sclerotinia sp*(61%) , et *Trichoderma sp* (0%) et une résistance de *Penicillium sp* (0%).

Les résultats de la détermination de la concentration minimal inhibitrice de l'HE du *R.tournefortii* sur les 6 souches microbiennes étudiées révèlent que la bactérie *Erwinia amylovora*, qui a été la plus sensible, a présenté la CMI la plus faible égale à 0,875%. et que les champignons les plus sensibles sont *Trichoderma sp* et *Sclerotinia sp*. qui ont présenté la CMI qui égale (0.875%).

Mots clés : huile essentielle, *Rosmarinus tournefortii*, hydrodistillation , activité antimicrobienne , CG/SM ,CMI.

Abstract :

This study aims to determine the chemical composition and evaluate the antimicrobial activity of essential oil of *Rosmarinus tournefortii* ;

The extraction of essential oil was carried out by hydrodistillation. Performance ,chemical characteristics of the essential oil of *Rosmarinus tournefortii* were determined the composition of essential oil was analysed by CG/SM . It identified 05 terpene compound that are ; camphor (35,123%) , camphène (18,636%) , α pinène (17%) , carène (10,132%) , cinéol (9,701%) .

The result relating to the study of the antimicrobial activity of essential oil obtained showed an action and degree of sensitivity variable against (*Pseudomonas syringae*(19mm) , *Pseudomonas savastoni* (30mm), *Pectobacterium carotovorum*(16mm) , *Erwinia amylovora*(36mm).And pocesses an average efficiency on arange of phytopathogenic fungi , such as : *Fusarium sp*(44,33%) , *Phytophthora sp*(39%) , *Cladosporium sp*(21%) , *Rhizoctonia solani*(11%), and great efficacy against *Sclerotinia sp*(61%) ,and *Trichoderma sp*,and resistance of *Penicillium sp*(0%).

The results of the determination of the CMI of essential oil of *R.tournefortii* against the 6 microbes (which present remaquable sensibility) showed that *Erwinia amylovora*, was the first sensible bacteria , which present the lowed CMI : 0,875%.and the most sensible fungi are *Trichoderma sp et Sclérotinia sp* which present the CMI of (0.875%).

Key words : essential oil , *Rosmarinus tournefortii* , hydrodistillation , anti-micribial activity , CG/SM .

ملخص :

الإكليل (*Rosmarinus tournefortii*) من عائلة الشفويات .

هذه الدراسة تهدف إلى تحديد التركيب الكيميائي و تقييم النشاط المضاد للمكروبات ، الإكليل (*Rosmarinus tournefortii*) تم استخلاص الزيت الأساسي بواسطة التقطير بالبخار ، تم تحليل تركيبة الزيت الأساسية بواسطة CG/SM ، بيّن التحليل بواسطة استخدام كروماتوغرافيا الطور الغازي مع مطيافية الكتلة CG/SM للزيت الأساسي لنبات الإكليل بأنها تحتوي على التركيبات التالية :

camphor(35,123%) , camphène(18,636%) , α pinène(17%) , carène(10,132%) , cinéol(9,701%) .

النتائج المتحصل عليها الخاصة بدراسة فاعلية الزيت الأساسي ضد الجراثيم بيّنت وجود فاعلية و درجة حساسية متغيرة، (*Pseudomonas syringae*(19mm) , *Pseudomonas savastoni*(30mm), *Pectobacterium carotovorum*(16mm) , *Erwinia amylovora*(36mm). *Fusarium sp*(44,33%) , *Phytophthora sp* (39%) , *Cladosporium sp* (21%) , *Rhizoctonia solani*(11%), *Sclerotinia sp*(61%) ,and *Trichoderma sp* (60%), *Penicillium sp* (0%).

بيّن استخدام هـ درجة فاعلية الزيت الأساسي ضد الجراثيم تحديد CMI

Erwinia amylovora, CMI : 0,875%. *Trichoderma sp et Sclerotinia sp* CMI (0.875%).

الكلمات المفتاحية : الزيت الأساسي ، الإكليل ، التقطير بالبخار ، الفاعلية ضد الجراثيم ، CG/SM CMI

Liste des tableaux

Tableau 1 : Les diamètres d'inhibition et leurs degrés de sensibilités	39
Tableau 2 : Le Rendement en huile essentielle de la plante	42
Tableau 3 : Résultats des analyses physico-chimiques de l'huile essentielle de <i>Rosmarinus tournefortii</i> .	43
Tableau 4 : Les principaux composés chimiques (%) de l'HE de <i>Rosmarinus tournefortii</i> analysée par CG/MS	46
Tableau 5 : Résultats de l'activité antifongique de l'HE du <i>R.tournefortii</i>	48
Tableau 6 : Résultats de l'activité antibactérienne de l'HE du <i>R.tournefortii</i>	51
Tableau7 : Détermination de la concentration minimale inhibitrice de l'HE du <i>R.tournefortii</i> sur 6 souches bactériennes	56
Tableau 8 : Détermination de la CMI de l'HE du <i>R.tournefortii</i> sur les souches fongiques.	58

Liste des figures

Figure 1 : La fleur de <i>Rosmarinus tournefortii</i>	3
Figure 2 : Aspects morphologiques de <i>Rosmarinus tournefortii</i>	4
Figure3 : Extraction d'HE par hydrodistillation	11
Figure4 : Extraction d'HE par entrainement à la vapeur d'eau	12
Figure 5 : Illustration de la méthode d'aromatogramme sur boîte de Petri	16
Figure 6 : Illustration de la méthode des microatmosphères	16
Figure 7 : Mycélium de <i>Rhizoctonia solani</i> (Blancard ,2009)	20
Figure 8 : Conidies de <i>Fusarium sp</i> (Barnett ,1972)	21
Figure 9 : Conidies de <i>Penicellium sp</i> (Blancard ,2009)	22
Figure10 : Conidies de <i>Cladosporium sp</i> (Bisset ,2004)	22
Figure11 : Conidies de <i>Trichoderma sp</i> (Kubiceket ,2003)	23
Figure12 : Sporanges et zoospores de <i>Phytophthora sp</i> (Jilman ,1986)	24
Figure13 : Les différentes étapes de la détermination de l'indice d'acide	33
Figure14 : Les différentes étapes de la détermination de l'indice de saponification	34
Figure15 : Les différentes étapes d'évaluation de l'activité antimicrobienne	38
Figure16 : Préparation des dilutions de l'HE	41
Figure17 : Le rendement en huile essentielle de <i>Rosmarinus tournefortii</i>	42
Figure18 : La composition chimique de l'huile essentielle de <i>Rosmarinus tournefortii</i> analysée par CG/MS	45
Figure19 : Effet de l'HE de <i>Rosmarinus tournefortii</i> sur <i>Sclérotinia sp</i> , <i>Trichoderma sp</i> , <i>Rhizoctonia solani</i> , <i>Fusarium sp</i> , <i>Phytophthora sp</i> , <i>Pénicillium sp</i> , <i>Cladosporium sp</i>	51
Figure20 : Effet d'HE de R.tournefortii sur a- <i>Erwinia amylovora</i> ,b- <i>Pseudomonas savastoni</i> ,c- <i>Pectobacterium carotovorum</i> et d- <i>Pseudomonas syringae</i>	53
Figure21 : La CMI d' <i>Erwinia amylovora</i>	57
Figure22 : La CMI d' <i>Pseudomonas savastoni</i>	57

Sommaire

Introduction.....	1
PARTIE I : SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE	
Chapitre I : Généralités sur <i>Rosmarinus tournefortii</i> de Noé	
I.1.La famille des Lamiacées.....	3
I.2.Description botanique du genre <i>Rosmarinus</i>	4
I.3.Systématique botanique de <i>Rosmarinus tournefortii</i>	4
I.4.Air de répartition.....	4
I.5. Propriétés thérapeutiques et emplois.....	4
Chapitre II : Généralités sur les huiles essentielles	
II.1. Historique.....	6
II.2.Définition.....	7
II.3.Localisation et lieu de synthèse.....	7
II.4.Classification des huiles essentielles.....	8
II.5.Propriétés physiques et composition chimique.....	8
II.6. Rôle des huiles essentielle.....	9
II.7.Techniques d'extraction des huiles essentielles.....	10
II.8.Méthodes de caractérisation chimique des huiles essentielles.....	14
II.9 Activité biologiques.....	14
II.9 .1.Activité antimicrobienne.....	15
II.9.2-La concentration minimale inhibitrice(CMI).....	17
Chapitre III : Les microorganismes phytopathogènes étudiés	
III.1.Les maladies phytopathogènes d'origine fongique.....	18
III.1.1.Généralités sur les champignons phytopathogènes.....	18
III.1.2.Importance économique des maladies fongiques.....	18
III.1.3.Cycle parasitaire des champignons phytopathogènes.....	18
III.2.Les maladies phytopathogènes d'origine bactérien.....	25
III.2.1.Généralités sur les bactéries phytopathogènes.....	25
III.2.2.Les fonctions requises pour les bactéries par la canalisation de l'hôte.....	26
III.2.3.Les maladies bactériennes dues aux bactéries phytopathogènes.....	26
III.2.4. Importance économique des bactéries phytopathogènes	28

PARTIE II : EXPÉRIMENTATION

Chapitre IV : Matériels et méthodes

IV.1Partie expérimentale.....	29
IV.2Matériel végétal.....	29
IV.3-Les microorganismes utilisés	29
IV.4.Les milieux de cultures.....	30
IV.5.extraction de l'huile essentielle de <i>Rosmarinus tournefortii</i>	30
IV.6.Calcul du rendement.....	31
IV.7.Analyses physico-chimiques.....	31
IV7.1.Mesure des indices physiques.....	31
IV.7.2. Mesure des indices chimiques.....	32
IV.8.Analyse de la composition chimique de l'huile essentielle par CG/SM	35
IV.9.Evaluation de l'activité antimicrobienne de l'HE de <i>Rosmarinus tournefortii</i>	36
VI.9.1..Méthode de diffusion en milieu gélosé.....	36
IV.9.2Etude de l'activité antimicrobienne.....	37
IV.9.3.Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) par la méthode de dilutions en milieu solide.....	40

Chapitre V : Résultats es discussions

V.1. Rendement en huile essentielle.....	42
V.2.Résultats de l'étude physico-chimique.....	43
V.3. Résultats de la composition chimique de l'huile essentielle analysée par CG/SM.....	45
V.4. .Evaluation du pouvoir antimicrobien « <i>in Vitro</i> » de l'HE de <i>Rosmarinus tournefortii</i>	47
V.4.1 Evaluation du pouvoir antifongique de l'huile essentielle de <i>Rosmarinus tournefortii</i>	47
V.4.2 Evaluation du pouvoir antibactérien de l'huile essentielle de <i>Rosmarinus tournefortii</i>	51
V.4.3 Résultats de la concentration minimale inhibitrice (CMI).....	56
Conclusion générale.....	59
Références bibliographiques	61

Annexes

INTRODUCTION

Introduction

Les plantes font parties elles-mêmes des ressources naturelles vivantes, sont aussi la source directe ou indirecte par le lieu trophique de l'ensemble des êtres vivants sur la planète (être humains, bactéries, champignons,...) elles exercent des fonctions écologiques et économique très diversifiées, certaines espèces végétales constituent différentes sources industrielles, énergétiques et pharmaceutiques (**Vincent et Coderre, 1992**).

Les plantes sont constamment exposées et menacées par les ravageurs et les microorganismes présents dans leur environnement. Des études ont pu estimer largement que 10% des récoltes sont perdues à cause des maladies. (**Deacon, 1997**). Les maladies fongiques non contrôlées peuvent entraîner des effets catastrophiques comme la grande famine de pomme de terre en Irlande (1845 – 1849) causée par *phytophthora infestant*, encore connue à ce jour dans le monde (**Sharma, 1989**).

Les maladies bactériennes sont responsables de pertes économiques considérables dans plusieurs pays, dépassant 1230 milliards de dollar chaque année (**Elmhirst, 2007**).

La protection des cultures contre ces agents pathogènes nécessite l'usage des produits pesticides dont il est en constante augmentation à travers tous les pays du monde. Pratiquement tous les 10 ans depuis 1945 ce sont les pays en voie de développement qui les utilisent de plus en plus. Au niveau mondial, la valeur marchande des pesticides est de l'ordre de 32 milliards de dollars, dont 3 milliards pour les pays en voie de développement.

Les phénomènes de résistance des agents phytopathogènes et des ravageurs aux pesticides ont conduit à utiliser des concentrations de plus en plus fortes de substances actives, cette augmentation s'est révélée source de désordres écologiques (**Regnault-Roger, 2002**).

Face à ces profils toxicologiques et écotoxicologiques nettement importants constatés au cours de ces dernières décennies et qui sont liés à l'accumulation des résidus de pesticides, il était urgent de développer des méthodes de contrôle et de protection plus écologiques tout comme les approches alternatives complémentaires et innovantes, cette

Introduction

démarche s'inscrit dans le cadre du développement d'une protection intégrée, raisonnée ou biologique telle que l'utilisation de bio pesticides (**Tafifet, 2010**).

Les biopesticides occupent une place de choix car ils se prêtent souvent à la production de masse requise pour l'industrie et ils s'appliquent avec un pulvérisateur conventionnel ce qui en facilite l'adoption par les producteurs agricoles. Ils sont généralement compatibles avec des méthodes de lutte biologiques classiques, même s'ils peuvent avoir des effets néfastes sur les organismes utiles (**Giroux et al, 1994**).

Les biopesticides peuvent être à base de bactéries, champignons, virus, nématodes et extraits de plantes.

Récemment, l'acceptation de la médecine traditionnelle comme forme alternative de santé et de développement de la résistance microbienne aux antibiotiques disponible a pousser les chercheurs à étudier l'activité antimicrobienne de plantes médicinales (**Nestr et al., 2000**).

A cet effet, de nombreuses plantes médicinales ont été répertoriées comme présentant une activité bio pesticide sur une large gamme de bactéries, de champignons et de nématodes phytoparasites.

A travers notre démarche scientifique ; Nous avons fixé comme objectif dans ce travail ,l'étude de l'effet antimicrobien de l'huile essentielle de *Rosmarinus tournefortii* obtenue par hydrodistillation (partie aérienne) à l'égard d'une gamme de bactéries et champignons phytopathogènes. Et ceci par des confrontations *in vitro* en boîtes de Pétri dans le but d'utiliser l'espèce *Rosmarinus tournefortii* comme agent de lutte biologique.

PARTIE I
SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE

Chapitre I : Généralités sur *Rosmarinus tournefortii* de Noé

I.1. La famille des Lamiacées

L'une des plus importantes familles de la flore d'Algérie (Grim, 1998), la deuxième famille botanique constituant les plantes médiévales est celle des Lamiacées (Labiée). La forme de la fleur et la présence d'huiles essentielles signent cette famille (Kaufmann et al., 1994). Cette famille de plantes angiospermes dicotylédones à fleurs gamopétales irrégulières qui regroupe surtout des plantes herbacées et sous arbustives réparties dans le monde entier. Les Lamiacées herbacées, annuelles ou vivaces, sont très nombreuses et très répandues, exemple : les thym, les lavandes, les romarins sont surtout abondants dans les régions méditerranéennes (Moreau, 1960). Les Lamiacées comportent plus de trois mille cinq cents espèces, et quelque deux cents genres, répartis en sept sous familles.

I.2. Description botanique du genre *Rosmarinus*

Le *Rosmarinus* en Latin signifie la rosée marine, ce qui fait référence à la présence du Romarin sur les côtes et les îles de la méditerranée et diverses légendes liées à cette plante (Body, 1948 ; Fauve et al., 1981 ; Grégory, 1988).



Figure n° 1 : La fleur de *Rosmarinus tournefortii* (romarin wikipedia)

Le *Rosmarinus tournefortii* est un arbuste vivace, ligneux, très odorant, feuilles linéaires à marge révoûtées, verdâtre en dessus plus au moins hispides blanchâtre en dessous *inflorescence* et calice à pilosité double, l'une courte (Figure 01) et l'autre constituée par de long poils dressés glanduleux au sommet, *inflorescence* plus longue (ADLI et Yousfi, 2001).



Figure02 : Aspect morphologique de *Rosmarinus tournefortii*

I.3. Systématique de *Rosmarinus tournefortii*

La classification complète du genre n'a été terminée définitivement qu'au début du **xx^{ème}** siècle. La classification botanique de *Rosmarinus tournefortii* de Noé (**Quezel et Santa.(1963).**) est établie comme suit :

Règne : plantae

Embranchement : Spermaphytes

Classe : Angiospermes

Sous- classe : Gamopétales

Ordre : Lamiales

Famille : Lamiacée

Genre :Rosmarinus

Espèce : *RosmarinusTournefortii de Noé(1934)*

I.4. Aire de répartition

Il est réparti dans toute l'Algérie sauf dans les hauts plateaux Algérois et Oranais son existence est rare.

I.5.Propriétés thérapeutiques et emplois

Cette plante possède de nombreuses vertus phytothérapeutiques, mais c'est aussi une herbe condimentaire et une plante mellifère, ainsi qu'un produit fréquemment utilisé en parfumerie (**Mazoyes et al. 2002**).

Chapitre I : Généralités sur *Rosmarinus tournefortii* de Noé

A Boussaâda, le décocté de la partie aérienne est utilisé pour le traitement de douleur abdominale (**Shaker et al. 1999**).

A Djelfa, le décocté des feuilles est prescrit pour l'hypotension artérielle cependant, sa poudre végétale est utilisée pour traiter la diarrhée (**Adli et Yousfi, 2001**).

Le romarin a aussi des propriétés sur les fonctions digestives, il les facilite, en particulier l'activité de la vésicule biliaire, c'est aussi un anti spasmodique et il a des propriétés stimulant le système nerveux. Autrefois il a été utilisé en compresse contre les rhumatismes (**Fabrice, 2009**).

Il est aussi un excellent stimulant cérébrale , le Romarin stimule la circulation cérébrale, améliorant la concentration et la mémoire .Il soulage également les migraines. Il favorise la pousse des cheveux en stimulant l'irrigation du cuir chevelu.

L'huile essentielle de Romarin est largement utilisée comme composant aromatique dans l'industrie des cosmétiques (savon, parfums, crèmes...), mais aussi dans l'industrie alimentaire (boissons alcoolisées, desserts, bonbons...) (**Moro Buronzo, 2008**).

Chapitre II : Généralités sur les huiles essentielles

II.1. Historique

De tout temps, le règne végétal a offert à l'homme des ressources naturelles à son alimentation et à sa santé.

Déjà, en Chine, l'Empereur Chennoug (2800av.j-c) medecin érudit, consigne son savoir relatif aux plantes médicinales dans un livre, le penTs'ao, qui recense plus de 1000 plantes médicinales utiles (**Lardy et Haberkorn, 2007**).

Il semblait que ce soit les Egyptiens, dont l'histoire remonte à plus de 4000 ans qui furent les premiers à tirer parti du règne végétal dans un souci esthétique et spirituel.

Plus tard la civilisation arabe dont Bagdad, Bassora et Damas étaient les principaux centres commerciaux, développa le commerce des épices et des aromates et donna une grande impulsion à l'art de distillation. L'alambic est incontestablement associé à Avicenne (930-1037), tout comme le Giovannil-BaptistaDellaporta (1540-1615), dans son célèbre ouvrage « De destillatione » parut en 1567, mentionne les connaissances avancées des arabes dans le domaine de la distillation ; Hermann Boerhave (1668-1738) fut l'un des premiers à décrire les huiles essentielles d'un point de vue chimique (**Lucchesi, 2005**).

Il a fallu attendre le XX^{ème} siècle pour que les scientifiques commencent à s'y intéresser. En 1928, René- Maurice Gatte fossé chimiste Français publia un ouvrage « Aromathérapie » décrivant la relation entre la structure biochimique et l'huile essentielle et son activité antimicrobienne.

En 1929, Sevelinge un pharmacien en France, étudia les huiles essentielles en médecine vétérinaire et confirma le potentiel antimicrobien élevé de ces substances aromatiques.

En 1975, Franchomme en France, aromatologue a mis en évidence l'importance du chémotype (**Fouché et al., 2000**).

Il existe aujourd'hui approximativement 3000 huiles dont environ 300 sont réellement commercialisées, destinés 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. Depuis deux décennies, des études ont été menées sur le développement de nouvelles

Chapitre II : Généralités sur les huiles essentielles

applications et l'exploitation des propriétés naturelles des huiles essentielles dans différents domaines (Zhiri, 2006).

II.2. Définition

Une huile essentielle peut être un ensemble de molécules pour un chimiste, un arôme pour un parfumeur ou encore la quintessence ou l'esprit d'un végétal pour un alchimiste. Dans la réalité, une huile essentielle est l'ensemble de tout cela, car il s'agit d'un produit parfumé et volatil, composé de molécules sécrétées par certains arbres et certaines plantes qui lui confèrent un parfum spécifique. Le terme « volatil » s'explique par le fait que les huiles essentielles s'évaporent très rapidement. C'est pourquoi il est nécessaire de les conserver correctement afin qu'elles gardent intacts leurs principes actifs (Moro Buronzo, 2008).

En général, les principes aromatiques des plantes sont des gouttes minuscules qui se forment dans les chloroplastes des feuilles, c'est-à-dire les organites dans lesquels s'effectue la photosynthèse. Elles se combinent par la suite avec du glucose et sont transportées dans toutes les parties de la plante. Une huile essentielle est donc une sécrétion naturelle qui s'effectue dans une partie du végétal : la feuille, l'écorce ou la fleur (Cheynier et Sami-Manchado, 2006).

II.3. Localisation et lieu de synthèse

Les huiles essentielles n'ont pas une présence générale chez les végétaux. Environ 1% des espèces élaborent des essences. Certaines familles se caractérisent par un grand nombre d'espèces qu'elles regroupent en particulier dans les familles : Myrtaceae, Lauraceae, Lamiaceae, Asteraceae, Apocynaceae, Cupressaceae, Poaceae, Zingiberaceae, Piperaceae (Mohammedi, 2006).

La synthèse et l'accumulation des huiles essentielles sont généralement associées à la présence de structures histologiques spécialisées, souvent localisées sur ou à proximité de la surface de la plante, les poils glandulaires épidermiques rencontrés souvent chez les Labiaceae, Geraniaceae et Rutaceae, ils produisent les essences dites superficielles. Les organes sécréteurs sous-cutanés comprenant les cellules et les poches sécrétrices qui sont généralement disséminées au sein du tissu végétal chez les Myrtaceae, Aurantaceae, ainsi que les canaux sécréteurs chez les Combustelliferae, Apiaceae ou Asteraceae. Les essences dans les plantes peuvent être stockées dans divers organes : fleurs (Origan), feuilles (citronnelle, Eucalyptus), écorces (cannelier),

Chapitre II : Généralités sur les huiles essentielles

bois (bois de rose, santal), racines (vétiver), rhizomes (acore, gingembre) sève (encens, myrte), bourgeons (pin), fruit (badiane) ou graines (carvi).quantitativement, les teneurs en huiles essentielles sont extrêmement faibles (**Bruneton, 1999**).

II.4.Classification des huiles essentielles

Selon la fonction du constituant prédominant, **Le Laurant (1994)**, classe les HE en trois catégories :

- HE hydrocarbonées riches en terpènes (Pin, Citron : 90% en limonène).
- HE oxygénés riches en alcools et esters, (roses : 50% en géraniol, Thym : \geq 30% en Thymol, Coriandre : 70 à 80% en linalol).
- HE sulfurées (Conifères).

II.5. la composition chimique des huiles essentielles

Les propriétés des HE proviennent de leur composition chimique, les composés qui les constituent, peuvent être classés en deux groupes distincts, ayant chacun des caractéristiques spécifiques.

a- Les terpènes et leurs dérivés : les terpénoïdes

Selon **Lucchi et al (2004)**, Ce sont des hydrocarbures cycliques ou acycliques, qui constituent un vaste groupe de métabolites secondaires de structures diverses, importantes dans de nombreuse interaction,biotiques.

Ce sont des polymères formés par la réunion d'unité Isoprènes à 5 carbones (C_5H_8), d'où le nom d'isoprenoides sous lequel les terpénoïdes sont parfois désignés .

Les mêmes auteurs déclarent, que l'isoprène est donc le constituant de base de la polymérisation. Selon le nombre d'unité, on distingue :

- Les hemiterpènes : une seule unité isoprène C_5H_8 .
- Les monoterpènes : deux unités en C_{10} (une unité en C_5).
- Les sesquiterpènes : trois unités en C_{15} : $C_{15}H_{24}$.
- Les diterpènes : quatre unités en C_{20} (deux unités en C_{10}) $C_{20}H_{32}$.

Chapitre II : Généralités sur les huiles essentielles

- Les triterpènes : six unités en C5 (trois unités en C10) C₃₀H₄₈.
- Les tetraterpènes : huit unités en C5 (quatre unités en C10) :C₄₀H₅₆.

Les monoterpènes et les sesquiterpènes représentent les terpènes proprement dit, ce sont les principaux composants des HE, les plus volatils à cause de leur masse moléculaire, qui n'est pas trop élevée (**Bellakhdars, 1997**).

b- Les composés aromatiques

Ce sont des dérivés du phenylpropane en C₆ C₃, l'un des constituants des HE, mais beaucoup moins fréquent que les terpènes, se sont souvent des allyles et propenylphénols et parfois des aldéhydes.

Les terpénoïdes et les composés aromatiques, donnent aux HE des propriétés nouvelles, en plus de celles spécifiques à chaque constituant pris séparément (**Lucchi et al(2004)**)

c- Les composés d'origines diverses

Compte tenu de leur mode de préparation, les HE peuvent renfermer divers composés aliphatiques : alcools (Menthol, Géraniol), (Citronellal, géraniol), ester (Acétates de menthyle, Acétates de citronellyle), cétones (Camphre, Menthone), éthers (Cinéole, Eucalyptol), phénols comme, Thymol et Carvacrol(**Bruneton, 1993**).

II.6. Le rôle des huiles essentielles

Elles ont des fonctions multiples dans la nature. En effet, expérimentalement, il a été établi qu'elles interviennent dans les interactions «végétaux-animaux» où elles constituent un moyen de communication appelé langage chimique (**Bruneton, 1997**).

En raison de leur structure chimique unique, les huiles essentielles ont la capacité de pénétrer les parois cellulaires et de transporter l'oxygène, les nutriments et d'autres composés biochimiques vitaux, jusqu'à l'intérieur de chaque cellule. Elles contiennent de puissants composés biochimiques qui donnent aux plantes la capacité de croître, de réparer les dommages à leur structure.

Perombelon et al, (1989)., ajoutent que les huiles essentielles d'agrumes protègent les fruits contre les proliférations et les attaques d'insectes.

Les huiles essentielles sont utiles et efficaces, dans de nombreux aspects de la vie quotidienne, elles ont des fonctions très variées depuis très longtemps.

Les huiles essentielles ont une toxicité aiguë, une action répulsive, une inhibition de l'alimentation et un effet nocif sur le système de reproduction des insectes. Les

Chapitre II : Généralités sur les huiles essentielles

métabolites issus des plantes sont récemment utilisés, comme de nouveaux pesticides synthétiques comme la toxaphène (insecticide et herbicide) (**Bruneton, 1993**).

Les constituants volatils des monoterpènes qui sont alcool, linalool, aldéhydes Acide carboxylique, d- limonène, b-myrcène. α - terpinéol, ces substances ont une action toxique sur la mouche domestique, la blatte, le charançon du riz (**Prates, 1998**).

La fonction des huiles essentielles demeure le plus souvent obscure. Il est toutefois vraisemblable, qu'elles ont un rôle dans le domaine des interactions végétales (comme agents inhibiteurs de germination) et aussi dans les interactions végétal-animal: protection contre les prédateurs ; comme les insectes et les champignons et l'attraction des pollinisateurs (**Bruneton, 1993**).

Selon **Bakkali (2008)**, les huiles essentielles peuvent avoir plusieurs effets « utiles » pour la plante : repousser ou au contraire attirer les insectes pour favoriser la pollinisation, comme source énergétique, facilitant certaines réactions chimiques, permettant de conserver l'humidité des plantes désertiques, réduction de la compétition des espèces de la plante par inhibition chimique de la germination des graines, par protection contre la flore microbienne infectieuse, action répulsive sur les prédateurs par goût et effets défavorables.

II.7. Technique d'extraction des huiles essentielles

Il existe plusieurs techniques d'extraction des produits de haute valeur ajoutée présents dans les plantes. Ces techniques peuvent être dites conventionnelles (utilisées depuis longtemps) et nouvelles (développées plus récemment) (**Luque de castro et Garcia-Ayuso, 1998**).

Parmi les techniques conventionnelles, on trouve l'entraînement à la vapeur (l'hydrodistillation) (**Dastmalchi et al., 2005**) et l'extraction assistée par sonication (**Caniova et Brandsteterova, 2001**).

Dans la catégorie « techniques nouvelles » on peut citer l'extraction assistée par microondes (MicrowaveAssistedExtraction) (**Reighard et Olesik, 2006**), et l'extraction accélérée par solvants (AcceleratedsolventExtraction) (**Wang et Waller, 2006**), et l'extraction avec fluides supercritiques (**Carvalho et al, 2005**).

II.7.1.L'hydrodistillation

Elle consiste à immerger la biomasse végétale dans un alambic rempli d'eau, que l'on porte ensuite à l'ébullition. La vapeur d'eau et l'essence libérée par le matériel végétal forment un mélange non miscible (figure 1.1). A cause de l'eau, de l'acidité et de la température du milieu, il peut se produire des réactions d'hydrolyse, de racémisation et d'oxydation qui peuvent très sensiblement conduire à une dénaturation des HE. (Bruneton , 1993)

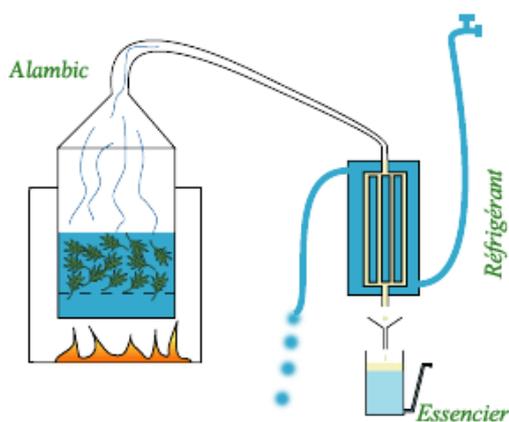


Figure 3 : l'extraction d'HE par hydrodistillation

II.7.2. Entraînement à la vapeur d'eau :

L'entraînement à la vapeur (hydrodistillation) est une technique largement utilisée pour l'extraction des huiles essentielles. L'avantage de cette technique réside en l'abaissement de température de distillation ; les composés sont donc entraînés à des températures beaucoup plus basses que leur température d'ébullition, ce qui évite leur décomposition (Carnat *et al.*, 1998).

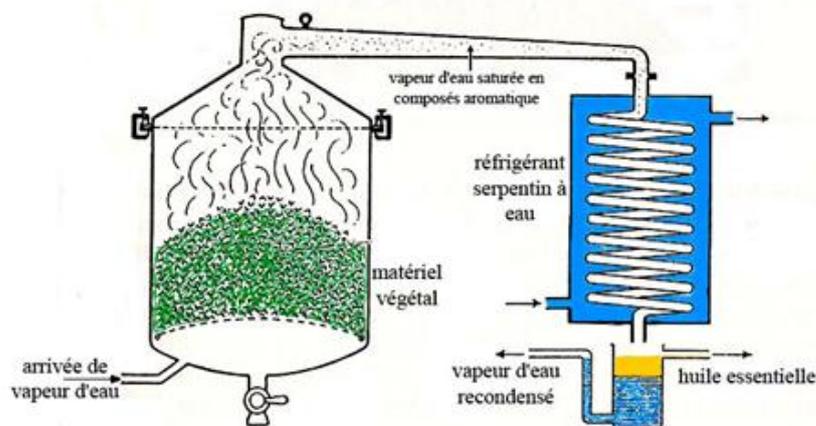


Figure 4 : Extraction d'HE par entraînement à la vapeur d'eau

II.7.3. Le Soxhlet

Le soxhlet est une méthode pour l'extraction solide-liquide. Les avantages du soxhlet sont les suivants : l'échantillon entre rapidement en contact avec une portion fraîche de solvant, ce qui aide à déplacer l'équilibre de transfert vers le solvant. Cette méthode ne nécessite pas de filtration après extraction. Le soxhlet est indépendant de la matrice végétale. Les inconvénients les plus significatifs de cette méthode, par comparaison avec les autres techniques conventionnelles sont : La durée importante d'extraction et la grande quantité de solvant consommé, ce qui conduit non seulement à des pertes économiques mais pose aussi des problèmes sur le plan environnemental. Les échantillon étant portés à hautes températures pendant une période relativement longue, le risque de thermodestruction de certains composés n'est pas à négliger si la matière végétale contient des composés thermolabiles (**Wang et Waller, 2006**)

II.7.4. Extraction en mode Bath

L'avantage majeur de l'extraction en mode bath par agitation devant le soxhlet est la possibilité de travailler facilement avec des mélanges de solvants (par exemple divers proportions alcool-eau) et de contrôler la température d'extraction, en évitant le risque de destruction des composés thermolabiles. C'est une méthode simple et efficace mais exige des procédures postérieures de filtration et de concentration relativement longues (**Grigonis et .al., 2005**).

II.7.5. Extraction par sonication

L'extraction par sonication est une méthode simple, efficace et peu coûteuse. Ses avantages les plus significatifs sont liés à l'augmentation du rendement d'extraction et une accélération de la cinétique par rapport à une extraction classique. Elle permet de travailler à des températures relativement basses et d'éviter la thermodestruction des composés. Cette technique est facile à mettre en œuvre. Comme le Soxhlet, l'extraction par sonication permet d'utiliser une large gamme de solvant à fin d'obtenir différents composés naturels. Cependant, l'effet de l'extraction par ultrasons sur le rendement et la cinétique d'extraction sont liés à la nature de la matrice végétale. La présence d'une phase dispersée mène à l'atténuation des ondes ultrasonores et les zones actives dans l'extracteur restent à proximité de l'émetteur d'ultrasons (**Wang et Waller, 2006**). Cette méthode ne permet pas de renouveler le solvant pendant le processus. L'étape limitante est la filtration et le rinçage après extraction (**Danielski et al, 2006**).

II.7.6. Extraction assistée par microondes

Elle est également une alternative aux méthodes d'extraction conventionnelles (**Wang et Waller, 2006**). Elle utilise de plus en plus petites quantités de solvant, n'est pas coûteuse (**Reighard et Olesik, 2006**) et considérablement rapide. Cependant, la température opératoire de cette technique est relativement haute (100°C-150°C), ce qui pose des problèmes quand il s'agit de l'extraction d'antioxydants (**Grigonis et al, 2005**). Les autres inconvénients de cette technique sont d'une part le rendement faible lorsque les solutés ou les solvants sont apolaires et d'autre part le besoin de l'étape postérieure de filtration ou de centrifugation pour éliminer le résidu solide de l'extraire. Les températures opératoires élevées peuvent mener à une dégradation des solutés thermolabiles (**Wang et Waller, 2006**).

II.7.7. Extraction avec des fluides supercritiques

L'extraction avec des fluides supercritiques est une méthode très attractive qui mérite une attention particulière. Les avantages de cette méthode devant les méthodes conventionnelles sont basés sur une durée d'extraction plus courte, une sélectivité élevée et la facilité d'éliminer le solvant après l'extraction par simple décomposition (**Danielski et al., 2006**).

II.8. Méthodes de caractérisation chimique des huiles essentielles

II.8.1. Chromatographie en phase gazeuse (CPG)

La séparation et l'identification des constituants volatils d'un extrait présente bien moins d'alternatives que sa préparation. En effet, la CPG est la méthode de référence dans l'analyse des huiles essentielles et des composées organiques volatils (Lehotay *et al.*, 2002) ; elle permet l'analyse de mélanges, qui peuvent être très complexes, de nature et de volatilité très variées (Arpino *et al.*, 1995).

II.8.2. Chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CG/MS)

Le couplage chromatographie en phase gazeuse- spectrométrie de masse est aujourd'hui une des techniques parmi les plus utilisés de la chimie analytique. L'association des techniques fournit un instrument d'analyse particulièrement performant. La principale difficulté rencontrée lors de ce couplage est due à la grande différence de pression. La chromatographie en phase gazeuse se déroule à un niveau de pression plus élevé. Ainsi le couplage CG/MS en mode impact électronique (SM-IE) est la technique la plus utilisée dans le domaine des HE (Lehotay *et al.*, 2002). Le bombardement de substances par un faisceau d'électrons d'énergie de l'ordre de 70 eV provoque leur ionisation et leur fragmentation. Les fragments ioniques positifs forment alors le spectre de masse caractéristique du composé. Les spectres de masse ainsi obtenus sont comparés avec ceux des produits de référence contenus dans les bibliothèques informatisées contenant plusieurs milliers de spectres (Bouchonnet *et Libong*, 2002).

II.9 Activité biologiques

II.9 .1. Activité antimicrobienne

Des milliers de composés produits par les plantes sont impliqués dans la défense .La diversité phytochimique des composés antimicrobiens comprend: les terpenoïdes ,les saponines, les phénols et phenylpropanoïdes, pterocarpanes, stilbenes, alcaloïdes, glucosinolates ,hydrogène cyanure ,terpenoïdes ,indole et aussi les offre élémentaire ,le seul composé inorganique .L'identification des sites et des mécanismes d'action est nécessaire pour comprendre ,si ces composés antimicrobiens sont juste une réponse de l'infection ou ce sont des déterminants de la résistance (Hammer schmidt ,1999).

Chapitre II : Généralités sur les huiles essentielles

II.9.1.1.Méthodes d'évaluation de l'activité antimicrobienne

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

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

a- Aromatogramme

L'aromatogramme est une méthode de mesure in vitro du pouvoir antimicrobien des extraits des végétaux. Cet examen est donc l'équivalent d'un antibiogramme ou les antibiotiques sont remplacés par des huiles essentielles (**Fauchere,1997**).

La technique consiste à utiliser les disques de papier imprégnés des différents produits à tester. Les disques sont déposés à la surface d'une gélose uniformémentensemencée avec une suspension de germes à étudier (Figure). Après incubation, les colonies se développent à la surface de la gélose laissant des zones vierges autour des disques appelées zone d'inhibition. Plus le diamètre de cette zone est grand, plus la souche est sensible à la substance testée, plus il est petit ,plus le germe en question résistant . On peut exprimer cette activité soit en indiquant directement le diameter de la zone d'inhibition en millimeter , soit en traduisant en croix le degree d'activité (**Guerinet Carret, 1999**).

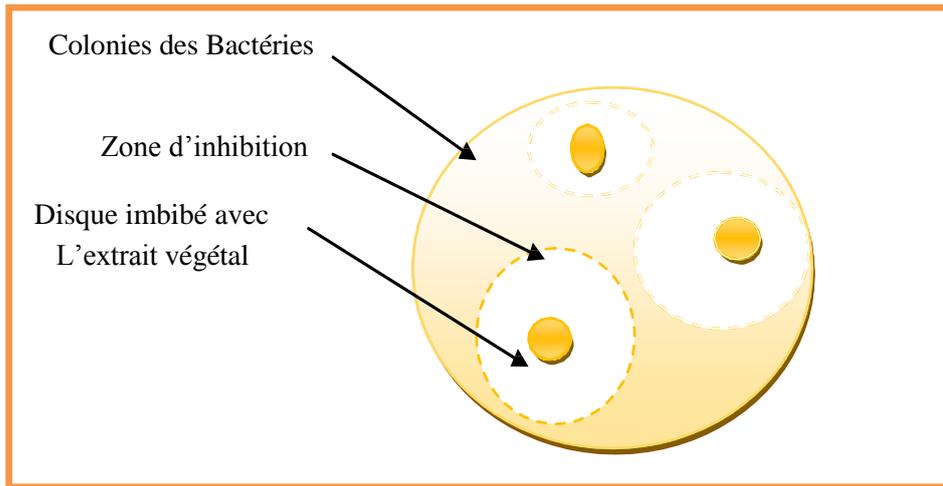


Figure 5: Illustration de la méthode des aromagrammes sur boîte de Petri (Guerinet Carret, 1999).

b-Microatmosphères

Dérivé de la méthode précédente, le protocole des microatmosphères est techniquement proche de celle des aromagrammes. La différence réside principalement dans la position du disque imprégné.

Dans cette technique, le disque imprégné est déposé au centre du couvercle de la boîte de Pétri, renversée pendant la durée de l'expérience. Celui-ci n'est donc plus en contact avec le milieu gélosé (**Figure13**).

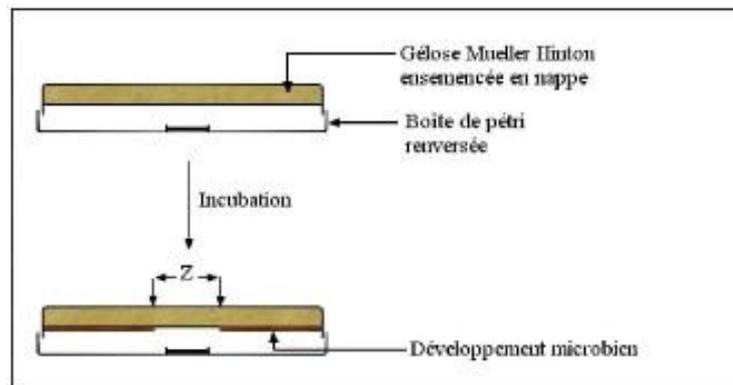


Figure n°6: Illustration de la méthode des micro atmosphères (Zaika,1988) .

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

Chapitre II : Généralités sur les huiles essentielles

C-Méthode de diffusion en puits:

Cette méthode assure une diffusion radiale de l'extrait végétal à partir d'un puit en donnant une zone d'inhibition Claire facilement mesurable. La méthode consiste à découper un trou circulaire dans la gélose et y verser une solution de l'extrait vegetal de concentration connue. L'extrait diffuse radialement en donnant une zone d'inhibition circulaire à la surface de la gélose préalablementensemencée avec la suspension de germes (**Guerinet Carret, 1999**).

D-Méthode de dilution

Les extraits végétaux à tester peuvent également être directement mélangés en concentration comme au milieu de culture, soit solide ou liquide (exige la dispersion homogène par unémulsifiant). Le milieu est ensuite inoculé à un taux déterminé de microorganismes, après incubation, on note la présence ou l'absence de culture. La lecture peut être visuelle ou à l'aide d'un spectrophotomètre, le degré d'inhibition est en rapport avec la turbidité du milieu **Guerinet Carret, 1999**).

II.9.2-La concentration minimale inhibitrice(CMI)

La CMI est définie comme étant la plus faible concentration en HE capable d'induire une réduction de la croissance microbienne de 90 %, donc ne laisse survivre que 10 % de population. (**Skandamis et Mycha.S ,2001**).

Chapitre III : Les microorganismes phytopathogènes étudiés

III.1. Les maladies phytopathogènes d'origine fongique

III.1.1. Généralités sur les champignons phytopathogènes

Les fungi ou mycètes constituent à présent un règne autonome, le cinquième règne ou règne fongique [du latin fungus = champignon]. Le règne des fungi, aussi appelé mycota, constitue un taxon regroupant les organismes appelés plus communément champignons. Environ 90.000 espèces de champignons ont été décrites à ce jour, mais on estime qu'en 2007 moins de 10% des espèces sont connues et identifiées (**Lepoivre ,2003**).

Les champignons supérieurs pathogènes des plantes possèdent une paroi cellulaire chitineuse, ils sont à caractère hétérotrophe ubiquistes possédant un noyau défini avec une membrane nucléaire et des chromosomes associés à des histones (**Lepoivre ,2003**).

Ils sont formés d'un appareil végétatif appelé thalle, sans tissus fonctionnel ni organes différenciés constitué de cellules végétatives allongées et cloisonnées nommées hyphes rencontrés chez les formes les plus évoluées (Siphomycètes qui regroupent les Ascomycètes et les Basidiomycètes) (**Wolf ,1987**).

Ces hyphes associent le plus souvent en mycélium, sorte de feutrage difficile à voir à l'œil nu et plus souvent impossible à identifier (**Deising et al ,1992**). parfois le thalle est un simple tube sans cloisons, on parle alors de structure coenocytique et de siphon qui se rencontre chez les champignons inférieures, (phycomycètes, zygomycètes et trichomycètes)(**Hgch et al,1987**).

III.1.2. Importance économique des maladies fongiques :

Les plantes sont soumises à une multitude de facteurs endogènes et exogènes défavorables, leur morphologie, leur croissance ...etc.

Les champignons phytopathogènes sont des parasites responsables des trois quarts environ des maladies des plantes, Ils constituent également un important problème économique. Des études ont pu 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 et les piétins (**Deacon ,1997**). Les maladies fongiques non contrôlées peuvent entraîner des effets catastrophiques comme la grande famine de pomme de terre en Irlande (1845 – 1849) causée par phytophtora infestant, encore connue à ce jour dans le monde (**Sharma, 1989**).

III.1.3. Cycle parasitaire des champignons phytopathogènes :

Les champignons pathogènes peuvent 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. La contamination de

Chapitre III : Les microorganismes phytopathogènes étudiés

celle-ci se fait le plus souvent par des spores transportées par le vent, l'eau ou encore par les insectes. Le parasite peut aussi subsister à l'état des spores dans certains organes (grains, tubercules, bourgeon) de la plante hôte elle-même en attendant les conditions favorables pour germer (en général une température douce et une humidité importante) (Lepoivre, 2003).

La plante réagit à la pénétration du champignon au niveau des tissus attaqués de diverses manières. La 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 comme la lumière, l'âge de la plante, la nutrition et la présence de blessures. 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 propre à chaque maladie, jaunissement, flétrissement, nécroses générales ou localisées et altération de la croissance des organes de la plante (Deacon, 1997). La lutte contre les champignons phytopathogènes se fait par des pratiques culturelles, mais surtout par des moyens chimiques ou biologiques (Lepoivre, 2003).

III.1.4. Caractéristiques des souches fongiques phytopathogènes

III.1.4.1. *Rhizoctonia solani* :

R. solani est un pathogène tellurique. Les maladies causées par ces champignons portent des noms divers : Rhizoctone noir, maladie des manchettes, variole des tubercules, pied noir, toile ou fonte des semis « crater – rot », « web blight », verse parasitaire, pourriture du collet.

Les Rhizoctonies inféodés aux cultures maraichères sont virulentes et causent des pertes de rendement importantes et coûteuses (Zetter, 2001).

Les champignons pénètrent dans la plante directement à travers la cuticule ou par les stomates. Les attaques sont favorisées par des dégâts préalables causés par des ravageurs comme les nématodes ou par des outils (Zetter, 2001).

Les conditions optimales pour son développement sont des températures du sol variant de 15 – 18°C et une humidité élevée. Lorsque la température dépasse ces valeurs, la pathogénicité de *Rhizoctonia solani* diminue. Le mycélium de *Rhizoctonia solani* (figure n°4) de couleur brunâtre à brun foncé est constitué d'hyphes relativement épais. Il est caractérisé par un aspect réticulé dont les embranchements partent à angles droits (Mahesawari, 2005).

Rhizoctonia solani conserve souvent en concentrations élevées dans les sols sous forme de mycélium dormant ou des sclérotés de 1 – 3mm fixés à des résidus végétaux à partir desquels il se disperse (Zetter, 2001).

Chapitre III : Les microorganismes phytopathogènes étudiés

Les champignons peuvent aussi être transmis d'une parcelle à une autre par des parties de plantes infectées ou contaminées (tubercules) ou par du sol.

Les sclérotés germent lorsque la température dépasse 13 – 15°C pour infecter des racines ou des parties de plantes restant sur le sol, un sclérote peut étendre son mycélium sur une distance atteignant 7 – 10cm jusqu'à trouver une plante hôte (**Blanchard ,1988**).

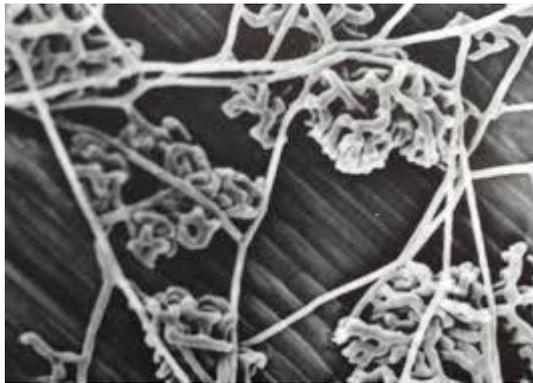


Figure n°7 : Mycélium de *Rhizoctonia solani* (**Blancard, 2009**)

III.1.4.2. Fusarium :

Les fusarioses causées par les espèces du genre *Fusarium* qui présentent actuellement plus de 50 espèces dont les plus communes sont *fusarium oxysporum* et *fusarium solani* (**Lacey ,1985**), chez *fusarium oxysporum* 120 formes spéciales différentes peuvent être rencontrées parmi lesquelles une certaine est basée sur la spécificité d'espèce hôte appartenant à des familles botaniques différentes telle que la fusariose des racines et du collet *fusarium oxysporum* (**Meulmans,1989**).

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

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

Les conidies sont hyalines et variables (**figure n°6**) ,les macroconidies sont fusiformes pluricellulaires , les microconidies sont unicellulaires et ovoides , les conidiophores sont

ramifiés et hyalins (Barnett,1972).

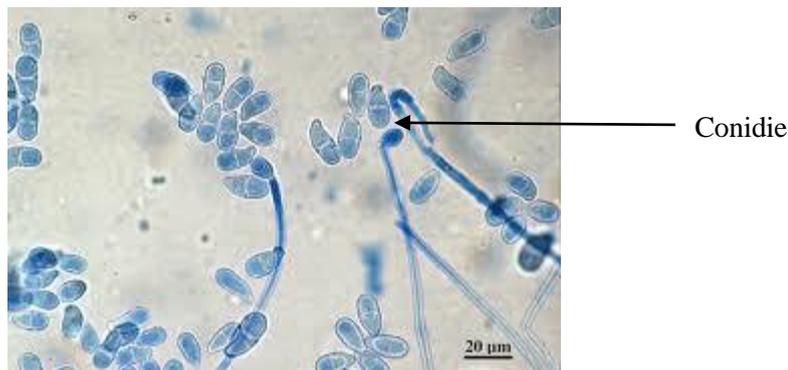


Figure 8:Conidies de *Fusarium* sp. (Barnett, 1972)

III.1.4.3. Sclerotinia :

La forme à gros sclérotos de sclérotinias peut être observé sur concombre de serres, la production de sclérotos peut être abondante sur tiges, aussi bien à l'extérieur que dans la moelle et soncidérable sur les fruits atteints qu'on laisse se décomposer sur le sol (Meulmans,1989).

Certaines espèces ont une phase sexuée (téléomorphe) très discrète où inexistante. Ce sont des parasites nécrotrophes de plante. On y rencontre en particulier le très cosmopolite *Botrytis cinerea* agent de la pourriture grise est une des maladies majeures du concombre sous serre. Il peut provoquer des taches foliaires d'extension rapide devenant grises et sèches sur lesquelles les conidiophores sont visibles. Il envahit facilement les moignons de pétiole ou de pédoncules de fruits et la tige à partir de ces « bases nutritives ». Les lésions sur tiges s'agrandissent et s'approfondissent rapidement conduisant à la mort des plantes. La pourriture grise(figure n°7) de l'extrémité de fruits s'accompagne d'exsudation de gouttelettes transparentes (Messiaen, 1991).

III.1.4.4. Penicillium :

Cette maladie a été signalée au Canada (Ontario), puis en Angleterre en Hollande et en France. Son étiologie et ses symptômes sont analogues à ceux de la pourriture grise, mais les lésions présentent une pourriture plus molle et le velouté mycélien est décrit comme un « gris, vert, bleuâtre »(figure n°8) (Messiaen,1991).



Figure n°9 : Conidies de Pinicellium (Blancard,2009).

III.1.4.5. Cladosporium :

La caladosporium, peut provoquer des dégâts sérieux sur melon et courgette. Les taches foliaires sont d'abord vitreuses, puis nécrotiques de quelques mm de diamètre à bordure jaune. La sporulation sur les feuilles est très faible (Messiaen, 1991).

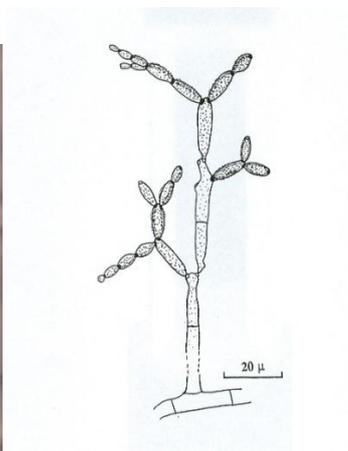


Figure n°10 : Conidies de Cladosporium (Bisset, 2004).

III.1.4.6. Trichoderma :

Le terme Trichoderma a été introduit dans la mycologie en 1794 par Persoon (**Bisset ,2004**).

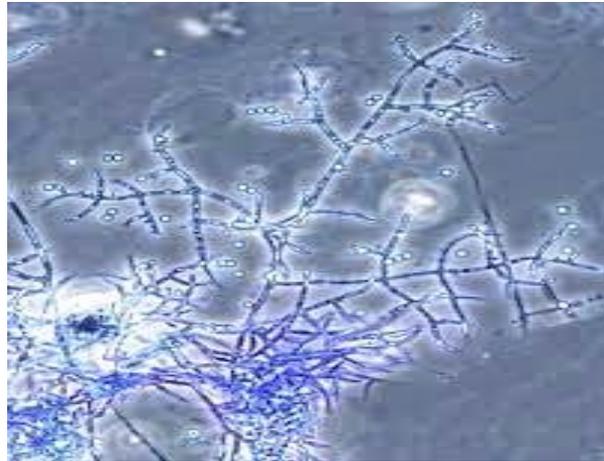


Figure n°11 : Conidiophores de *Trichoderma* sp. (**Kubiceket al., 2003**)

En milieu terrestre leur production d'enzymes, des substances bioactives et leur développement rapide font des *Trichoderma* sp. des agents potentiels en agroalimentaire et une matière de choix pour l'exploitation industrielle (**Prieto et al., 1997**).

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

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

III.1.4.7. Phytophthora

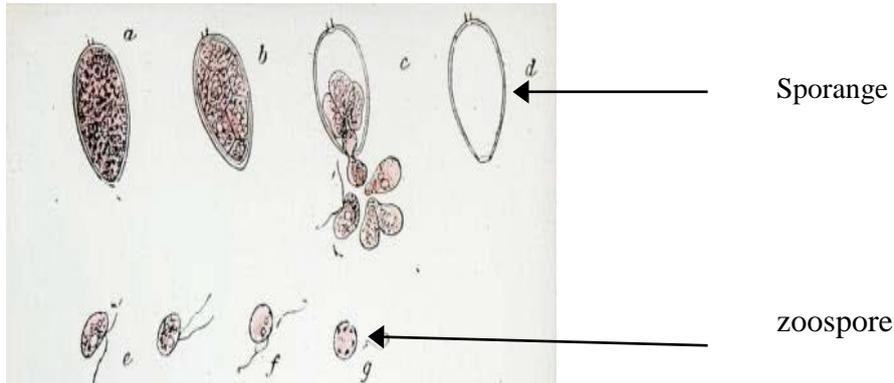


Figure n°12 : Sporanges et zoospores de *Phytophthora* sp. (Jilman, 1986)

Selon l'espèce considérée, une souche peut être pas, peu ou très pathogène et plus ou moins virulente selon les conditions de l'environnement et l'espèce hôte infectée. La gamme d'hôtes peut être étroite et limitée à quelques espèces (*Phytophthora infestans*) ou bien large et englobant plusieurs genres et familles de végétaux différents (*Phytophthora ramorum*, *Phytophthora cinnamomi*).

Les *Phytophthora* sont diploïdes à l'état végétatif et présentent des cycles de reproduction asexuée et sexuée. Le cycle de reproduction asexuée se réalise à l'aide de sporanges et de zoospores ainsi que de chlamydozoospores.

On sait que ces organismes peuvent être transportés par les canaux et cours d'eau.

Phytophthora peut aussi toucher les arbres (semis et racines des hêtres matures par exemple), peut être au cours de co-infections ou d'infections opportunistes (après des gels, sécheresses ou pluies polluées par exemple).

En 2012, après des pluies printanières prolongées, on a constaté en Allemagne du sud, une mortalité importante des pousses basses de l'année, chez de jeunes hêtres (en sous-étage, jusqu'à une hauteur de 2 m) ; les nécroses touchant parfois aussi les tissus de l'année précédente. Une cinquantaine de branches ont été analysées, et un spécimen du genre *Phytophthora* retrouvé dans presque 70 % des cas. Il semblait provenir du sol et remonter vers les parties aériennes (via les éclaboussures de pluie, ou via des spores remontées par des insectes et/ou escargots). Des

Chapitre III : Les microorganismes phytopathogènes étudiés

forestiers craignent que la régénération naturelle et artificielle du hêtre, notamment en sous-étage en soit affectée (par un ralentissement de croissance et affaiblissement des jeunes plants, notamment sur sols très humides ou peu drainants et déjà infesté par *Phytophthora*).

C'est un groupe d'espèces qui co-évolue probablement depuis très longtemps avec les plantes, en s'adaptant par de multiples stratégies à leurs systèmes de défense. Les activités humaines (échanges et transports de produits agricoles, sylvicoles et horticoles) aient pu contribuer à propager certaines souches pathogènes dans le monde (mildiou de la pomme de terre par exemple) ou à les favoriser en dégradant les sols et la diversité des végétaux cultivés. Des souches introduites peuvent attaquer des espèces indigènes.

En 2010, on en connaissait 98 espèces, mais malgré les progrès de la systématique moléculaire, des confusions sont encore possibles dans la reconnaissance de nouvelles espèces et des difficultés persistent dans l'identification des espèces. Ceci est en partie dû au fait que certaines séquences de la GenBank sont encore mal identifiées (à partir de cultures parfois mal annotées).

Certains sont considérés comme des pathogènes émergents, faisant l'objet de suivis dans certains pays.

III.2. Les maladies phytopathogènes d'origine bactérien

III.2.1. Généralités sur les bactéries phytopathogènes

Actuellement 350 espèces, sous espèces on pathovars ont été dénombrées appartenant à 21 genres, se répartissent dans diverses familles, (Oliveira, 2007) elles sont non sporulées, aérobies ou anaérobies facultatives et appartiennent aussi bien à la sous-division des firmicutes contiens aussi des bactéries phytopathogènes dont l'absence de paroi, les caractères de parasite généralement biotrophe intracellulaire en font des micro-organismes au comportement pathogène particulier (Paulin , 2001).

Les bactéries pénètrent les tissus végétaux par les ouvertures naturelles telles que les stomates, les hydathodes, les néctarthodes, les cicatrices foliaires et les lenticelles (Agrios , 2005). Les bactéries phytopathogènes causent les principales maladies sont réparties chez les principaux genres suivants : *Pseudomonas spp*, *Xanthonomasspp*, *Erwiniaspp*, *Agrobacterium spp*, *Clavibacter spp*, *Ralstonia spp* et *Ponthoea spp*.

Les bactéries produisent des symptômes variés sur les plantes infectées tels que les nécroses, les flétrissements, les pourritures molles et les tumeurs, en utilisant différentes stratégies dans leurs mécanismes d'action selon le mode d'action utilisé, quatre types de bactéries ont pu être

Chapitre III : Les microorganismes phytopathogènes étudiés

classées : les bactéries nécrotrophes ou nécrogènes, les bactéries glaçogènes, les bactéries vasculaires. (Lepoivre, 2003).

III.2.2. Les fonctions requises pour les bactéries phytopathogènes par la colonisation de l'hôte

Si la rencontre d'une bactérie phytopathogène avec une plante fait généralement intervenir un agent vecteur (insectes, nématodes) ou des facteurs physiques (eau d'irrigation, pluie), il n'en demeure pas moins que pour être efficace, l'infection doit ensuite permettre à l'agent pathogène d'atteindre ses sites cibles de pénétration (stomates, blessures naturelles et artificielles et de s'y maintenir afin de permettre la colonisation ultérieure des tissus de la plantes (Boucher, 2001).

La plante constitue pour l'agent phytopathogène une source importante de substrat à l'exploiter pour assurer sa propre croissance. Les bactéries phytopathogènes pour se nourrir et se multiplier aux dépens de la plante utilisent plusieurs mécanismes de pathogénie, à savoir, l'acquisition du fer, les enzymes de dégradation des parois en particulier les enzymes cellulolytiques et pectinolytiques (Boucher, 2001).

III.2.3. Caractéristiques des souches bactériennes Phytopathogènes

III.2.3.1. Le genre Erwinia

Le genre d'Erwinia regroupe les bactéries phytopathogènes gram- anaérobies facultatives en forme de bâtonnets, munies de flagelles péritriches. Ce genre fait partie de la famille des Entérobactériacées. Certaines espèces du genre Erwinia sont responsables d'importantes maladies des plantes.

Les premiers groupes « carotovora » associes les espèces du genre Erwinia qui possèdent de forte activités pectolytiques et qui induisent chez les plantes infectées une dégradation de la structure des tissus (macération) conduisant à des symptômes de pourriture humide notamment au niveau des organes de réserves. Erwinia amylovora agent de « feu bactérien » chez la plus part des espèces des pomoideae, les hôtes les plus important de point de vue économique soit : le poirier et le pommier (Semal, 1989).

III.2.3.2. Le genre pseudomonas

Les pseudomonas appartiennent à la famille des pseudomonadaceae dont les représentants possèdent une forme en bâtonnet et des flagelles polaires. Ils sont catalase positif gram- et leurs

Chapitre III : Les microorganismes phytopathogènes étudiés

métabolismes respiratoires est aérobique strict, Les espèces phytopathogènes de pseudomonas sont réparties en deux groupes principaux sur base de leurs propriétés chimiques (**Semal,1989**).

L'espèce *P.syringae* forme le premier sous- groupe dont les représentants provoquent des nécroses plus ou moins étendues sur les feuilles et les tiges.

Le « feu sauvage » dû à *P.syringae PV tabaci*, est une maladie infectant le tabac et le soja, les nécroses produites sont entourées d'un halo jaune associé à la diffusion d'une toxine par la bactérie pathogène. *P.syringae PV tomato* induit chez la tomate des petites lésions noires sur les feuilles et les fruits (**Semal, 1989**).

Certains autres *pathovars* de *P.syringae* provoquent des tumeurs sur les hôtes qu'ils infectent notamment *P.syringae PV savastoni* qui induit des galles parenchymateuses sur plusieurs espèces d'oleaceae, dont l'olivier. Son mode d'action est associé à la synthèse, par la bactérie d'une hormone végétale : l'acide indole – acétique (**Semal, 1989**).

III.2.3.3. Le genre *Pectobacterium*

Les bactéries de genre *Pectobacterium*, provoquent des symptômes associés à des maladies de la pomme de terre caractérisées par les pourritures aériennes et pourritures molles. Ces maladies ont une forte incidence économique, car elles sont particulièrement nuisibles au rendement et à la qualité de la pomme de terre. Le symptôme le plus typique en végétation est l'apparition de la jambe noire, caractérisée par une pourriture noire plus ou moins humide de la base de la tige, due au développement des bactéries (**Mollina et Harison, 1997**).

Maladie sournoise, la jambe noire peut échapper aux contrôles des filières de certification. Les symptômes typiques de jambe noire sont généralement causés par *Pectobacterium atrosepticum* (*Pca*), qui affectionne un climat frais (20–25 °C) et humide.

Pectobacterium carotovorum carotovorum (*Pcc*) joue un rôle moins important dans l'apparition de la jambe noire dans les climats tempérés bien que les travaux récents d'**Eiss et al. (2008)** ont prouvé que l'infection des tubercules par des souches virulentes de *Pcc* engendre bien une jambe noire.

P. carotovorum ssp. carotovorum est une entérobactérie, gram-, a large spectre d'hôtes, distribuée aussi bien dans les zones tempérées que tropicales (**Salmond, 1994**).

Cette sous-espèce est présente dans l'eau, le sol, sur les insectes et nématodes et à la surface des feuilles. Elle possède un optimum thermique allant de 20 à 30°C (De Boer, 1994)

Les semences et les sols infectés représentent une source importante d'inoculum. La propagation de l'infection au champ est facilitée par les eaux d'irrigation et de pluie, les insectes, les

Chapitre III : Les microorganismes phytopathogènes étudiés

nématodes et la machinerie contaminée par ce pathogène. La dissémination en entrepôt est de son cote assurée par le suintement de tubercules pourris et par les insectes (**Toth et al. 2003**).

III.2.4. Importance économique des bactéries phytopathogènes

Les maladies bactériennes sont responsables de pertes économiques considérables dans plusieurs pays, dépassant 1230 billions de dollar chaque année (**Elmhirst, 2007**). Les semences ou les plantes infectés jouent un rôle important dans la dissémination des maladies aussi bien à l'échelle régionale qu'à l'échelle mondiale. Les échanges de semences et matériel végétal peuvent introduire des maladies dans des pays jusqu'alors indemnes. En plus des pertes directes de produits, l'introduction de maladies de quarantaine peut constituer un facteur limitant les échanges commerciaux entre les pays (**Salouk , 2008**).

Les maladies bactériennes sont moins nombreuses que les infections fongiques et moins pernicieuses et généralisées que les viroses, certaines bactérioses des plantes ont cependant un caractère de gravités et in impact socio-économique (**Paulin, 2001**).

CHAPITRE IV

MATÉRIELS ET MÉTHODES

Chapitre IV : Matériels et méthodes

IV.1 Partie expérimentale

Notre travail a été réalisé pendant une période de 05 mois successifs (février – juin 2014) au niveau du laboratoire de P.F.E de Département de biologie à l'université de Blida 1.

La détermination de la composition chimique des huiles essentielles a été effectuée au Département de chimie industrielle.

IV.2 Matériel végétal

La plante (*Rosmarinus tournefortii*) a été récoltée en mois de janvier 2014. Le lieu de la récolte est situé à environ 200km à l'est d'Alger (Wilaya de Bouira). Son identification a été faite par le laboratoire de botanique de Département d'Agronomie les feuilles et les fleurs ont été séparées de leurs tiges puis séchées à l'ombre dans un endroit sec et aéré. Les plantes séchées sont récupérées dans des sacs propres.

IV.3-Les micro-organismes utilisés

Afin de déterminer le pouvoir antimicrobien de notre huile essentielle, nous avons utilisé des souches microbiennes qui ont été choisies par leurs fréquences élevées à causer des maladies bactériennes et cryptogamiques sur les plantes cultivées,

Les tests ont été réalisés sur quatre souches bactérienne (*Pseudomonas syringae*, *Pseudomonas savastanoi*, *Pectobacterium carotovorum*, *Erwinia amylovora*) toutes les souches sont à (gram-) proviennent du laboratoire de Phytobactériologie de l'INPV El Harrach, ces souches ont été reçues dans des tubes stériles contenant 10ml de gélose de conservation, elles sont conservées à une température de 4°C, elles sont entretenues par repiquage sur gélose nutritive favorable à leur croissance pendant 24h à l'obscurité à 28-30°C.

Les sept champignons utilisés dans nos tests sont fréquemment rencontrés sur les plantes cultivées en Algérie: *Sclerotinia* sp., *Fusarium* sp., *Phytophthora* sp., *Trichoderma* sp., *Penicillium* sp., *Cladosporium* sp., *Rhizoctonia solani*,, proviennent du laboratoire de mycologie du département de Biotechnologie, ils sont cultivés sur un milieu nutritif (PDA).(Annexe) pendant 7 jours à 25°C à l'obscurité.

IV.4. Les milieux de cultures

Les Milieux de cultures utilisés dans nos essais sont :

- Le milieu PDA (pour les champignons) Annexe2. **Johnson et Booth(1983)**
- Le milieu King B (pour les bactéries) Annexe 2. **King et al (1954).**

IV.5.Extraction de l'huile essentielle de *Rosmarinus tournefortii* :

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

L'extraction de l'huile essentielle du *Rosmarinus tournefortii* a été effectuée en utilisant un appareil de type Clevenger (annexe 1).

➤ **Mode opératoire**

Nous avons placé, dans un ballon de 2 litres, 600 ml d'eau déminéralisée et 150 à 200 g du romarin.

Nous avons mis en fonction le réfrigérant en réglant le débit d'eau et le contenu du ballon à chauffer (ébullition douce) pendant 3 à 4 heures.

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

Les huiles essentielles sont récupérées dans de petits flacons en verre, opaques fermés hermétiquement pour les préserver de l'air et de la lumière, et conservées à 4°C.

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

IV.6. Calcul du rendement :

Le rendement en huile essentielle est le rapport entre le poids de l'huile extraite et le poids de la matière sèche (Carré 1953). Le rendement exprimé en pourcentage est calculé par la formule suivante :

$$\text{Rdt HE} = \frac{\text{MHE}}{\text{Mvs}} \times 100$$

Ou :

- R_{dt}HE : Rendement en huile essentielle (%)
- M_{HE} : Masse de l'huile essentielle (g)
- M_{VS} : Masse de la matière végétale sèche (g)

IV.7. Analyses physico-chimiques

IV7.1. Mesure des indices physiques

a- Détermination de la Densité relative (D²⁰₂₀) :

La densité relative (D²⁰₂₀) d'une solution constitue un indice de pureté ou de teneur.

Selon la norme AFNOR(2001) (NEF 75-111), la densité relative à 20°C d'une huile essentielle est le rapport entre la masse d'un certain volume d'huile essentielle à 20°C et la masse d'un certain volume égale d'eau distillée à 20°C, sa formule est :

$$D_{2020} = \frac{M_2 - M_0}{M_1 - M_0}$$

M₀ : masse du pycnomètre

M₁ : masse en gramme d'eau distillée

M₂ : masse en gramme d'huile essentielle

b- Détermination de l'indice de réfraction

L'indice de réfraction est le rapport entre le sinus d'angle d'indice et celui du rayon lumineux de longueur d'onde déterminée.

L'huile essentielle polarise la lumière à droite ou à gauche, selon la norme AFNOR(2001)(NEF 75-112), cet indice est déterminé par la lecture à l'aide d'un réfractomètre en utilisant la lumière diffusée du jour elle est donnée par l'expression :

$$N^a_d = n^a_d + 0,0004 \times (t^a - t)$$

Chapitre IV : Matériels et méthodes

n_d^t : valeur de la nature obtenue à température t' à laquelle la détermination a été effectuée

t' : température à laquelle l'analyse a été effectuée

t : température de référence

Mode opératoire

Le produit est placé à l'aide d'une pipette dans la cellule de mesure jusqu'au trait signalé. Refermer le couvercle et appuyer sur (mesure) au bout de 15 secondes (temps nécessaire pour que l'appareil soit stabilisé à 20°C) (**pharmacopée européenne, 2001**).

C-Détermination de Pouvoir rotatoire

Le pouvoir rotatoire est la propriété que représentent certaines substances de dévier la lumière polarisée. L'angle de rotation optique d'un liquide est l'angle de rotation (α) exprimé en (°C) du plan de polarisation à la longueur d'onde de la raie D du sodium (avec $\lambda = 589,3\text{mm}$) mesurée à 20°C sous une épaisseur de 01 décimètre (**pharmacopée européenne, 2001**).

Mode opératoire

Amener l'échantillon à une température spécifique est induire dans le tube en s'assurant qu'il ne reste aucune bulle d'air interposée. Placé le tube dans le polarimètre et lire l'angle de rotation dextrogyre (+) ou lévogyre (-) de l'échantillon sur l'échelle de l'appareil.

Le pouvoir rotatoire est calculé selon la formule suivante :
$$\alpha_D^{20} = \frac{\alpha}{\rho \cdot P \cdot l}$$

α : angle de rotation en degré lu à $20 \pm 0,5$ °C

P : longueur en décimètre du tube polarimètre

ρ : masse volumique à 20°C en gramme par centimètre cube pour les besoins de la pharmacopée, la masse volumique est remplacée par la densité.

IV.7.2. Mesure des indices chimiques

a-Détermination d'Indice d'acide (I_A):

- **Principe**

L'indice (I_A) est le nombre qui exprime en milligramme la quantité d'hydroxyde de potassium à la neutralisation des acides libres présents dans un gramme de substance.

- **Mode opératoire**

Dissolvez 10g de substance à examiner dans 50ml de mélange égaux d'alcool et d'éther. Le solvant doit être neutralisé au préalable par l'hydroxyde de potassium 0,1M en présence de 0,5 ml de solution phénolphaléine. Après dissolution titrez par l'hydroxyde de potassium 0,1M. Le titrage est terminé par la couleur rose qui persiste pendant au moins 15 secondes (**pharmacopée européenne ,2001**).

$$I_A = 56,1 \times n/m$$

n : volume de KOH 0,1M consommé

m : la masse de la substance à examiner.



Figure n°13 : Différentes étapes de la détermination de l'indice d'acide

b-Miscibilité à l'alcool

L'huile est dite soluble dans un n volume ou plus d'alcool d'un titre donné, si la solution lipidique dans n volume demeure limpide comparée à l'huile essentielle non diluée, après addition progressive de nouvelles quantités d'alcool (avec une température de 20°C) (**pharmacopée européenne 2006**).

c-Détermination de l'Indice de peroxyde

L'indice de peroxyde est le nombre qui exprime en milliéquivalents d'oxygène actif la quantité de peroxyde contenu dans 1000g de substance déterminée par la méthode prescrite ci-dessous :

Dans une fiole conique de 250ml à bouchon rodé, introduisez 5g de la substance ajoutez 30ml d'un mélange de 3 volume d'acide acétique glaciale et 2 volumes de chloroforme (**pharmacopée européenne 2001**).

Chapitre IV : Matériels et méthodes

d-Détermination d'Indice de saponification

Dans une fiole de 250ml de verre borosilicaté et d'un réfrigérant à reflux, introduisez la prise d'essai. Ajoutez 25ml d'hydroxyde de potassium alcoolique 0,5N et quelque bille de verres. Adaptez le réfrigérant et chauffez à reflux pendant 30minutes sauf indication contraire.

Ajoutez 1ml de solution phénolphtaléine titrez immédiatement par l'acide chloroformique 0,5N, (V_1 ml d'acide chlorhydrique 0,5N). Effectuez un essai à blanc dans la même condition (V_2 ml d'acide chlorhydrique 0,5N) (**pharmacopée européenne 2001**).

$$I_s = \frac{28,05 (V_2 - V_1)}{P}$$

I_s : indice de saponification

V_1 : volume en ml d'acide chlorhydrique 0,5M utilisé pour l'essai à blanc

V_2 : volume en ml d'acide chlorhydrique 0,5M utilisé pour la détermination de l'indice

P : la masse en gramme de la prise d'essai.



Figure n°14 : Les différentes étapes de la détermination de l'indice de saponification

e-Détermination d'Indice d'ester :

L'indice d'ester est le nombre qui exprime en milligramme la quantité d'hydroxyde de potassium nécessaire à la saponification des esters présente dans 1g de substance.

Il est calculé à partir de l'indice de saponification (I_S) et de l'indice (I_A) (**pharmacopée européenne 2001**).

$$I_E = I_S - I_A$$

Mode opératoire

on induit une prise d'essai de 2g d'huile dans le ballon puis à l'aide d'une burette, on ajoute 25ml de la solution d'hydroxyde de potassium ainsi que des fragment de pierre ponce.

f-Détermination de taux d'humidité :

Le taux d'humidité est déterminé avec un titreur Karl-Fisher. Un titreur Karl-Fisher est utilisé pour la détermination de la teneur en eau de multiples produits. Il est basé l'oxydation du dioxyde de soufre par l'iode dans une solution d'hydroxyde de méthane (méthanol et une base de type RN) (**pharmacopée européenne 2001**).

Mode opératoire :

On branche le titrimètre automatique Karl-Fisher,

le cylindre de la burette et noter la position de robinet c'est-à-dire tourner le levier vers la droite et choisir la vitesse dv/dt entre 3 et 5

Remplir la burette de gauche de méthanol + la solution auxiliaire et introduire le mélange dans le récipient de titrage qui va être neutralisé avec une temporisation de 20 secondes, par la suite l'échantillon va être agité jusqu'à ce que la pompe « arrêt » s'allume, le point final est éteint, le titrage est terminé. Calculer les résultats à partir du titre et de la pesée.

IV.8. Analyse de la composition chimique de l'huile essentielle par CG/SM

a-Principe

C'est une méthode d'analyse par un chromatographe en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse, CG/SM, Perkin, Elmer de marque Carlus500, qui consiste en la détermination des masse des espèces atomique ou moléculaire, elle donne des informations sur la nature, la composition et la structure des espèces présentes dans l'échantillon analysé et très utile pour les analyses de traces.

b-Mode opératoire

On injecte un volume de 3ml après le réglage de tous les Paramètres de l'appareil de CG/SM ; Mode d'ionisation doit être EI+, le potentiel d'ionisation réglé à 70 électron volt, le gaz vecteur à 0.1ml/min qui prend un temps de scans de 0.2 seconde avec un débit du solvant de 5.9ml/min. Le balayage de scan doit être compris entre 25 et 500 nm, le passage de l'échantillon s'effectue automatiquement dans une colonne de marque Elite-5MS à une température d'injection de 250°C.

Les Banques de données utilisées dans l'identification des composées sont :

- NIST
- WYLEY
- PELEGER

IV.9. Evaluation de l'activité antimicrobienne de l'HE de *Rosmarinus tournefortii*

VI.9.1. Méthode de diffusion en milieu gélosé

a-Principe :

Le principe consiste à estimer l'inhibition de la croissance des microorganismes (bactéries et champignons). Soumis au contact de l'huile essentielle et ceci par méthode de diffusion en milieu gélosé.

Ce test est effectué par dépôt des disques en papier buvard stériles de 9mm imprégnés d'une quantité de 25 µl de l'huile essentielle sur un milieu gélosé préalablement ensemencé par étalement avec une culture microbienne (Chao et al , 2000).

b-Mode opératoire

-Revivification et repiquage des germes

La revivification des souches microbiennes est réalisée par la méthode de stries sur gélose nutritive pour les bactéries et sur milieu PDA (annexe 1) pour les champignons. Les cultures sont incubées à l'étuve à 27 à 28°C, pendant 18 à 24 heures pour les bactéries et pendant 48h à 25°C pour les champignons. Les souches obtenues sont repiquées dans des boîtes de Petri renfermant le milieu KingB (bactéries) et PDA (champignons) puis incubées.

➤ Préparation de l'inoculum

A partir d'une jeune culture de 18 heures pour les bactéries et 48 heures pour les champignons, nous réalisons des suspensions troubles, en prélevant 3 à 5 colonies bien isolées et identiques dans 5ml d'eau physiologique stérile, on agite au vortex pendant quelques seconde. La standardisation de la suspension à 10^6 UFC/ml est réalisée à l'aide d'un spectrophotomètre réglé sur une longueur d'onde de 620nm.

Selon (Marc et al , 2004), on admet une DO comprise entre 0,08 et 0,1 correspond à une concentration de 10^7 à 10^8 germes/ml, la suspension d'inoculum est diluée à 1 /10 dans l'eau distillée stérile pour avoir une concentration de 10^6 germes/ml.

➤ Ensemencement des boîtes de Petri

On trempe un écouvillon stérile dans la suspension d'*Erwinia amylovora* puis on étale sur une boîte de Petri stérile en strie et ainsi pour les suspensions de *pseudomonas savastoni*, *pseudomonas syringae*, et *pectobacterium carotovorum*.

IV.9.2 Etude de l'activité antimicrobienne

Pour évaluer l'activité antimicrobienne des H.Es, nous avons adopté la méthode de diffusion sur milieu gélosé en utilisant des disques stériles en cellulose : appelée aromatogramme. Le principe de la méthode est tiré à partir du titrage des antibiotiques (Benjelali et al ; 1986).

Le principe de la méthode repose sur la diffusion du composé antimicrobien en milieu solide dans une boîte de Petri, avec création d'un gradient de concentration après un certain temps de contact entre le produit et le microorganisme cible. L'effet du produit antimicrobien sur la cible est apprécié par la mesure d'une zone d'inhibition et en fonction du diamètre d'inhibition. La souche sera qualifiée de sensible très sensible, extrêmement sensible ou résistante.

➤ dépôt de disques

Les disques absorbants stériles d'environ 9mm de diamètre sont imprégnés d'huile essentielle puis déposés à l'aide d'une pince stérile à raison de 3 disques par boîte de Petri. Le témoin correspond aux disques imprégnés d'eau distillée.

Chapitre IV : Matériels et méthodes

Les trois disques/boite correspondent à des répétitions. Les boîtes de Petri sont ensuite fermées et laissées diffuser à température ambiante pendant 30 minutes et mises à l'étuve à température de 27 – 28°C pendant 24 à 48 heures pour les bactéries et 27 à 28°C pendant une semaine (figure 16).

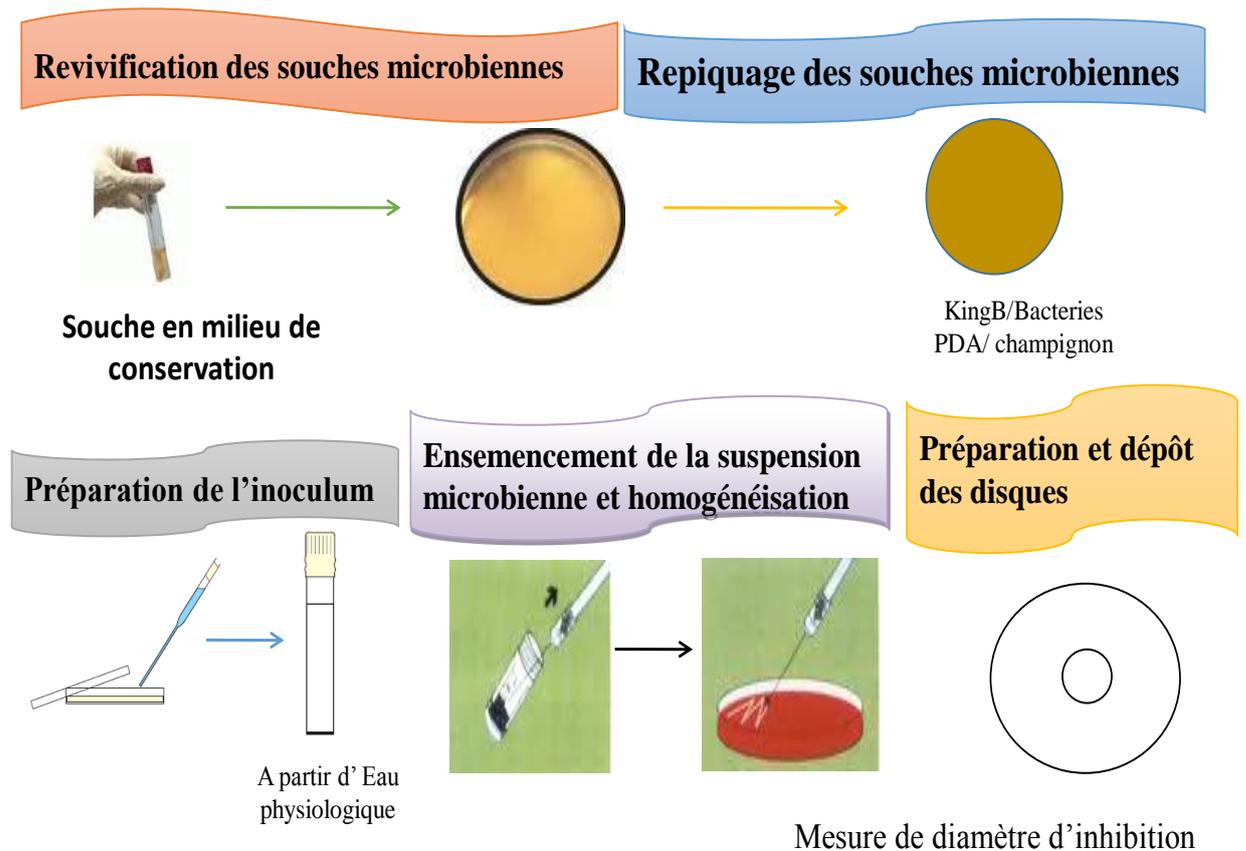


Figure n°15 : les différentes étapes d'évaluation de l'activité antimicrobienne

➤ lecture

-La lecture de l'activité antibactérienne se fait par la mesure du diamètre de la zone d'inhibition autour de chaque disque à l'aide d'un pied de coulisse ou une règle en (mm). Les résultats sont exprimés par le diamètre de la zone d'inhibition et peut être

Chapitre IV : Matériels et méthodes

symbolisé par des signes d'après la sensibilité des souches vis à vis des huiles essentielles. (**Ponce et al .2003**).

-Le diamètre des zones d'inhibition (ZI), nous permet d'estimer la résistance ou la sensibilité des différents germes testés par l'HE, pour classer les germes nous avons utilisé les normes (Tableau2) établies par **Ponce et al. (2003)**.

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

Le résultat de cette activité est exprimé par le diamètre de la zone d'inhibition et peut être symbolisé par des croix (**tableau n °1**).

Tableau n °1 : Les diamètres d'inhibition et leurs degrés de sensibilités **Ponce et al (2003)**.

Diamètre de la zone d'inhibition	Le degré de la résistance
$D < 8\text{mm}$	Souche résistante (-).
$9\text{mm} \leq D \leq 14\text{mm}$	Souche sensible (+).
$15\text{mm} \leq D \leq 19\text{mm}$	Souche très sensible (++).
$D > 20\text{mm}$	Souche extrêmement sensible (+++).

La lecture de l'activité antifongique de l'HE est évaluée par rapport à la croissance radiale exprimée en pourcentage d'inhibition du mycélium par des composés volatiles, en utilisant la formule décrite par **Pandey et coll (1982)** :

$$PI = \frac{DC - DT}{DC} \times 100$$

PI : pourcentage d'inhibition.

Dc : le diamètre moyen de la croissance mycélienne du champignon non traité en mm.

Dt : le diamètre moyen de la croissance mycélienne.

IV.9.3. Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) par la méthode de dilutions en milieu solide

La CMI est définie comme étant la plus faible concentration en HE capable d'induire une réduction de la croissance microbienne de 90 %, donc ne laisse survivre que 10 % de population. (Skandamis et Mycha.S ,2001),

La difficulté rencontrée pour l'utilisation des HEs dans les milieux de culture à base d'eau, c'est leur faible solubilité. Plusieurs substances ont été utilisées pour cette fin : Ethanol ; méthanol, acétone en combinaison avec tween80, DMSO.(Prudent et al .1995).

Nous avons effectué des tests préliminaires sur le choix de l'émulsifiant : le tween 80 et le DMSO. Les résultats que nous avons obtenus ont révélé que le DMSO permet une très bonne dispersion des HEs dans le bouillon « PDA » et « King B » d'une part et l'homogénéité de mélange.

➤ Préparation de la gamme de dilution

-La détermination des CMI a été accomplie uniquement pour les germes microbiens ayant montré une grande sensibilité vis-à-vis de l'action antimicrobienne de l'HE. Les souches résistantes n'ont pas été incluses dans notre recherche.

-La détermination de la CMI est réalisée par la méthode de dilution en milieu gélosé. L'He est d'abord diluée dans du DMSO selon les proportions 1/9 (Emulsifiant/HE) méthode décrite par (Oussou et al 2004).

➤ Ensemencement en milieu solide

Liquéfier le milieu King B à 95°C dans un bain marie, couler aseptiquement à raison de 20 ml de gélose par boîte de pétri et laisser solidifier sur la paillasse.

Transvaser chaque contenu des tubes dans les boîtes contenant la première couche de gélose.

La préparation de l'inoculum a été faite de la même manière que l'aromatogramme. L'ensemencement de la souche microbienne se fait par touche à l'aide d'un écouvillon. L'incubation se fait dans les mêmes conditions décrites auparavant.

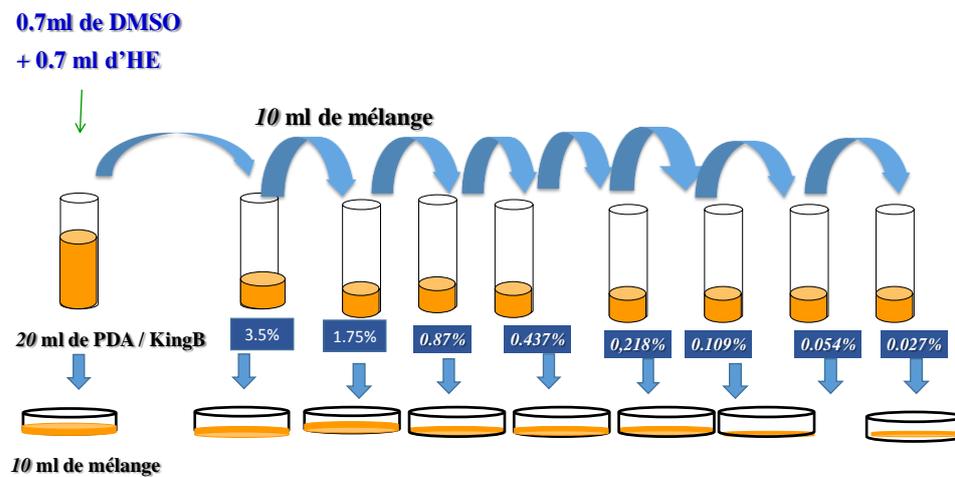


Figure16: Préparation des dilutions

➤ Lecture

La lecture des résultats se fait à l'œil nu en observant s'il ya l'apparition d'une éventuelle colonie microbienne, en comparaison avec une boîte témoin sans HE.

CHAPITRE V

RÉSULTATS ET DISCUSSION

V.1. Rendement en huile essentielle

Le rendement d'extraction de l'huile essentielle obtenu par hydro distillation est montré dans le tableau n° 2.

Tableau 2 : rendement en huile essentielle de la plante

Espèce	Rendement %
<i>Rosmarinus tournefortii</i>	0,53%

L'hydrodistillation de la partie aérienne a été réalisée avec le dispositif de Clevenger. Le rendement moyen en huile essentielle est de 0,53%. Ce rendement en HE concorde avec les normes, d'AFNOR (2002) qui sont égales à 0,5%.



Figure n°17 : Rendement en huile essentielle de *Rosmarinus tournefortii*

En Algérie, le rendement en HE peut varier d'une région à l'autre selon les facteurs pédoclimatiques. Une étude (Azoug, 1997) a rapporté un taux de 0,125% en HE extraite des plantes de *Rosmarinus officinalis* cultivées dans la plaine de Mitidja. Ce taux est très en dessous du rendement obtenu au cours de notre extraction, ceci peut être lié aux influences pédologiques (texture, composition, porosité et PH du sol). Plusieurs études (Lis-Balchin et al., 2002) ont confirmé que les fluctuations observées dans le rendement en HE peuvent être attribuées non seulement à l'origine de la plante mais également à une multitude de facteurs (biotique et abiotique), parmi ces facteurs, nous pouvons citer la température, l'humidité relative, la durée totale d'insolation et le régime des vents.

Chapitre V : Résultats & discussion

V.2. Caractéristiques physico-chimiques

Les constantes physico-chimiques de l'HE ont été déterminées selon des méthodes normalisées.

Les résultats de ces mesures sont regroupés dans le tableau suivant :

Tableau 3: Résultats des analyses physico-chimiques de l'huile essentielle de *Rosmarinus tournefortii*.

Analyses physico-chimiques	H.E de romarin	Normes AFNOR (2001)
Densité à 20°C	0,911	0,907 – 0,914
Indice de réfraction à 20°C	1,469	1,464 – 1,470
Pouvoir rotatoire	-3,388°	-5° à + 10°
Taux d'humidité	0,13%	/
Indice d'acide	1,12	< 5
Indice d'ester	4,512	2 – 15
Indice de peroxyde	10,36	5 – 20
Indice de saponification	5,678	/
Miscibilité à l'éthanol	Vmax = 0,5	1 vol

D'après les résultats obtenus (tableau 3), les indices chimiques de l'huile essentielle étudiée sont conformes aux normes **AFNOR (2000)**.

- **Densité relative**

L'huile essentielle de romarin présente une densité de 0,911, cette valeur est conforme à celle donnée par **AFNOR (2000)**.

- **Indice de réfraction**

L'indice de réfraction des huiles essentielles est généralement élevé. Il est supérieur à celui de l'eau à 20°C = 1,3356. L'indice de réfraction est inversement lié au degré de réfraction

Chapitre V : Résultats & discussion

d'instauration de l'huile de l'huile (**Gacem et al., 1995**), plus l'indice de réfraction est faible plus l'HE est de qualité.

L'indice de réfraction de l'huile essentielle de romarin à 20°C est de 1,469, ce qui est conforme aux normes données par **AFNOR (2002)**, ceci montre sa richesse en composants qui devient la lumière polarisée.

- **Pouvoir rotatoire**

Le pouvoir rotatoire de l'huile de romarin trouvé est de l'ordre de -3,388°.

Ce paramètre physique nous donne un bon renseignement en ce qui concerne les composés, qui sont responsable de la déviation du plan de polarisation (composés chimiques ayant une asymétrie dans leurs compositions chimiques).

- **Taux d'humidité**

Le taux d'humidité dans l'huile essentielle de romarin est de 0,13%, cette valeur est faible, elle traduit la bonne qualité de romarin égale à 1,12%. La valeur trouvée est conforme à celle rapportée par **AFNOR (2002)**.

Cet indice faible prouve que l'huile essentielle est stable et ne provoque pas d'oxydation inquiétante, car l'huile en s'oxydant se dégrade rapidement et provoque une augmentation de l'indice d'acide.

- **L'indice d'ester**

L'indice d'ester de l'HE de romarin est de 4,512, ce résultat est conforme à la norme AFNOR qui préconise une valeur de 2 à 15.

- **Indice de peroxyde**

L'indice de peroxyde de l'huile essentielle de romarin est de l'ordre de 10,36, l'indice varie entre 5 et 20 selon **AFNOR (2002)**.

L'indice de peroxyde renseigne sur la présence des substances anti oxydantes qui s'opposent à la formation des peroxydes (**Mordret et Coustille, 1997**), plus l'indice est bas plus l'huile est fraîche.

- **Indice de saponification**

L'indice de saponification de l'HE de romarin est de 5,678, ce qui implique que l'HE de romarin contient une faible quantité des acides gras à faible poids moléculaire.

L'indice de saponification rend compte de la longueur des chaînes hydrocarbonées des acides gras (plus le poids moléculaire est élevé plus l'indice de saponification est faible (**Bruni, 1994**)).

- **Miscibilité à l'éthanol**

L'HE de romarin est miscible à un volume maximal de 0,5ml de l'éthanol.

Plusieurs études ont démontré que les paramètres physico-chimiques influencés par les conditions édaphiques et climatiques (**Lis-Bachelin et al., 2002**).

La détermination des propriétés physico-chimiques est une étape nécessaire mais demeure non suffisante pour caractériser l'HE. Il sera primordial de déterminer le profil chromatographique de l'HE (**Lis-Bachelin et al., 2002**).

V.3.Résultats de la composition chimique de l'huile essentielle analysée par CG/SM

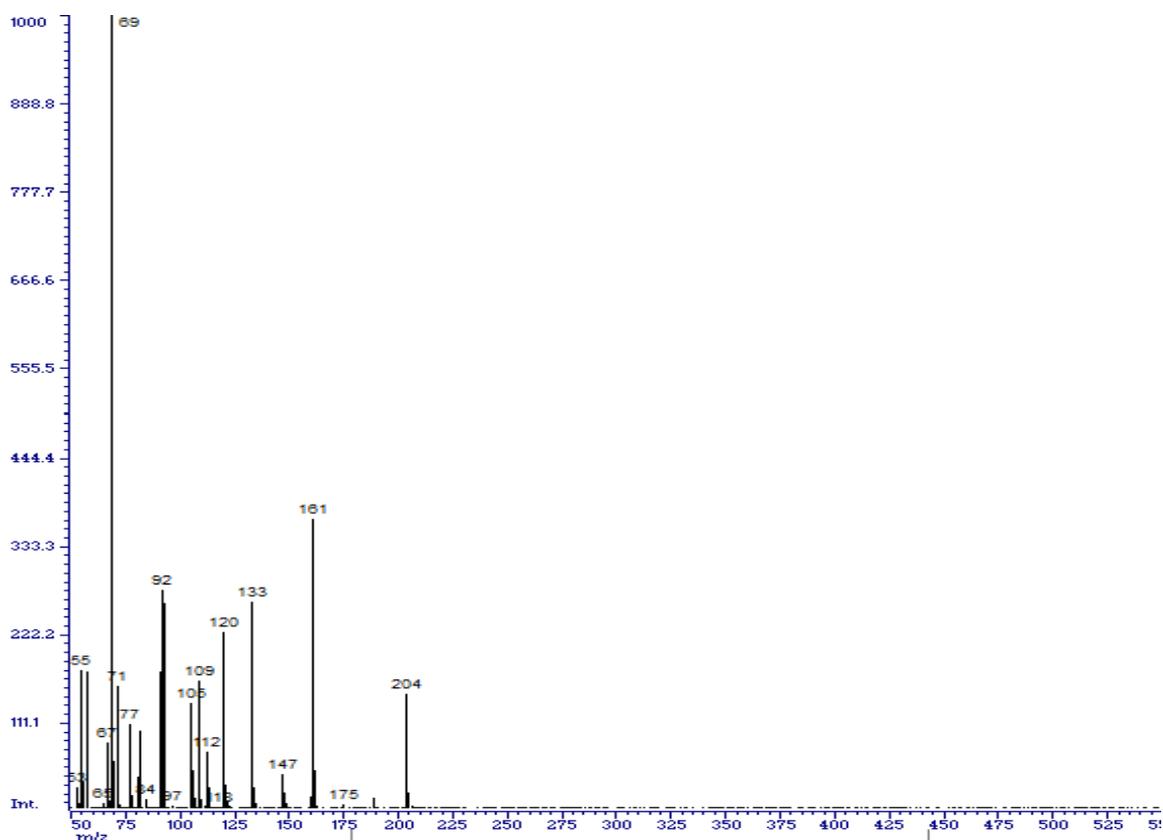


Figure n°18 La composition chimique de l'huile essentielle de *R.tournefortii* analysée par CG/MS

Chapitre V : Résultats & discussion

Les résultats de l'identification de la composition chimique de l'huile essentielle en % de romarin a révéler 369 composants dont 5 sont majoritaires.(Tableau 4).

Tableau 4 : principaux composés chimiques (%) de l'HE de *R tournefortii* analysées par CG/MS.

Composants	Temps de retention	%
Camphène	8,737	18,636
α-pinène	10,117	17,001
Carène	11,563	10 ,132
Camphor	22,063	35,123
Cinéol	24,132	9 ,701
Phellandrène	12,133	1 ,59
a-Terpineol	26,510	0,91
Eucalyptol	13,48	0,37

Les résultats de l'identification qualitative et quantitative des composés chimiques par CG/SM de l'HE *R.tournefortii* présentés dans le tableau n° 4. L'analyse chimique a fait ressortir un nombre déterminé de constituants pour cette huile , la plupart des substances identifiés sont des mono terpène dont le camphre est le composé majoritaire dans la composition de cette huile (35,123%), les autres composés mono terpéniques identifiés pour cette même HE ont des teneurs appréciables comme le camphène (18,636%), le α -pinène (17,001%), et le carène (10,132%), et le 1-8 cinéol (9,701%).

Il existe dans la composition de cette HE, d'autre constituants minoritaires(comme il est indiqué dans le tableau n °4) ; le Phéllandrène(1,59%),le a- Terpeneol(0,91%),et l'Eucalyptol(0,37%) ,et d'autre composés chimiques à des quantités très infimale(voir annex)

Nos résultats sont relativement différents de ceux obtenus par Arland (1997) sur la même espèce dont ils retrouvent l'HE constituées de 37% de camphre, 20% de camphène, 18,20% de α -pinène et 11,40% de carène et 1-8 cinéol, notre étude confirme cette composition mais avec des pourcentages plus au moins différentes.

Chapitre V : Résultats & discussion

Nos résultats concernant le profil chimique de l'HE de *R.tournefortii* concordent avec ceux de **Bendidouche et al (2011)** qui ont montré que les essences de *R.tournefortii* originaire d'Algérie sont caractérisées par des concentrations élevées en camphre, camphène, α -pinène (37% ; 20% ; 18,2%). Il est à noter d'après cette analyse que les composés acycliques comme le 1-8 cinéol sont présents à des concentrations relativement importantes.

Selon **Senatore et al ., (2000)**, les variations rencontrées dans la composition chimique des HEs, du point de vue qualitative et quantitative, peuvent dépendre de l'un ou de la combinaison des facteurs : le patrimoine génétique, l'âge, l'environnement de la plante et la présence de chémotypes.

Il faut noter aussi que le biotope en générale a un impact sur la composition chimique de l'huile essentielle ainsi que la période ou la saison de la récolte.

V.4. Evaluation de l'activité antimicrobienne « in Vitro » de l'HE de *Rosmarinus tournefortii*

L'étude de l'activité d'inhibition de l'huile essentielle du romarin a été effectuée par la méthode des disques. Les résultats des tests effectués permettent de faire la mise en évidence de l'activité antibactérienne et antifongique d'HE du romarin.

Si la souche est sensible, une zone d'inhibition circulaire se forme, c'est-à-dire que le développement des bactéries au niveau de la zone de diffusion de l'échantillon est inactif.

Si la souche est résistante, le diamètre de cette zone d'inhibition est négligeable, c'est-à-dire que les bactéries n'ont pas été inhibées par la diffusion de l'échantillon.

V.4.1 Evaluation de l'activité antifongique de l'huile essentielle de *Rosmarinus tournefortii*

L'étude de l'activité antifongique de l'huile essentielle de *Rosmarinus tournefortii* a été évaluée sur sept souches fongiques.

Les résultats du test de sensibilité microbienne aux huiles essentielles (aromatogramme) sont regroupés dans le **tableau 5**, les valeurs indiquées sont les moyennes de 3 mesures.

Chapitre V : Résultats & discussion

Tableau n °5 : Résultats de l'activité antifongique d'HE de *Rosmarinus tournefortii*

Champignons phytopathogènes	Pourcentage d'inhibition	Sensibilité
<i>Sclerotinia sp.</i>	61%	+++
<i>Fusarium sp.</i>	44,33%	++
<i>Phytophthora sp.</i>	39%	++
<i>Trichoderma sp.</i>	60%	+++
<i>Penicillium sp.</i>	0%	-
<i>Cladosporium sp.</i>	21%	+
<i>Rhizoctonia solani</i>	11%	+

Il est clair d'après le **tableau 5** qu'il y a une forte inhibition de la croissance radiale de la majorité des isolats fongiques par l'huile essentielle dont le Pourcentage d'inhibition le plus important est celui de *Sclerotinia sp* (61%) suivit de *Trichoderma sp* (60%), *Fusarium sp* (44%), *Phytophthora sp* (39%), suivit de *Cladosporium sp* (21%), et *Rhizoctonia sp* sauf pour *Penicillium sp* (0%), ou nous n'avons observé aucune zone d'inhibition autour des disques.

Les résultats de l'activité antifongique « in vitro » d'HE de *R.tournefortii* obtenu à l'aide de la méthode de diffusion sur gélose montrant que l'activité antifongique de l'HEs de *R.tournefortii* est en fonction du champignon cible. Il est avéré qu'aucune zone d'inhibition autour des disques n'a été observé vis-à-vis de *Penicillium sp*, ce champignon possède un potentiel de résistance très élevé contre l'action antifongique de l'HE de *R.tournefortii*.

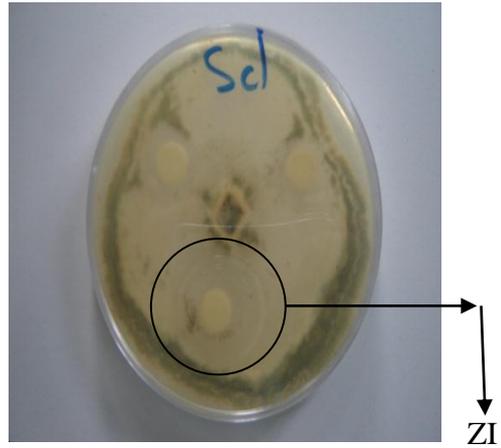
En revanche, l'espèce *Rhizoctonia solani* a manifesté une résistance relative vis-à-vis de l'HE. L'HE a présenté une forte activité antifongique vis-à-vis *Tricoderma sp*, *Cladosporium*, *Phytophthora sp*, *Fusarium sp*, dont les pourcentages d'inhibition sont 60%, respectivement.21%,39%, 44,33%.

Il est a noté que l'activité antifongique la plus élevée a été enregistrée avec *Sclérotiniasp*, avec une valeur de 61%. Donc l'huile essentielle de *R tournefortii* a un effet inhibiteur sur la plupart des champignons testé sauf sur le penicillium, ce qui confirme l'efficacité antimicrobienne de l'HE vis-à-vis de ces champignons phytopathogènes.

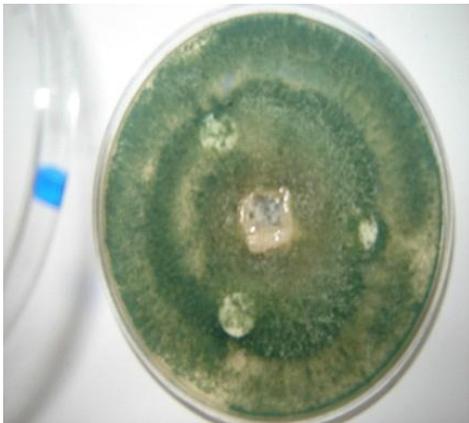
Chapitre V : Résultats & discussion



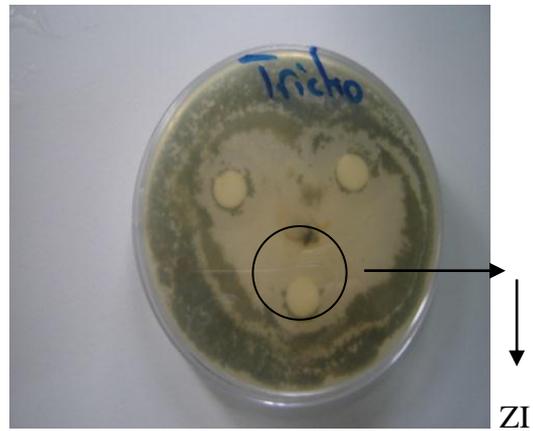
1- *Sclerotiniasp* (témoin)



- *Sclerotiniasp*(huile essentielle)



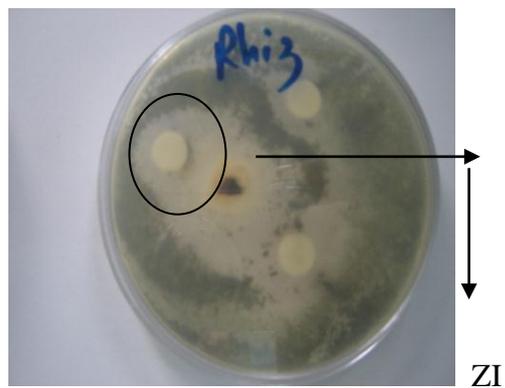
2-*Trichoderma sp*(témoin)



-*Trichoderma sp* (huile essentielle)



3-*Rhizoctonia solani*(témoin)



-*Rhizoctoniasolani*(huile essentielle)

Chapitre V : Résultats & discussion



4-*Phytophthora* sp.(témoin)



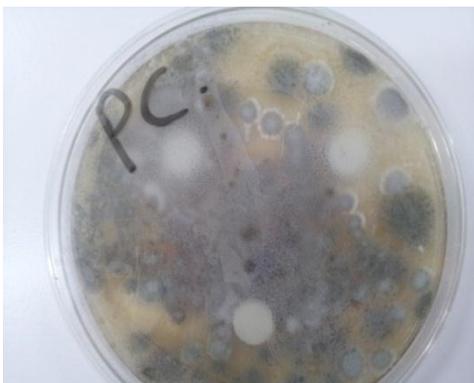
-*Phytophthora* sp (huile essentielle)



5-*Fusarium* sp (témoin)



-*Fusarium* sp (huile essentielle)



6-*Penicillium* sp (témoin)



-*Penicillium* sp (huile essentielle)



7-*Cladosporium* sp. (témoin)



-*Cladosporium* sp. (huile essentielle)

Figure n°19 : Effet d'HE de *R. tournefortii* sur *Sclerotinia sp*, *Trichoderma sp*, *Rhizoctonia solani*, *Fusarium sp*, *Phytophthora sp*, *Penicillium sp*, *Cladosporium sp*

V.4.2 Evaluation de l'activité antibactérienne de l'huile essentielle de *Rosmarinus tournefortii*

Les résultats de l'activité antibactérienne de l'huile essentielle de *Rosmarinus tournefortii* sont présentés sur le **tableau 6** où nous avons mesuré les diamètres des zones d'inhibition en (mm).

Tableau 6 : Résultats de l'activité antibactérienne d'HE de *Rosmarinus tournefortii*

Bactéries phytopathogènes	Diamètre d'inhibition	Sensibilité
<i>Erwinia amylovora</i> (gram-)	36 ±0,53	+++
<i>Pseudomonas syringae</i> (gram-)	19 ±0,33	++
<i>Pseudomonas savastanoi</i> (gram-)	33 ±0,00	+++
<i>Pectobacterium carotovorum</i> (gram-)	16 ±0,00	++

L'huile essentielle de *Rosmarinus tournefortii* pure présente une forte activité sur les 4 souches bactériennes testées ($D \geq 9$). Les diamètres des zones d'inhibition varient de 16 mm à 36 mm (tableau 6).

La sensibilité des bactéries est déterminée selon le diamètre du halo d'inhibition par la méthode de diffusion sur gélose.

Les résultats des diamètres des zones d'inhibition révèlent qu'*Erwinia amylovora* et *Pseudomonas savastanoi* apparaissent extrêmement sensibles vis-à-vis des huiles essentielles de *Rosmarinus tournefortii* testées.

Chapitre V : Résultats & discussion

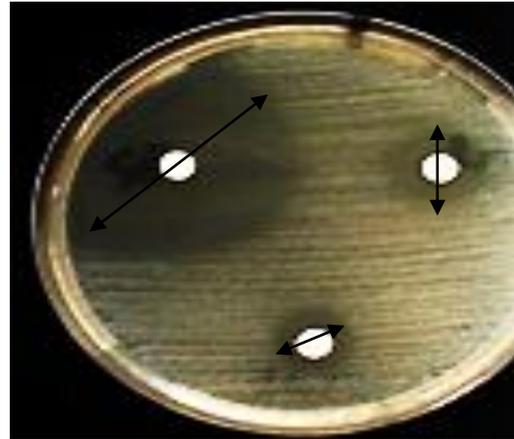
Les souches *Pseudomonas syringae* et *Pectobacterium carotovorum* sont modérément sensible vis-à-vis des huiles essentielles (tableau 6).



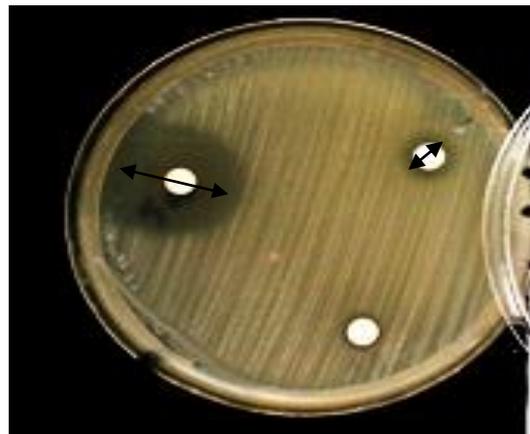
- a -



- b -



- c -



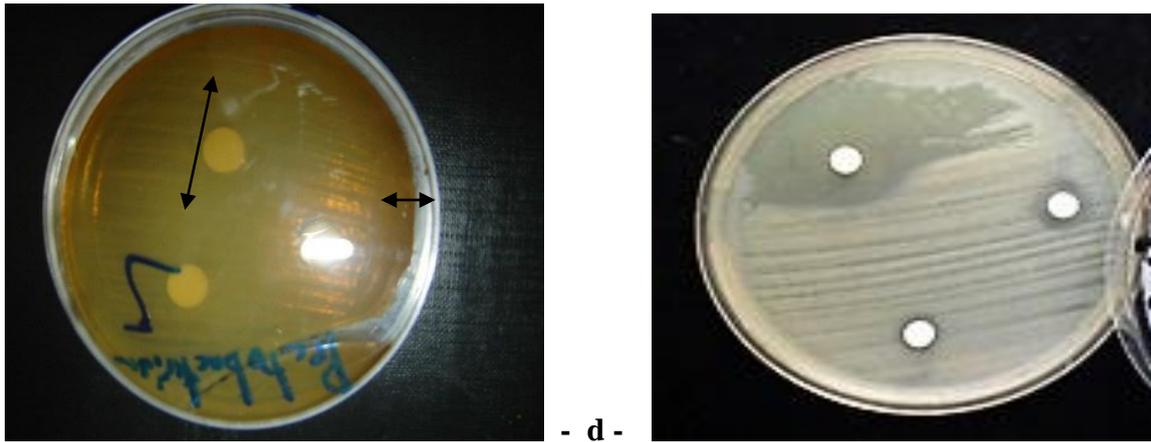


Figure n°20 : Effet d'HE de *R.tournefortii* sur :

a-*Erwinia amylovora* (Gram-),

b-*Pseudomonas savastoni* (Gram-),

c-*Pectobacterium carotovorum* (Gram-)et

d-*Pseudomonas syringae* (Gram-)

Si la souche est sensible, une zone d'inhibition circulaire se forme, c'est-à-dire que le développement des bactéries au niveau de la zone de diffusion de l'échantillon est inactif.

L'étude de l'activité inhibitrice de l'huile essentielle de *R.tournefortii* a été effectuée par la méthode des disques (aromatogramme). Les résultats effectués permettent de faire l'identification de l'activité antibactérienne de notre huile essentielle.

Si la souche est résistante, le diamètre de cette zone d'inhibition est négligeable, d'autre part que les bactéries \ champignons n'ont pas été inhibées par l'huile essentielle diffusée.

Chapitre V : Résultats & discussion

Les résultats ci-dessus concernant l'activité antibactérienne in vitro obtenu à l'aide de la méthode de diffusion sur gélose (aromatogramme) montrent que l'activité antibactérienne de l'huile essentielle de *R.tournefortii* testée est en fonction de la bactérie cible. *Pseudomonas syringae* possède un potentiel d'inhibition modéré et par conséquent l'action antibactérienne de l'HE de *R.tournefortii* est modérément inhibitrice vis-à-vis cette bactérie.

En revanche la souche *pectobactérium carotovorum* a présenté une résistance très faible vis-à-vis de l'HE 16mm, en effet, cette HE a présenté une activité antibactérienne modérée.

Il est à noter que l'activité antibactérienne la plus élevée a été enregistré avec la souche *Erwinia amylovora*

Avec une valeur moyenne de l'auréole d'inhibition de 36,53mm, ces résultats concordent avec des travaux qui ont été menée sur *R.officinalis L.*

Des résultats similaires ont été enregistrés avec d'autre type d'HEs par **Akin et Aktumsek (2009)**, en testant l'HE d'*Eucalyptus camaldulensis*, on a remarqué que *Erwinia amylovora* est 2 fois plus sensible que *Pseudomonas savastoni* et trois fois plus sensible que *Pectobactérium carotovorum* à l'action de l'HE de *R.tournefortii*.

Bendidouche et al., 2011 ont montré que les huiles essentielles de *R.tournefortii* d'Algerie possèdent une activité antibactérienne élevée contre *Escherichia coli* et *staphylococcus aureus*.

D'après **Kalamba et Kunicka (2003)**, la sensibilité d'un microorganisme aux HES dépend des propriétés de l'HE et le microorganisme lui-même. Il est bien comme que les bactéries à gram+ sont plus sensibles aux HES que les bactéries à gram-, plusieurs études testant l'activité inhibitrice de HES confirment ce phénomène.

Selon **Poole(2001)**, la grande résistance des bactéries à Gram- aux HES est liée en partie à la complexité de l'enveloppe cellulaire de ces microorganismes qui contient un double membrane, contrairement à la structure membranaire simple des bactéries à gram+.

Chapitre V : Résultats & discussion

A l'inverse, **Celikel et Kavas (2008)** ont souligné que l'action des HEs volatiles a peu d'influence sur l'inhibition de la croissance des bactéries à Gram – et Gram +.

Cependant, quelques HEs semblent être plus spécifiques, et exercent une importante activité inhibitrice contre les bactéries à Gram+ que sur gram-. Les mécanismes d'action des HEs et leurs sélectivités envers certaines bactéries restent jusqu'à présent mal étudiés.

Les propriétés antibactériennes des composés des HEs sont en partie liées à leurs caractères lipophiles menant à l'accumulation au niveau des parois bactériennes perturbant ainsi le fonctionnement perméabilité des membranes cellulaires, dégradation de la paroi cellulaire, dommage de la membrane cytoplasmique , coagulation du cytoplasme et l'épuisement de force motrice des protons (**Ultee et Smid, 2001**).

Selon **Delaquis et al, (2002)** ont estimé que l'activité antimicrobienne de certaines HEs pourrait être attribuée à la présence des composés mineurs présents à de faibles taux non négligeables tel que carvacrol, myrthénal, géraniol,.... Connus pour exhiber une activité antibactérienne dans les phénomènes de synergie entre les différents constituants qui peuvent être à l'origine d'une prévisibles par les composés majoritaires.

Ainsi, les effets antimicrobiens des HEs ont été expliqués principalement par la présence des terpènes, les hydroxyles des groupements phénoliques sont capable de se liés aux sites actifs des enzymes cibles par des liaisons d'hydrogène. Les alcools terpéniques sont connus par leur fort pouvoir antibactérien, dû à leur solubilité sans l'eau, ce qui leur confère une haute habilité à pénétrer les parois des cellules bactériennes (**Belletti et al, 2004**).

Inouye et al, (2001), ont rapporté que les alcools aliphatiques possèdent une activité modérée sur plusieurs bactéries. La position de groupe fonctionnel de l'alcool s'est avérée importante dans l'activité antibactérienne, d'autre part, les esters peuvent aussi participer à l'effet antimicrobien tel que l'acétate de géranyl, acétate de néryl, et α -terpenyl qui possèdent une grande activité antibactérienne. Cependant, la comparaison de l'efficacité des HEs à travers les différentes publications reste difficile à réaliser, et cette difficulté réside au niveau des différents paramètres externes incontrôlables. Donc l'activité antimicrobienne d'une HE peuvent changer par sa composition chimique, par

Chapitre V : Résultats & discussion

les génotypes, aux méthodes employées pour évaluer l'activité antimicrobienne (la technique de diffusion par disque sur agar ou par méthode de dilution).

Les résultats obtenus par chacune de ces deux méthodes peuvent être différents selon le choix et les conditions physiologiques des microorganismes. La période de l'exposition du microorganisme à l'HE, aux doses d'HE utilisées, le choix de l'émulsifiant pour solubiliser les HEs ceux-ci autant de facteurs pouvant expliquer parfois des résultats contradictoires des différentes études.

V.4.3/Résultats de la concentration minimale inhibitrice (CMI)

V.4.3/Résultats de la (CMI) des bactéries testées

L'huile essentielle de *R.tournefortii* a révélé une activité antibactérienne intéressante. Les CMI ont été calculées uniquement pour les souches qui ont préalablement présentées une sensibilité importante vis-à-vis de notre HE, cependant, d'après les résultats d'aromatogrammes *Erwinia amylovora* et *Pseudomonas savastoni* sont les souches les plus sensibles dans l'ensemble des bactéries testées.

Tableau n°7 : Détermination de la concentration minimale inhibitrice de l'HE du *R.tournefortii* sur les bactéries testées.

Concentration en HE(%)	3.5%	1.75%	0.875%	0.437%	0.218%	0.109%	0.054%	0.027%
Bactérie								
<i>Pseudomonas savastoni</i>	-	-	+	+	+	+	+	+
<i>Erwinia amylovora</i>	-	-	-	+	+	+	+	+

- : Inhibition + : Croissance

D'après les résultats cités dans la littérature scientifique, et d'après le tableau n°7 nous remarquons que l'HE du romarin inhibe l'activité d'*Erwinia amylovora* à une

Chapitre V : Résultats & discussion

concentration de 3,5 % à 0,875%. Et l'activité de *Pseudomonas savastoni* à une concentration de 3.5% à 1,75%. Les résultats obtenus révèlent que la bactérie *Erwinia amylovora* qui a été la plus sensible, a présenté la CMI la plus faible égale à 0,875%.

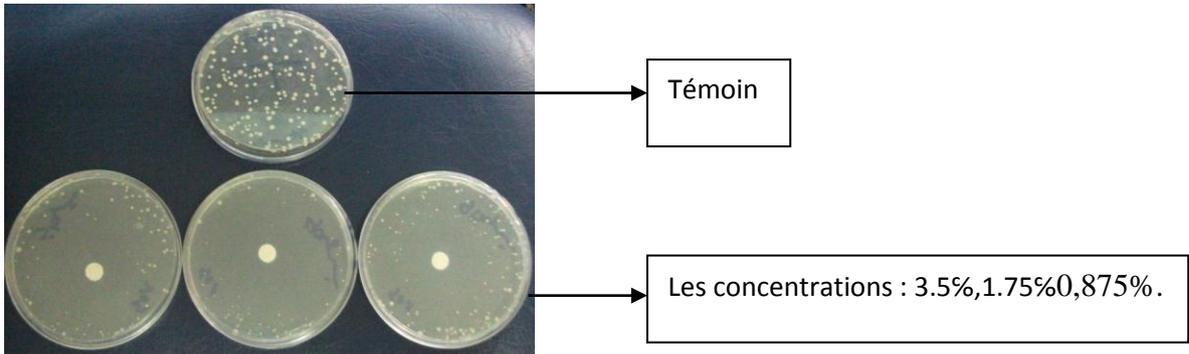


Figure n°21 : CMI d'*Erwinia amylovora*

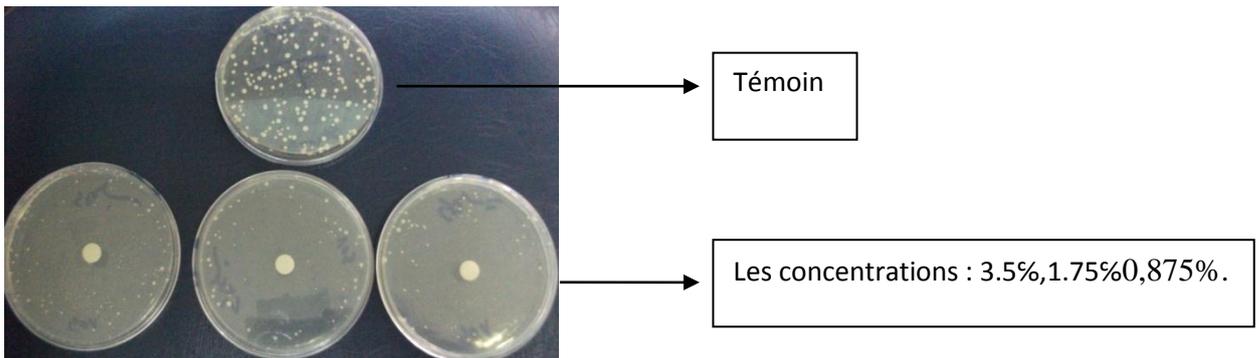


Figure n°22 : CMI de *Pseudomonas savastoni*

L'huile essentielle de *R.tournefortii* a révélé une activité antifongique intéressante. Les CMI ont été calculés uniquement pour les souches qui ont préalablement présenté une sensibilité importante vis-à-vis de l'HE, cependant, D'après les résultats d'aromatogrammes *Trichoderma sp*, *Sclerotinia sp*, *Rhizoctonia solani*, *Phytophthora sp* sont les souches les plus sensibles.

Chapitre V : Résultats & discussion

Tableau n°8 : Détermination de la CMI de l'HE du *R.tournefortii* sur les souches fongiques.

Concentration en HE(%) champignons	3.5%	1.75%	0.875%	0.437%	0.218%	0.109%	0.054%	0.027%
<i>Phytophthora sp</i>	-	-	+	+	+	+	+	+
<i>Trichoderma sp</i>	-	-	-	+	+	+	+	+
<i>Rhizoctonia solani</i>	-	-	+	+	+	+	+	+
<i>Sclérotiniasp</i>	-	-	-	+	+	+	+	+

- : Inhibition + : croissance

Les résultats obtenus de la CMI révèlent que la bactérie *Erwinia amylovora*, qui a été la plus sensible, a présenté la CMI la plus faible égale à 0,875%.et que les champignons les plus sensibles sont *Trichoderma sp* et *Sclérotinia sp*.

CONCLUSION GÉNÉRALE
ET
PERSPECTIVES

Conclusion & perspectives

Parmi les contraintes qui pèsent sur l'agriculture, les maladies et les ravageurs, regroupés sous le terme de « bio agresseurs », rendent nécessaire le développement de méthodes à la fois toujours plus innovantes respectueuses de l'environnement et efficace, à fin délimiter les dégâts et donc les pertes qu'ils occasionnent.

Et à fin de contribuer à la valorisation de la flore algérienne, nous avons mené une étude qui s'appuie sur les résultats de l'extraction de l'huile essentielle de *rosmarinus tournefortii* à partir de la partie aérienne et de ses analyses physico-chimiques, ainsi que les résultats de son identification par CG/MS et de son activité antimicrobienne.

Les résultats obtenus indiquent que le rendement d'extraction de l'huile essentielle par hydro distillation est de 0,53% de plus les résultats physico-chimiques ont montré que l'huile essentielle de *R.tournefortii* est de qualité supérieure par rapport à l'indice d'acide, l'indice de réfraction, le taux d'humidité et la densité.

L'identification de la composition chimique par CG/MS a permis d'identifier a fait ressortir un nombre déterminé de constituants dans cette huile essentielle , la plupart des substances identifiés sont des mono terpène dont le camphre est le composé majoritaire dans la composition de cette huile (35,123%), les autres composés mono terpéniques identifiés pour cette même HE ont des teneurs appréciables comme le camphène (18,636%), le α -pinène (17,001%), et le carène (10,132%), et le 1-8 cinéol (9,701%).

La mise en évidence de l'activité antibactérienne sur l'ensemble des souches (*Pseudomonas savastoni*, *pectobactérium carotovorum*, *Erwinia amylovora*) nous a démontré que l'huile essentielle du *Rosmarinus tournefortii* est douée d'une activité inhibitrice sur ces bactérie phytopathogènes et sur l'ensemble des champignons testés (*Rhizoctonia solani*, *Fusarium sp*, *sclérotinia sp*, *Cladosporium sp*, *Trichoderma sp*, *Phytophthora sp*) sauf sur *Penicillium sp* qui s'est avéré résistant au H.E de *Rosmarinus tournefortii*

Les résultats de la détermination de la concentration minimale inhibitrice de l'HE du *R.tournefortii* sur les 6 souches microbiennes étudiées révèlent que la bactérie *Erwinia amylovora*, a été la plus sensible, elle a présenté une CMI la plus faible égale à 0,875%. Les champignons les plus sensibles sont *Trichoderma sp* et *Sclérotinia sp*. qui ont présenté une CMI qui est égale à 0,875%.

Conclusion & perspectives

Ces résultats révèlent que notre plante présente des potentialités et pourrait être utilisée et exploitée avec succès pour la gestion des pathologies végétales. Ces maladies causées pour la plupart par des organismes qui entraînent des pertes considérables sur le rendement et la qualité des cultures et qui sont dans la plupart des cas incurables par voie chimique.

Cette étude constitue une première étape dans la recherche de molécules bio pesticides de l'huile essentielle de *R.tournefortii*. Elle mérite d'être poursuivie par d'autres études pour confirmer leur activité.

Il serait intéressant de tester l'effet de l'huile essentielle de *R.tournefortii* sur d'autres agents phytopathogènes.

Il serait aussi d'intérêt de rechercher et caractériser les molécules bioactives existantes dans cette huile essentielle.

RÉFÉRENCES
BIBLIOGRAPHIQUES

Références bibliographiques

- ADLI B. Z. , YOUSFLI(2011) .** Contribution à l'étude ethnobotanique des plantes médicinales dans la région de Djelfa. thèse de magister, université des sciences et de la technologie Houari Boumediène (USTHB) , faculté de biologie
- AFNOR : Association Française de Normalisation. « Huile essentielles », 2004,** Paris.
- AGRIOS G. N., 2005,** Plant pathology , 05thed.Elservier academic press , USA .UK.
- ARPINO.P., PREVOT .A , SERPINET .J , TRANCHANI .J, VERGNOL .A, WITIER .P .** 1995, Manuel pratique de chromatographie en phase gazeuse, Ed.Masson , Paris.
- BAKKALI .F , AVERBECK.S , AVERBECK .D , IDAOMAR.M , 2008 ,** Biological effects of essential oils , Food and chemical , toxicology , 46 , 446 , 475.
- BELLAKHDARJ.1997.**La pharmacopée marocaine traditionnelle . Ibis Press (Ed).Paris, 764p.
- BENDIDOUCHE M.S ,BENHASSANI H ,HAZEM Z ;ROMANE A ,2011.** Essentiel oil analysis and antibactériel activity of *Rosmarinus tournefortii* from Algeria .Nat.Prod.Commun ,6.1511-1514.
- BENJELALI .B , TANTAOUI .E.A et ESMAIL ALAOUI.M , 1986 ,** Méthodes d'étude des propriétés antiseptiques des huiles essentielles par contact direct en milieu gélosé , Plante médicinales et phytothérapie , 20 , 155 , 167.
- BISSETTJ.A(2004).**Revision of the genus *Trichoderma*.I.SectionPachybasium.(a)Can.J.Bot., 69 : 2373-2417
- BLANCHARD .D, 1988,** Maladies de la tomate : observer , identifier , lutter , INRA , Paris , PP.174-179.
- BODY .P, 1948.** Economie forestière Nord Africain , Tome I , Milieu physique et milieu humain , Paris V^e , Ed , Larose , PP125-216.
- BOUCHER.C , GENIN.S , ARLAT .M, 2001 ,** Concepts actuels sur la pathogénie chez les bactéries phytopathogène , Inra-CNRS , BP 27 , 31326 , CastanatTolosan Cedex , France , CR.Acad , Sci, Paris , Science de la vie / Life Sciences 324 (2001) 915-917.
- BOUCHONNET.S et LIBONG.D , 2002 ,** Le couplage chromatographique en phase gazeuse – spectrométrie de masse , Département de chimie , Laboratoire des mécanismes réactionnels , Ecole polytechnique , PALAISSEAU Cedex.
- BRUNETON .J,1999,** Pharmacognosie et phytochimie – Plantes médicinales, Ed Lavoisier,Paris.
- CANIOVAA ; BRANDSTE TEROUVA .E ; 2001,** HPLC analysis of fenolic acids in *Melissa officinalis*.j.Liqchrom f RelTechmol, 24 (17), 2647 – 2659.

Références bibliographiques

- CARNAT A., CARNAT P., FRAISSE A., RICOUX D. L., LAMAISON J. L., 1998**, the aromatic and polyphenolic composition of lemon balm (*Melissa officinalis* L. subsp. *officinalis*) tea, *pharmaceutica Acta – Helvetiae*, 72 (5), 301 – 305.
- CARVALHO JR. R. N., MOURA. L.S, ROSA. P.T.V., MEIRELES. M. A. A., 2005**, super critical fluid extraction from rosemary (*Rosemarinus officinalis*), Kinetic data, extract's global yield, composition, anti oxidant activity, *J. of supercritical fluids*, 35, 197 – 204.
- CROTEAU. R., KUTCHAN. T. M. et LEWIS N. G., 2000**, naturel products (secondary metabolites) In : BUCHANAN. B, BRUISSEM. W, Jones. R (Eds), *biochemistry and molecular of plants*, American society of plant physiology, 1250 – 1268.
- CARREE. P., 1953**, précis de technologie et de chimie industrielle, T3, Ed Balliere J.B et fils.
- CHAO. S.C, YOUNG. D.G, OBERG. G.J, 2000**, screening for inhibitory activity of essential oils on selected bacteria , fungi and virus . *J. Essent oil Res* , vol 12 (sep/oct 2000) PP639-649.
- CHEYNIER. V, SAMI-MANCHADO. P, 2006**, Structures phénoliques et goût, *Les polyphénols en Agroalimentaire*, Lavoisier, 398P.
- DANIELSKIL. L, CAMPOS M.A.S, BRESCIANI F. V., HENSE H, YUNES, FERREIRA. S.RS, 2006** , Marigold (*Calendula officinalis*. L) Oleoresin : solubility in SC-CO₂ and composition profile , *Chemical Engineering and Processing* , 46(2), 99-106.
- DASTMALCHIL. K, DAMIEN DORMAN .H.J, OINONEN. P.P, DARWIS Y, LAAKSOI, HILTUNEN. R, 2008** , Chemical composition and in vitro antioxidative activity of a lemon balm (*Melissa officinalis* L) Extract L W T, 41, 391-400.
- DEACON. D.W, 1997**, *Modern mycology basic microbiology* , vol 7 , 224P.
- DEISING. H, NICHOLSRO. LN, HAUG. M, HOWARRD et MENEEN. KJ, 1992** , Adhesion pad formation and the involvement of cutinases and esterases in the attachment of urediniospores.
- DELAQUIS, 2002**. Microbial dynamics and interactions in the spermosphere . *Ann. Rev .Phytopathol .*, 42, 271-309.
- DEYSON. G, 1982**, *Cours de botanique générale : physiologie et Biologie des plantes vasculaires* , nutrition , métabolisme , volume 3 , édition 5, SEDES-CDU.
- FABRICE. B , 2009**, *Les huiles essentielles* , Edition LANORE , Paris , 93P.
- FOUCHE. J.G, MARQUET. A et HAMBUECKERS. A, 2000**, *Les plantes médicinales , de la plante au médicament* , observation du monde des plantes , Sart-Tilman.

Références bibliographiques

- GIROUX S.,COTE J.C.,VINCENT C.,MARTEL P.et CODERRE D.,1994**-Bactériological insecticide m-one effects on the mortality and the predation efficiency of adult spotted lady beetle *coleomegilla maculata*.*j.econ.entomol.*87,pp :39-43.
- GREGORY.C,1988**,Encyclopédia universalis , Aolto Anabaptisme , corpus 1 , France S.A.
- GUERIN-FAUBLE.V.etCARRET.G.(1999)**.L'antibiogramme ,principes méthodologie ,interet et limites .Journée Nationale GTV-INRA, 5-12.
- GRIGONIS.D,VENSKUTONIS.P.R ,SIVIK.B, SANDAHL.M, ESKILSSON.CS ,2005**, Comparison of different extraction techniques for isolation of antioxidants from sweet grass(*Hierochloeodorata*), *The journal of supercritical fluids* , 33(3),223-233.
- GRIM.F,1991**, Etude phyto écologique des formations sahariennes de la region de Ouargla , these de magister , université des sciences et de la technologie Houari Boumediène (USTHB) , faculté de biologie .
- HAMMER.K.A,CARSON.C.F et RILEY.T.V,1999**,Antimicrobial activity of essential oils and other plant , extracts, *j.Appl .Microbial* ,1(86)PP985-990.
- HGCH.H.C,STMS.R.C,WHITEHEBA.D.C,OMEAU.J et WOLFE.D,1987**,Signaling for growth orientation and cell differenciation *uromyces Science* ,235,PP165-216.
- INOUYES.,TAKISWT.andYAMAGUCHI.H(2001)**.Antibacterial activity of essential oil sandtheir major constituents against respiratory tract pathogens by gaseous contact . *J. of .Antimi. Chemo.* 47: pp 565-573.
- KAUFMANN.M,WINK.M,1994**, Molecular systematic of the Nepetoideae (family Labiateae): Phylogenetic implications from *rbcl* gene sequences , *A journal of biosciences* , 49,635-645.
- KUBICEKC.P.,BISSETTJ.,DRUZHININAI.,KULLNIG GRADINGERC.&SZAKACSG.(2003)**.GeneticandmetabolicdiversityofTrichodermasp.:acase studyonSouth-EastAsianisolates.*FungalGenet.Biol.*, 38 (3) : 310-319
- LACEY.A.J,1985**, Weed control , in : p.t.haskell(éd), pesticide application principales and practice, Oxford science publications , Oxford , PP456-485.
- LAREDY et HABERKORN, 2007**.Extraction technologies for medicinal and aromatic plants,International Centre for Science and High Technology ,Trieste ,Italy.
- LEHOTAY.S.D,HAJSLOVA.J,2002**, Application of gas chromatography in food analysis , *Trend in analytical chemistry*,21,686-697.

Références bibliographiques

- LEPOIVRE.P,2003**,Phytopathologie :bases moléculaires et biologiques des pathosystèmes et fondements des stratégies de lutte , les presses agronomiques de Gembloux de Boek , Ed 1, Bruxelles,427P.
- LUCCHSI-M.E(2005)**,Extraction Sans Solvant Assistée par Micro-ondes Conception et Application à l'extraction des huiles essentielles : p 17 ; 23, 52.
- LUCCHSI.M.E.,CHEMATF.andSMADJAL.J.(2004)**.Flavour and Fragrance Journal Flavour Fragr .J. ; 19: 134-138
- LUQUE DE CASTRO .M.D,GARCIA_AYUSO.L.E,1998**, Soxhlet extraction of solid materials : an out dated technique with a promising innovative future , Analytica Chimica Acta, 369,1-10.
- MAHESAWARI.R,2005**,Fungi:Experimental methods in biology , CRC Press,mycologies series ,vol 24 , PP47-65.
- MARC.F,DAVIN.A,DELGENEBENBRAHIM.L,FERRAND.C,BACCAUNAUD.D,FRITS CH.P,2004**,Méthodes d'évaluation du potentiel d'antioxydant dans les aliments, Médecine/Sciences,20,458-463.
- MAZOYER.M,AUBINEAU.M ,BERMOND.A,BOUGLER.J,NEY.B,ROGER-ESTRADE.J, 2002**,Larousse Agricole : Le monde agricole au XXI^{ème} siècle,766P.
- MESSIAEN.C,BLANCARD.D,ROUXEL.F,LAFON,1991**,Les maladies des plantes maraichères (du labo au terrain) , Edition Quae,552P.
- MOHAMMEDI.Z,2006**,Etude du pouvoir antimicrobien et antioxydant des huiles essentielles et flavonoïdes de quelques plantes de la région de Tlemcen,Memoir-Magistère, Université Abou Bakr Blaid-Tlemcen.
- MOLINA.J.J et HARRISON.M.D,1997**,The role of *Erwinia carotovora* in potato , Blackleg I, in Colorado.American potato.journal54:587-591.
- MOREAU.F,1960**, Botanique : Procaryotes (Cyanophytes et Bactéries), Eucaryotes (algues,champignonset végétauxsupérieurs), La plante dans ses rapports avec le milieu , Ed , Paris, Gallimard,1531P.
- NESTR D ; 2000**-Control of Penicillium by plant volatile compounds.plant pathology 55,pp:100-105.
- OLIVIERA.C.R.F, CYSNEIROS M.C.H ET HATANO EDUARDO, 2007**, Occurrence of pyemotssp on tuta absoluta (Meyrick), Brazilian archives of biology and technology, 50 (6), PP: 929 – 932.

Références bibliographiques

- PR ATE. S,1998**-Matières premières usuelles du règne végétal.Masson & Cie.Tome 2. Paris.
- PAULIN E .I. 2001**, encyclopédie des plantes médicinales, identification, préparation, soins 2^{ème} édition, londre, 335P.
- Pharmacopée européenne, 2001, 4^{ème} Ed France.
- Pharmacopée européenne, 2006, 5^{ème}, Ed France.
- PERONBELON.MCM.,LUMB.VM.,ZUTRA.,HYMANL.J.etBURNETTM.(1989)**.Factors affecting potato blackleg development.In:Tjamos ,EC, Beckman ,CH ,eds Proceedings of the NATO Advanced Research Workshop on the interaction of Genetic and Environmental Factorsin the development of Vascular Wilt Diseases of Plants'1988 , Cape Sounion, Greece.Berlin:Springer-Verlag,421-431.
- PONCE G.2003** , mining the essential oils of the anthemideae African journal of biotechnology, 3 (12), 706 – 720.
- PRUDENT I. 1995** bioactivity of essential oils of selected temperture aromatic plants :antibacterial, antioxydant, antiinflammatory and other related pharmacological activities, plant biology departement, SACauchincuire, Ayr, Scotland, UK, KA,GSHW.
- REGNAULT-ROGER C.,2002**- De nouveaux phutoinsecticides pour le troisième millénaire In:Biopesticide d'origine végétales ,ed Tec & Doc.Londre –Paris-New York.pp:19-39.
- REIGHARD.T.S, OLESIK.S.V, 2006**, recent advances in extraction of nutraceuticals from plants, Trends in food science and technology, 17, 300 – 312.
- SALMOND.G.P.C, 1994**, secretion of extracellular virulence factors by plant pathogenic bacteria, annual review of phytopathology, 32:181 – 200.
- SALOUK, N.E, 2008**, Agadir, lute contre les bacteriesphytopathogenes transmissibles par les semences et les plantes, Maroc.
- SARBACH.R.1962**-Contribution à l'étude de la désinfection chimique des atmospheres .Faculté de Pharmacie,Université deRennes, 181p.
- SAVOBODA.K.P, HAMPSON d.B, 1999**, bioactivity of essential oils of selected temperture aromatic plants :antibacterial, antioxydant, antiinflammatory and other related pharmacological activities, plant biology departement, SACauchincuire, Ayr, Scotland, UK, KA,GSHW.
- SEMAL, j, 1993**, traité de pathologie vegetale faculté des sciences agronomiques de Gembox,

Références bibliographiques

Belgique, 621 P.

SCANDAMIETMYCHA.(2001).Penetration of potato tuberlenti cels by bacteriain relation to biological control of blackleg disease .*Potato Research* **39**: 333-334.

SHARMA.O.P, 1989, textbook oh fungi, tetamcgraw – hill, 24P.

TAFFIFE.T.L, 2010, effet bactéricide fongicide et nématode in vitro de quatre espèces végétales spontanées mémoire de magister spécialité : protection des plantes et environnement UNIV. SAAD DAHLEB de Blida, 164 P.

TEIXEIRA DA SILVA J.A, 2004, mining the essential oils of the anthemideae African journal of biotechnology, 3 (12), 706 – 720.

TEUSCHER.E, ROBERT.A, ANNEISE.L, 2005, 1000 plantes aromatiques, editionLavoisier.P.P, 195, 310 – 313, 416 – 422.

TOTH.I.K, BELL.K.S, HOLEVA.M.C, BIRCH,P.R.J, 2003, soft – rot Erwinea: from genes to genomes, mol plant pathology 4: 17 – 30.

VINCENT C. et CODERRE D; 1992-la lute biologique .Tec et Doc Lavoisier. 12P.

WANG.L, WALER.C.L,2006, recent advances in extraction of nutraceuticals from plants, trends in food science and technologie, 17, 300 – 312.

WOLFE.D, 1987, signaling for growth orientation and cell differentiation uromyces science 235, pp: 165 – 216.

ZETTER.A, 2001, the long list of diseases affecting tomatoes and peppers in a wet growing season cornell university fiche technique, 6.p.

ZHIRIA, BAUDOUX.D, (2006) huiles essentielle chemotypées et leurs synergie. Edition Inspirdeveloppement, Luxembourg, pp 8 – 43.

ANNEXES

Annexes

COMPOUNDS LIST:

Retention Time	Compound Name	Match Find	Rev. Match Find	Area	Height
0.617	?2-(2-Methoxyphenyl)-1-[1-(2-cyclohexyle	235	254	2618	2154
0.643	?Yohimban-16-carboxylic acid, 17-(acetyl	260	660	1815	1468
0.703	?Butanedioic acid, tetrakis[(trimethylsi	282	322	4	1775
0.787	?2,4-Bis[trichloromethyl]-6-[à,à,à-trifl	210	370	18890	6764
0.883	?Dimethyl 1-(4-methoxyphenyl)-naphthalen	241	542	2678	1965
1.010	?3-Ethoxycarbonyl-3-demethylthiocolchici	204	308	693	911
1.037	?5-Hydroxy-N-stearoyltryptamine	236	267	8767	2642
1.110	?1,3,5-Triazine-2,4-diamine, 6-chloro-N,	311	525	3683	1946
1.297	?Chrysanthemaxanthin	278	386	794	1031
1.330	?Methylmercuric iodide	351	440	200	1423
1.480	?[4-(Chloro-difluoro-methoxy)-phenyl]-(4	333	559	2500	762
1.570	?Dibenzo[c,g][1,2,5,6]tetraphosphocin, 5	203	333	788	440
1.693	?3,3-Bis(phenylthio)-5à-cholestane	358	785	692	1144
1.747	?Bis(diphenylarsine) oxide	272	403	1328	2020
1.793	?Oxaprozin	265	562	2330	1710
1.837	?9-Hydrazono-3,6-dichloro-2,7-bis-(2-pip	282	555	707	1750
1.877	? (Methoxy-1-propynylmethylene) pentacarbo	259	415	146	934
2.007	?3-Ethoxy-1,1,1,7,7,7-hexamethyl-3,5,5-t	293	371	5468	1867
2.090	?Tetracosane, 12-decyl-12-nonyl-	228	251	11278	3562
2.213	?2-Propenoic acid, 2,2,3,3,4,4,5,5,6,6,7	287	794	6335	2439
2.283	?Ethanamine, N-methylene-	469	976	2592	1243
2.327	?1-Bromo-2-n-hexylbenzene	264	429	799	2062
2.443	?2-Octen-4-one	424	807	7612	3240

Annexes

2.540	?Heptane	619	966	13045	4327
2.607	?[Chloro(phenylthio)methylenimino]sulfur	254	416	3901	2635
2.740	?Phosphine, ethyl-	330	639	11746	2158
2.913	?Methyl 2-(benzenesulfonamido)-2-(ethoxy	243	501	1044	1211
3.093	Octane	899	926	321385	89284
3.203	Acetone	978	980	14321340	3517480
3.517	?Cyclobutane, 1,2-diethyl-, cis-	509	836	16334	4438
3.687	?Cyclopentane, 2-ethylidene-1,1-dimethyl	518	790	36672	7071
3.870	?4-Isopropylcyclohexylamine	470	708	39396	8063
3.933	?2-Propen-1-ol, 2-methyl-, acetate	298	841	2466	3874
3.980	?Ethoxyacetylene	413	979	4406	3139
4.053	?Heptane, 2-methyl-3-methylene-	531	786	35192	8269
4.167	?Butanoic acid, 3-hydroxy-, methyl ester	348	711	272	1170
4.417	3,3,5,5-Tetramethylcyclopentene	807	898	129320	28179
4.540	Formic acid, 2-propenyl ester	852	894	182204	53745
4.633	Butanal, 3-methyl-	919	919	485286	116927
4.760	?Hexen-1-ylcyclohexane	392	654	22714	5303
4.867	?2-(2-Methoxyphenyl)-1-[1-(2-cyclohexyle	215	252	4309	1192
4.983	?Aluminum, tetraethylbis(æ-methylamino)	248	842	1063	313
5.210	Tricyclo[2.2.1.0(2,6)]heptane, 1,3,3-tri	865	905	312888	45422
5.533	Furan, 2-ethyl-	882	888	1856065	293306
5.763	?1,6-Dimethylhepta-1,3,5-triene	594	830	44826	8255
5.943	?1,3-Cyclopentadiene, 5-(1,1-dimethyleth	735	843	113706	21095
6.143	Bicyclo[2.2.1]hept-2-ene, 1,7,7-trimethyl	869	883	1600456	185662
6.473	?Anthraquinone, 1-(p-bromophenyl)-	273	624	759	1145
6.567	?Methanol, (1,4-dihydrophenyl)-	460	803	30703	4761
6.660	?4-Acetoxy-3-bromo-2,3-dimethyl-5,5,8,8-	244	278	14624	9694
6.947	Tricyclo[2.2.1.0(2,6)]	913	913	55217860	4694600

Annexes

]heptane, 1,7,7-tri				
7.360	(1R)-2,6,6-Trimethylbicyclo[3.1.1]hept-2	840	840	169297200	18878230
7.507	trans- α -Ocimene	830	830	20810230	3949622
7.740	Bicyclo[3.1.0]hex-2-ene, 4-methyl-1-(1-m	898	901	46250940	13342600
7.937	Toluene	919	930	799897	211201
8.070	?3-Buten-2-ol, 2-methyl-	695	845	26169	9450
8.157	?4-Dehydroxy-2,3,3,4,5,6,7-hepta-O-methy	362	505	51730	24191
8.247	1,7,7-Trimethylbicyclo[2.2.1]hept-5-en-2	810	841	241893	46880
8.573	Bicyclo[2.2.1]heptane, 7,7-dimethyl-2-me	870	872	16267870	2073968
8.737	Camphene	905	907	189978400	18567960
8.910	?1,3,7-Octatriene, 3,7-dimethyl-	734	744	8185482	2734971
8.977	Camphene	918	921	26702900	13652420
9.350	Hexanal	928	928	1085749	255696
9.593	?2-Butenal, 2-methyl-	530	902	6765	2568
9.850	1-Hexen-3-one	889	897	1936119	422488
10.117	α -Pinene	886	886	206382500	17641120
10.277	Bicyclo[3.1.1]heptane, 6,6-dimethyl-2-me	875	875	64686850	15080870
10.643	Bicyclo[3.1.0]hexane, 4-methylene-1-(1-m	912	919	34084500	4468146
10.973	Bicyclo[3.1.0]hex-2-ene, 4-methylene-1-(889	889	9047501	1667398
11.197	o-Xylene	772	848	135697	25101
11.350	?2-Aminocynoacetamide	428	982	16290	6129
11.563	3-Carene	915	917	15153740	1014997
11.877	1-Pentene, 4,4-dimethyl-	785	838	452650	141835
12.133	β -Phellandrene	844	844	407007100	16292610
12.633	?2-Propynenitrile, 3-fluoro-	607	999	3820132	823838
12.743	?Cyclopentane	626	999	419189	212024
12.787	?Pentadecanoic acid, 3-methylbutyl ester	309	587	418315	277008
12.830	?Clofazimine	245	318	341812	311199
12.867	?2,4-Bis[4-chloro-trans-styryl]-6-[(3-py	189	341	371302	174497
12.900	(+)-4-Carene	909	910	56456990	8588806
13.357	Cyclohexanol, 1-methyl-4-(1-methyletheny	780	781	225457300	16678840
13.483	Eucalyptol	859	859	79127580	7025926
13.903	?2-	472	626	3177747	857027

Annexes

	Furanmethanamine, tetrahydro-				
14.037	?1,4-Methano-3-benzoxepin-5,10-diol, dec	363	899	148647	196049
14.097	Eucalyptol	857	858	13877850	6270594
14.273	?4,4-Dimethyl-2-propenylcyclopentane	622	669	175544	62098
14.370	Furan, 2-pentyl-	924	924	1218562	416926
14.517	trans- α -Ocimene	911	912	1608568	377551
14.757	3-Carene	865	871	87046350	17438040
14.810	ζ -Terpinene	883	883	31512350	16604180
14.977	3-Octanone	884	886	51375090	12240610
15.110	?Benzene, (1-methylhexadecyl)-	327	433	173517	37972
15.417	o-Cymene	855	862	97108670	15551600
15.563	Benzene, 1-methyl-3-(1-methylethyl)-	885	888	20629680	11551170
15.670	(+)-4-Carene	857	871	226365	72361
15.843	(+)-4-Carene	917	918	66153780	17301280
15.963	?Octanal	744	933	430560	139596
16.063	?2(1H)-Pyridinone, 1-[2-deoxy-3,5-bis-O-	427	615	58640	15265
16.117	Benzene, 1-ethenyl-3,5-dimethyl-	767	802	69929	26360
16.207	?3-Hepten-2-one	584	922	25201	12412
16.293	1-Hepten-3-one	828	852	1784765	561288
16.377	trans-2-(2-Pentenyl)furan	871	898	1104856	316422
16.540	?2-Decen-1-ol	576	688	140331	28247
16.667	Cyclohexanone, 2,2,6-trimethyl-	817	857	135858	39987
16.763	2-Penten-1-ol, (Z)-	813	816	303298	98111
16.860	?8-Oxabicyclo[5.1.0]octane	694	772	808716	222748
16.987	?Fumaric acid, myrtenyl octyl ester	549	598	242122	42870
17.183	?3a,7a-Epoxy-1H-inden-4(5H)-one, tetrahy	573	605	185183	49663
17.303	5-Hepten-2-one, 6-methyl-	842	911	1386272	436029
17.400	?trans-4-methoxy thujane	647	708	204423	67714
17.487	α -Campholenal	842	860	262204	70423
17.713	1-Hexanol	866	872	1399643	358244
17.853	?Ethanone, 1-(1-ethyl-1H-pyrazol-4-yl)-	648	817	80840	27936
17.913	?Cyclohexanone, 2-ethyl-	669	800	192257	48280
17.993	3-Hexen-1-ol	799	858	122998	32613
18.173	?p-Cymen-7-ol	645	768	68598	18239
18.293	?2,16,27,28-Tetraazaheptacyclo[298	321	24200	13740

Annexes

	15.7.1.1(
18.400	?1-Hydroxymethyl-7,7-dimethylbicyclo[2.2	593	656	156536	35710
18.560	3-Hexen-1-ol	907	949	9851730	2736465
18.763	?Cobalt, [1,1,1,1-(ü4-1,3-cyclobutadiene	278	308	1716	2186
18.907	?Nonanal	738	805	10246970	2377318
19.097	?Cyclohexanone, 2,3-dimethyl-	632	736	159645	49827
19.160	2-Hexen-1-ol, (E)-	895	913	427720	110478
19.320	Benzene, 1-methoxy-2-methyl-	879	897	2484751	663342
19.527	trans-2-Caren-4-ol	858	861	2019914	524978
19.773	Carveol	815	815	2852929	510329
20.043	Benzene, 1-methyl-4-(1-methylethenyl)-	900	901	12954540	3051253
20.157	cis-Linaloloxide	900	937	2689394	762072
20.417	1-Octen-3-ol	928	939	68504620	12844760
20.563	?Bicyclo[2.2.1]heptan-2-one, 3,3-dimethyl-	703	704	1163169	243032
20.767	Bicyclo[3.1.0]hexan-2-ol, 2-methyl-5-(1-	842	878	13418860	3391888
20.933	trans-Linalool oxide (furanoid)	840	842	1781350	468666
21.007	?2,6,10-Dodecatrien-1-ol, 3,7,11-trimethyl-	689	715	1280992	288030
21.153	?1-Buten-3-yne, 1-(1,1-dimethylethoxy)-,	465	734	33849	11920
21.320	?2-Pyrazinamine, N,N-dimethyl-	288	468	124489	38071
21.450	à-Campholenal	811	872	13318930	2941650
21.687	Copaene	915	918	15576260	4036913
21.903	?1,6-Dimethylhepta-1,3,5-triene	633	766	683134	179632
22.063	Camphor	917	923	143510900	20071550
22.170	(+)-2-Bornanone	928	931	32419570	16866010
22.290	(-)-á-Bourbonene	870	886	1105026	251874
22.460	?3-Cyclohexene-1-carboxaldehyde, 1,3,4-trimethyl-	737	753	3802675	1004232
22.547	2-Nonenal, (E)-	825	895	667444	228896
22.637	?Isoledene	572	659	90388	24582
22.873	1,6-Octadien-3-ol, 3,7-dimethyl-	872	873	86629460	17556860
22.923	1,6-Octadien-3-ol, 3,7-dimethyl-	881	881	29923930	16372910
23.137	1-Octanol	887	888	1042371	348488
23.253	2-Cyclohexen-1-ol, 1-methyl-4-(1-methylethoxy)-	889	891	47307840	10881050
23.377	Pinocarvone	873	877	12041090	3173774
23.617	Bicyclo[2.2.1]heptan-2-ol, 1,7,7-trimethyl-	836	851	9086739	1772322
23.807	Bornyl acetate	911	911	115406000	18968410
24.080	Bicyclo[2.2.1]heptan-2-ol, 1,7,7-trimethyl-	786	829	22050860	5224528

Annexes

	-2-ol, 2,3,3-trimeth				
24.223	3-Cyclohexen-1-ol, 4-methyl-1-(1-methyle	889	890	72386620	16872420
24.323	Caryophyllene	877	878	80351750	16806500
24.467	?Furan, 2-(2-propenyl)-	696	818	403060	156423
24.560	1H-Cycloprop[e]azulene, decahydro-1,1,7-	899	908	2499590	880944
24.690	1-Cyclohexene-1-carboxaldehyde, 2,6,6-tr	761	782	2226025	617634
24.817	2-Cyclohexen-1-ol, 1-methyl-4-(1-methyle	895	898	40911430	9669210
24.960	?Bicyclo[2.2.1]heptan-2-ol, 3,3-dimethyl	675	874	413642	115868
25.130	?Benzeneacetaldehyde	724	900	4637247	875910
25.257	2-Isopropylidene-3-methylhexa-3,5-dienal	750	795	4771173	626288
25.477	Bicyclo[3.1.1]heptan-3-ol, 6,6-dimethyl-	881	898	33178160	8652520
25.623	1-Methylcyclohexa-1,3-diene	759	910	1702487	403643
25.873	à-Terpineol	761	761	112103200	16982200
26.003	1,4,7,-Cycloundecatriene, 1,5,9,9-tetram	889	893	41966900	6643307
26.210	Citral	785	799	11680120	2292015
26.510	à-Terpineol	865	865	191140800	18949240
26.737	endo-Borneol	883	886	31692710	10287390
26.997	Epizonarene	816	818	2649329	867884
27.077	?Isosativene	710	776	8763373	2990477
27.197	3-Cyclohexen-1-one, 2-isopropyl-5-methyl	796	814	9810363	2893810
27.280	1H-Benzocycloheptene, 2,4a,5,6,7,8,9,9a-	896	916	28885700	7188595
27.423	?Naphthalene	549	893	45859	23564
27.537	2-Cyclohexen-1-ol, 3-methyl-6-(1-methyle	875	892	22946380	6028903
27.637	?1, 1, 5-Trimethyl-1, 2-dihydronaphthale	569	678	545644	249001
27.717	Carveol	756	758	1957701	539658
27.817	?10-epi-ç-Eudesmol	373	679	28140	11956
27.980	Naphthalene, 1,2,4a,5,8,8a-hexahydro-4,7	875	875	53198950	10778020
28.123	Ethanone, 1-(4-methylphenyl)-	812	834	227098	83936
28.210	Cyclohexene, 3-(1,5-dimethyl-4-hexenyl)-	829	831	2534853	832144

Annexes

28.293	?Cyclohexene, 5,6-diethenyl-1-methyl-	651	678	7309623	2051047
28.430	Bicyclo[3.1.0]hexan-3-ol, 4-methylene-1-	799	815	2993952	850859
28.503	cis-muurola-3,5-diene	861	894	335114	180193
28.580	Bicyclo[3.1.1]hept-2-ene-2-methanol, 6,6	800	814	14224460	4187780
28.700	1H-Benzocycloheptene, 2,4a,5,6,7,8,9,9a-	804	805	4523221	925826
28.877	Bicyclo[3.1.0]hexan-3-ol, 4-methylene-1-	858	859	29860230	7431461
28.997	Cyclononasiloxane, octadecamethyl-	811	889	949466	301362
29.157	?2-(1,1-Dimethylethyl)-6-(1-methylethyl)	668	898	106497	44134
29.263	2-Buten-1-one, 1-(2,6,6-trimethyl-1,3-cy	751	804	8511082	2180467
29.453	2-Cyclohexen-1-ol, 2-methyl-5-(1-methyle	829	833	6638556	1820888
29.563	Naphthalene, 1,2,3,4-tetrahydro-1,6-dime	891	894	10491390	1583917
29.720	Benzenemethanol, à,à,4-trimethyl-	891	902	14233220	3967555
29.957	5,9-Undecadien-2-one, 6,10-dimethyl-, (E	922	923	5746962	1935170
30.063	Bicyclo[3.1.1]heptane-2-methanol, 6,6-di	784	817	1646053	256868
30.237	Bicyclo[3.1.1]heptane-2-methanol, 6,6-di	751	777	284678	77984
30.297	?à-Farnesene	589	750	371844	97989

Annexes

Annexe 1 : « Matériel de laboratoire utilisé »

- **Appareils**

- Agitateur Vortex.
- Autoclave (Stérilisation à chaleur humide 120°C).
- Bain Marie .
- Balance analytique.
- Balance de précision.
- Etuve.
- GC/SM (Perkin Elmer Clarus 500).
- Polarimètre .
- Réfractomètre.
- Spectrophotomètre UV-Visible (Shimadzu).
- Titrimètre



- Le Clevenger

L'appareil d'extraction Clevenger est constitué de :

- Un support élévateur
- Une plaque chauffante
- Un ballon rond d'une capacité de 2 litres
- Un doseur des huiles essentielles

Annexes

- **Petit matériel et consommable**

- Anse de platine.
- Bec bunzen.
- Bécher .
- Boîtes de Pétri stériles à usage unique.
- Burette graduée .
- Disques en papier absorbants.
- Ecouvillons stériles à usage unique .
- Entonnoir .
- ErlenMeyer .
- Etiquettes .
- Fiole conique.
- Fiole Jaugée .
- Papier Aluminium.
- Pince .
- Pipettes graduées .
- Pissette .
- Portoir pour tubes .
- Seringues stériles en plastique à usage unique .
- Tubes à essai en verre à vis et à fond plat .

Annexes

Annexe 2 : « Milieux de culture utilisés »

- **Milieu PDA** (pour les champignons) :

- 200 g de pomme de terre
- 10 g de D-glucose .
- 15 g d'Agar .
- H₂O distillée(1000ml)

Johnson et Booth(1983)-Plant pathologists Pocket Book C.M.I



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

Ce milieu est utilisé pour cultiver les bactéries phytopathogènes à 28°C pendant 24 (PH 7,2) à 72h. Il se compose de:

- Peptone 20,0g
- Glycérol 10,0 ml
- Phosphate dipotassique 1,5 g
- Sulfate de magnésium 1,5 g

Annexes

- Agaragar bactériologique 15,0 g
- Eaudistillée 1000ml



-Balance de précision



-Etuve (incubateur)



PHmètre



-Bain marie



Réfractomètre



Densimètre



Réfractomètre

Annexes



Montagne de Bouira(lieu de la récolte de *Rosmarinus tournefortii*)