

# REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

Ministère de l'enseignement supérieur et de la recherche scientifique

Université Blida 1

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

Département des Biotechnologies

Laboratoire de Recherche des Plantes Aromatiques et Médicinales



Mémoire présenté en vue de l'obtention du diplôme de master :

## **Biotechnologie et valorisation des plantes**

Essai de biocontrôle de la pourriture grise des fraises par l'huile essentielle de l'origan « *Origanum glandulosum* »

Présenté publiquement le 26/06/2018

par : **EL BEY Mohamed El Amine**

Devant le jury composé de :

Mme Outtar F.	MCB	USDB	Présidente du jury.
Mme Moumene S.	MCA	USDB	Promotrice.
Mme Faïdi H.	MAA	USDB	Examinatrice.

Année universitaire 2017-2018

# REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

Ministère de l'enseignement supérieur et de la recherche scientifique

Université Blida 1

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

Département des Biotechnologies

Laboratoire de Recherche des Plantes Aromatiques et Médicinales



Mémoire présenté en vue de l'obtention du diplôme de master :

## **Biotechnologie et valorisation des plantes**

Essai de biocontrôle de la pourriture grise des fraises par l'huile essentielle de l'origan « *Origanum glandulosum* »

Présenté publiquement le 26/06/2018

par : **EL BEY Mohamed El Amine**

Devant le jury composé de :

Mme Outtar F.	MCB	USDB	Présidente du jury.
Mme Moumene S.	MCA	USDB	Promotrice.
Mme Faidi H.	MAA	USDB	Examinatrice.

Année universitaire 2017-2018

## *Remerciements*

Tout d'abord j'adresse mes remerciements les plus sincères à Mme Messgo-Moumene Saida maitre de conférence A à l'Université de Blida1, que j'ai eu l'honneur d'avoir comme directrice de thèse, je vous remercie pour votre dévotion et sérieux.

Mes vifs remerciements vont également aux membres du jury pour l'intérêt qu'ils ont porté à ma recherche en acceptant d'examiner ce travail.

A Mme Outtar F., maitre de conférence B à l'université Blida1 d'avoir acceptée de présider le jury.

A Mme Faïdi H., maitre assistante A à l'université Blida 1 d'avoir accepté d'examiner ce mémoire.

Je remercie également Mademoiselle Saddek Dounia pour son aide et sa serviabilité. Sans oublier Madame Lahiani F-Z, ingénieure du laboratoire de recherche des plantes aromatiques et médicinales pour sa serviabilité et sa disponibilité. Un grand merci à tous les enseignants et ingénieurs de laboratoires du département de Biotechnologie, qui ont contribué à la réussite de mon parcours.

El Bey Mohamed El Amine

## *Dedicaces*

*À ceux qui m'ont donné la vie, et sans lesquels je ne serai devenu la personne que je suis aujourd'hui... à mes chers parents... Votre amour et soutien sont mon moteur, tout le mérite vous revient...*

*À mon cher frère et ma chère sœur.*

*Ma grand-mère et ma chère tante qui m'ont toujours soutenu.*

*Mes cousins, Kichem, Ghène, Fatiha, Imène*

*Mes chers amis, que je ne remercierai jamais assez Kamza S, Kamza B, Imène, Cherif, Meroua, Sam, Soumia, Amina, sans votre présence ma vie ne serait pas la même.*

*Aux étudiants de la promotion 2016-2018.*

*À tous ceux qui me sont chers...*

*El Bey Mohamed El Amine*

## Résumé

### Essai de biocontrôle de la pourriture grise des fraises par l'huile essentielle de l'origan « *Origanum glandulosum* »

Notre étude vise la recherche de solutions biologiques contre les contaminants fongiques des fruits au cours du stockage, par le biais d'une huile essentielle. Cette étude comprend l'utilisation d'un matériel végétal représenté par la partie aérienne d'*Origanum glandulosum*, de fraises et d'un matériel fongique composé d'un isolat fongique de *Botrytis cinerea*. L'origan a fait l'objet d'extraction d'huile essentielle par hydrodistillation. Le pouvoir antifongique de l'huile essentielle a été évalué *in-vitro* et *in-vivo* par les méthodes de contact direct et celle de micro-atmosphère à une concentration de 1/250ième (0,4 %). Les potentialités inhibitrices ont été basées sur la croissance mycélienne et la survie, ainsi que les modifications morphologiques. L'huile essentielle testée à 1/250ième a révélé un puissant pouvoir antifongique avec une inhibition complète (100 %) de la croissance mycélienne et de la sporulation et de la production de sclérotés de l'isolat fongique *in vitro* selon les deux méthodes d'étude et *in vivo* selon la méthode de contact direct incubé à 4°C et à température ambiante. L'effet antifongique de l'huile essentielle s'est traduit par des modifications structurales telles que la lyse et la distorsion du mycélium, l'absence de production de conidies et donc des conidiophores.

Cependant, la survie des isolats après un prolongement de la période de latence avant la germination des conidies a confirmé son effet légèrement fongistatique selon la méthode de microatmosphère *in vivo* dans les deux températures d'incubation.

Ainsi, l'huile essentielle de *Origanum glandulosum* a confirmé ses potentialités antifongiques *in-vitro*, et *in-vivo* par la réduction d'inoculum de *Botrytis cinerea*, en vue de son utilisation dans le biocontrôle des fruits contre cette moisissure dans les lieux de stockage.

**Mots-clés :** *Botrytis cinerea*, Pouvoir antifongique, Huile essentielle, *Origanum glandulosum*.

## **Abstract**

### **Biocontrol test of the gray mold of strawberries with oregano essential oil "*Origanum glandulosum*"**

Our study aims to find biological solutions against fruit fungal contaminants during storage, using an essential oil. This study includes the use of plant material represented by the aerial part of *Origanum glandulosum*, of strawberries and fungal material consisting of a fungal isolate of *Botrytis cinerea*. The *Origanum glandulosum* essential oil was extracted by hydrodistillation. The antifungal power of the essential oil was evaluated *in-vitro* and *in-vivo* by direct contact and also with the micro-atmosphere methods at a concentration of 1/250th (0,4 %). The inhibiting potentialities were based on the mycelial growth, the sporulation and survival, as well as sclerotic production. The essential oil tested at 1 / 250th showed strong antifungal activity with complete inhibition (100%) of mycelial growth, sporulation and production of sclerots of the fungi isolate *in-vitro* according to the both methods of study and *in-vivo* according to the method of direct contact. The antifungal effect of the essential oil has resulted in structural changes such as lysis and distortion of the mycelium, the absence of conidia production and therefore the conidiophores.

However, the survival of the isolates after an extension of the latent period before the conidial germination confirmed its fungistatic effect by the *in-vivo* micro-atmosphere method.

Thus, the essential oil of *Origanum glandulosum* confirmed its antifungal potential *in-vitro* and *in-vivo* by the reduction of inoculums of *Botrytis cinerea*, with the aim to its use in the biocontrol of fruit against this mold in storage places.

Keywords: *Botrytis cinerea*, Antifungal, essential Oil, *Origanum glandulosum*.

## المخلص

### اختبار المكافحة الحيوية للعفن الرمادي للفراولة بالزيت الأساسي للزعتر *Origanum glandulosum*

تهدف هذه الدراسة لإيجاد حلول بيولوجية للملوثات الفطرية للفواكه أثناء التخزين عن طريق استعمال زيت أساسي. تستعمل هذه الدراسة مواد بيولوجية متمثلة في الجزء الهوائي لنبته الزعتر، فواكه الفراولة و عزلة فطرية متمثلة في *Botrytis cinerea*. تم استخلاص الزيت الأساسي للزعتر عن طريق التقطير. تم اختبار قدرة الزيت الأساسي المضادة للفطريات في المختبر و على الجسم الحي باستخدام تقنيتي التلامس المباشر و الجو الصغير بتركيز 0,4%. تم تقييم الخاصية المثبطة للفطريات عن طريق قياس نمو الغزل الفطري، التبروغ و إنتاج الأصلاب. أظهر الزيت الأساسي بتركيز 0,4% تثبيط تام للعزلة الفطرية لـ *Botrytis cinerea* في المختبر و حسب تقنيتي الالتماس المباشر و الجو الصغير، اما على الجسم الحي فقد أظهر الزيت الأساسي تثبيط تام حسب تقنية الالتماس المباشر في درجتي الحرارة 4°C و في حرارة الغرفة و تعطيل لنمو الغزل الفطري حسب تقنية الجو الصغير. وقد أدى التأثير المضاد للفطريات من الزيت الأساسي في التغييرات الهيكلية مثل تحلل وتشويه الغزل الفطري، وغياب إنتاج الأبواغ. وهكذا ، فقد أكد الزيت الأساسي للزعتر إمكاناته المضادة للفطريات في المختبر ، وفي الجسم الحي عن طريق الحد من اللقاح من فطريات *Botrytis cinerea*، و يمكن استخدامه في المكافحة البيولوجية ضد هذا العفن الفطري في أماكن التخزين.

**الكلمات المفتاحية:** نشاط مضاد للفطريات، زيت أساسي، *Botrytis cinerea*, *Origanum glandulosum*

## Liste des Figures

**Figure 1 :** Le cycle montre l'évolution de l'inflorescence jusqu'à la formation et la maturation des graines (Padulosi S, 1997).

**Figure 2 :** Fleurs de Fraisier (Dueep et Davidson, 2015).

**Figure 3 :** Fraisier avec fraises (Dueep et Davidson, 2015).

**Figure 4 :** Cycle biologique de *B. cinerea* (Claude et al., 1999).

**Figure 5 :** Pourriture grise sur une fraise (Romanazzi et al., 2016)

**Figure 6 :** Illustration de la méthode de microatmosphère (Zaika, 1988).

**Figure 7 :** Une fraise atteinte de *Botrytis cinerea*.

**Figure 8 :** Huile essentielle d'*Origanum glandulosum* obtenue par hydrodistillation.

**Figure 9 :** Pouvoir inhibiteur de l'huile essentielle d'*Origanum glandulosum* sur *Botrytis cinerea* cultivé sur milieu PDA après 12 jours d'incubation à 25° C.

**Figure 10 :** Inhibition de la croissance mycélienne selon les techniques de contact direct et de microatmosphère.

**Figure 11 :** Absence de reprise de croissance mycélienne de *Botrytis cinerea* après traitement par l'huile essentielle d'*Origanum glandulosum*.

**Figure 12 :** Morphologie du mycélium de *Botrytis cinerea* témoin observé au microscopique photonique.

**Figure 13 :** Les fraises témoins après 10 jours d'incubation à température ambiante.

**Figure 14 :** Fraises traitées au contact direct après 10 jours d'incubation à température ambiante.

**Figure 15 :** fraises traitées par microatmosphère après 10 jours d'incubation à température ambiante.

**Figure 16 :** fraises traitées par microatmosphère après 10 jours d'incubation à température ambiante.

**Figure 17 :** Croissance mycélienne de *Botrytis cinerea* sur les fraises traitées par microatmosphère à l'huile essentielle d'*Origanum glandulosum* à la température d'incubation de 4° après 45 jours d'incubation.

**Figure 18 :** Fraises traitées par aspersion à l'émulsion de l'huile essentielle d'*Origanum glandulosum* après 45 jours d'incubation à 4°C.

**Figure 19 :** Evolution de l'altération des fraises par *Botrytis cinerea* sous l'effet de l'huile

essentielle d'*Origanum glandulosum* sur une période de 14 jours à la température ambiante.

**Figure 20 :** Evolution de l'altération des fraises par *Botrytis cinerea* sous l'effet de l'huile essentielle d'*Origanum glandulosum* sur une période de 45 jours à la température 4°C .

**Figure 21 :** Inhibition de l'altération due au *Botrytis cinerea* par l'huile essentielle d'*Origanum glandulosum* selon les deux techniques de microatmosphère et de contact direct.

**Figure 22 :** Inhibition de l'altération due au *Botrytis cinerea* par l'huile essentielle d'*Origanum glandulosum* selon les deux techniques de microatmosphère et de contact direct (incubation à 4°C).

## Liste des Tableaux

**Tableau 1 :** de la production européenne de fraises de la période 2010-2016 (FAO, 2017).

**Tableau 2 :** Tableau récapitulatif des ravageurs du fraisier (Husaini, et al., 2016).

## Liste des Annexes

**Annexe 1 :** Préparation du milieu PDA.

**Annexe 2 :** Préparation de la suspension d'eau-agar à 0,2%.

**Annexe 3 :** Préparation de la concentration 1/250 v/v (0,4 %) de l'huile essentielle.

**Annexe 4 :** Tableau d'analyse de variance des taux d'inhibition In vitro selon les méthodes microatmosphère et contact direct.

**Annexe 5 :** Tableau d'analyse de variance du taux d'infection in vivo traitement par micro atmosphère.

**Annexe 6 :** Tableau d'analyse de variance d'inhibition in vivo à température ambiante.

**Annexe 7 :** Tableau d'analyse de variance du taux d'inhibition de la croissance mycélienne in vivo à froid.

## Sommaire

<b>Introduction</b>	<b>1</b>
<b>Partie Bibliographique</b>	
<b>Chapitre 1. REVUE BIBLIOGRAPHIQUE</b>	
<b>1. Origan</b>	<b>3</b>
1.1. Classification	3
1.2. Distribution et écologie	3
1.3. Description botanique	3
1.4. Culture de l'origan	4
1.5. Multiplication de l'origan	4
1.6. Cycle biologique de l'origan	5
1.7. La récolte d'origan	5
1.8. Utilisation et effets de l'origan	5
1.9. Caractéristiques de l'huile essentielle d'origan	6
1.10. Composition chimique de l'huile essentielle d'origan	6
<b>2. Le fraisier</b>	<b>6</b>
2.1. Classification	6
2.2. Description botanique	7
2.3. Culture	7
2.4. La récolte des fraises	8
2.5. Qualité nutritionnelle et composition chimique des fraises	8
2.6. Propriétés thérapeutiques	9
2.7. Production de fraises	9
2.8. Maladies du fraisier	10
<b>3. Généralités du <i>Botrytis cinerea</i></b>	<b>11</b>
3.1. Généralités	11
3.2. Classification	11
3.3. Morphologie	12
3.4. Biologie	12
3.5. Pourriture grise de la fraise	14
3.6. Lutte et résistance	15
3.7. Importance économique	16
<b>4. Huiles essentielles</b>	<b>17</b>
4.1. Définition	17
4.2. Localisation dans la plante	17
4.3. Rôle des huiles essentielles dans la plante	18
4.4. Propriétés thérapeutiques	18
4.5. Importance économique	18
4.6. Importance dans l'industrie agroalimentaire	19
4.7. L'hydrodistillation	19
<b>5. Etude de l'activité antifongique des huiles essentielles</b>	<b>19</b>

5.1.	Technique de contact direct	20
5.2.	Méthode de micro atmosphère	20
<b>Chapitre 2. MATERIEL ET METHODES</b>		
1.	Matériel	22
1.1.	Matériel végétal	22
1.2.	Matériel Fongique	22
2.	Méthode	23
2.1.	Extraction de l'huile essentielle	23
2.2.	Calcul du rendement en huile essentielle	23
3.	L'étude de l'activité antifongique de l'huile essentielle <i>d'Origanum glandulosum vis-à-vis de Botrytis cinerea</i>	24
3.1.	Activité antifongique <i>in-vitro</i>	24
3.2.	Etude de l'activité antifongique <i>in-vivo</i>	26
3.3.	Description de l'altération des fruits	27
3.4.	Variabilité du taux de l'altération des fruits	28
3.5.	Taux d'inhibition de la croissance mycélienne	28
4.	Analyse statistique	28
<b>Chapitre 3. RESULTATS ET DISCUSSION</b>		
<b>RESULTATS</b>		29
1.	L'huile essentielle	29
2.	Etude de l'activité antifongique de l'huile essentielle d' <i>O. glandulosum</i> sur <i>B. cinerea in-vitro</i>	30
2.1.	Observation macroscopique	30
2.2.	Inhibition de la croissance Mycélienne	30
2.3.	Etude de la survie	31
2.4.	Etude microscopique des modifications de la morphologie de l'isolat de <i>Botrytis cinerea</i> après traitement	32
3.	Etude de l'activité antifongique de l'huile essentielle de <i>Origanum glandulosum</i> sur <i>Botrytis cinerea in-vivo</i>	32
3.1.	Observation de l'évolution de l'altération des fraises	32
3.2.	Incubation à 4°C	34
<b>DISCUSSION</b>		40
<b>Conclusion</b>		42
<b>Références bibliographiques</b>		44
<b>Annexes</b>		

## Introduction

Les fraises, ces fruits très appréciés pour leur goût sucré et acidulé et la fraîcheur que cela procure. La production mondiale de ce fruit a dépassé les 8 millions de tonnes en 2014. En Algérie, aucune donnée n'est présentée par la FAO, ni par les institutions publiques, concernant la production locale des fraises. Cependant, il existe une volonté nationale pour donner un élan à cette production. Selon un rapport du Ministère de l'Agriculture, du Développement Rural et de la Pêche (Oamri, 2016), un objectif d'exportation de 500 tonnes de fraises est fixé pour l'année 2019. Cependant, ces fruits sont très périssables et sujets aux attaques des champignons et bactéries phytopathogènes durant le stockage à température ambiante. La pourriture grise, due au *Botrytis cinerea* est l'une des maladies de post-récolte qui raccourcissent la durée de vie des fraises en entrepôt (Civello, et al. 1997).

Traditionnellement, les fongicides ont été largement utilisés pour empêcher le pourrissement post-récolte des fraises. De nos jours, les consommateurs de plus en plus avertis des effets potentiellement nocifs des résidus des produits chimiques sur la santé humaine et la pollution de l'environnement provoquée par les fongicides synthétiques (Pombo, et al. 2011 ; Raina-Fulton, 2015) cherchent des aliments avec le moins d'additifs chimiques et une longue durée de conservation. En outre, la législation alimentaire restreint de plus en plus l'usage des conservateurs et agents antimicrobiens d'origine synthétiques pour leurs potentielle toxicité (Brul, 1999). Ainsi, il est nécessaire de chercher de nouvelles stratégies pour contrôler la dégradation post-récolte dans les fraises (Pombo, et al. 2011). Il est devenu donc évident qu'actuellement les marchés de pesticides dans les pays industrialisés cherchent désormais des fruits et légumes, frais ou en conserve, sans additifs chimiques. (Elad, 1991).

Beaucoup de recherche se sont focalisé récemment sur des alternatives au pesticides synthétiques pour conformer aux normes de sécurité alimentaire. (Elad, 1991). Et aussi pour contrer la résistance de plus en plus tenace des souches de *B. cinerea* aux fongicides traditionnels (Gross, et al. 2016).

Les extraits de plantes et leurs huiles essentielles ont acquis un intérêt important comme potentielle alternative aux produits synthétique, et cela est dû à leurs rares effets négatifs sur la santé humaine et sur l'environnement (Chandler, et al., 1998). Beaucoup de recherches ont confirmé que les épices, aromates et leurs extraits contribuent de façon effective dans la conservation des denrées alimentaires en stockage (Abdel-Hamied, et al. 2009).

En effet, les plantes du genre *Origanum* (famille des *lamiaceae*), sont des plantes aromatiques et médicinales connues pour leurs vertus contre différentes affections, leur activité antimicrobienne en général et antifongique plus particulièrement (Baba Aissa, 2011). Cette propriété a fait l'objet de nombreuses études dans le monde, et en particulier dans le pourtour méditerranéen concernant différentes espèces du genre *Origanum*, où il est très répandu. L'essentiel de ces travaux a visé le biocontrôle de différents agents phytopathogènes d'origine fongique, à l'instar des travaux du libanais Rasha, et al., (1995) qui a prouvé l'effet inhibiteur de *O. syriacum* contre le *Fusarium oxysporum*, *Aspergillus niger* et certaines souche de *Penicillium*. Chebli, et al. (2003) a prouvé l'effet fortement inhibiteur d'*O. compactum* du Maroc sur *Botrytis cinerea*.

Dans la même perspective, la présente étude vise à valoriser un origan endémique d'Algérie, *Origanum glandulosum*, à usage courant comme aromate, ou comme plante médicinale, récolté dans la Wilaya d'El Oued, dans le biocontrôle de *Botrytis cinerea*, une moisissure responsable de la pourriture grise des fraises, une maladie à l'origine de la perte d'une grande quantité de ce fruit au champs et au cours de l'entreposage.

Ainsi, nous avons testé, en premier lieu *in-vitro*, l'activité antifongique de l'huile essentielle de l'origan contre un isolat algérien de *B. cinerea* des fraises, selon les méthodes de contact direct, ensuite selon la méthode de microatmosphère, à une température d'incubation égale à 25°C. Et la deuxième étape, s'est déroulée *in-vivo*, sur des fraises du commerce selon les deux méthodes de contact direct et celle de la microatmosphère, dans deux conditions d'incubation différentes, une à température ambiante variant de 20 à 32°C et une au réfrigérateur, nous avons par la suite évalué l'activité antifongique de l'huile essentielle et la possibilité de son intégration dans l'emballage des fraises pour prolonger leur durée de vie en entrepôt.

## 1. Origan

### 1.1. Classification

L'origan, du grec « *oros ganos* » qui signifie littéralement « joie de montagne » (Engineers, 2006) est une plante aromatique et médicinale (Baba Aissa, 2011).

La détermination des différentes espèces d'origans est assez délicate. Les termes zâatar, et sâatar répondent à plusieurs genres voisins de labiées, chez les arabes (Baba Aissa, 2011).

Selon le Département d'Agriculture des Etats-Unis (USDA), l'origan se positionne comme suit dans le règne végétal :

Règne : Plantae

Division : Magnoliophyta

Sous-division : Spermatophytina

Classe : Magnoliopsida

Superordre : Asteranae

Ordre : Lamiales

Famille : Lamiaceae Lindl.

Genre : *Origanum*

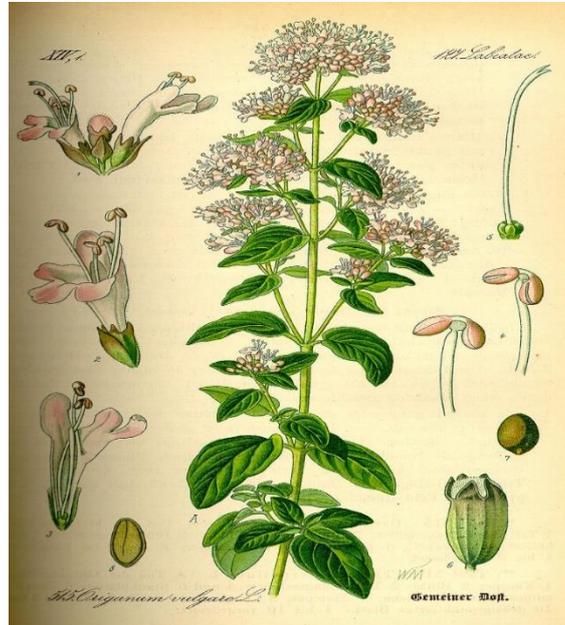
### 1.2. Distribution et écologie

L'origan *Origanum sp* est une plante qu'on trouve dans plusieurs régions du monde, en Europe, au nord-ouest de l'Afrique, en Turquie, à Chypre, en Mongolie, en Chine et en Amérique du Nord (Seidemann, 2005). Pousse sur les talus ensoleillés des pays du bassin Méditerranéen (Richard, 1992). En Algérie, c'est une plante assez répandue, représentées par deux espèces, à savoir, *O. glandulosum*, endémique algéro-tunisienne poussant dans les garrigues et broussailles et *O. floribndum* pousse en pâturages et surtout en montagne, espèce rare dans le sous-secteur du littoral et le secteur de Kabylie. Cette dernière est une plante endémique d'Algérie (Quezel, et al. 1963).

### 1.3. Description botanique

L'origan est une plante herbacée vivace ou sous-ligneuse (Figure 1), à la base. Haut de 30 à 90 centimètres, il représente des tiges dressées, carrées souvent rougeâtres, velues portant une quarantaine de branches à feuilles vert foncé, petites et ovales élargies à la base, entière, pétiolées, opposées. Les inflorescences sont en épis, eux-mêmes réunis en inflorescences composées en panicules. Les fleurs sont très petites insérées à l'aisselle de bractées rougeâtres plus longues que le périanthe à calice tubuleux à 5 dents égales et à

crolle à 2 lèvres, dont la supérieure est dressée, bilobée, presque plane et l'inférieure trilobée ; 4 étamines saillantes à anthères pourpres fruits sous la forme d'akènes, plantes très aromatiques (Richard, 1992 ; Baba Aissa, 2011 ; Quezel, et al. 1963).



**Figure 1** : Morphologie de l'origan.

#### 1.4. Culture de l'origan

L'origan préfère les sols légers, riches, secs et bien drainés qui sont quelque peu alcalins (Small et Deutsch, 2001 ; Spiridon, 2002 ; Wilson, 2007) et tolère les pH de 4,5 à 8,7 (Small et Deutsch, 2001 ; Crocker, 2005). Il exige un emplacement chaud et protégé, en plein soleil (Wilson, 2007). Laisser le sol sécher complètement jusqu'à une profondeur de 2,5 cm entre les arrosages (Small et Deutsch, 2001).

#### 1.5. Multiplication de l'origan

Les plantes d'origans sont multipliées par graines, par division racinaire et par boutures, bien que les graines ne soient pas disponibles pour de nombreuses variétés (Small et Deutsch, 2001). Semer les graines dans des boîtes à graines de 8 à 10 semaines avant la plantation en plein air. Les semis apparaissent en 4 à 7 jours, et vers la quatrième semaine, ils sont prêts à être transplantés dans des pots. Dans encore 4 - 6 semaines, ils sont prêts à planter dehors dans le jardin. Les graines peuvent également être semées directement dans le jardin au printemps après la menace du gel (Crocker, 2005).

### **1.6. Cycle biologique de l'origan**

La période de croissance de l'origan commence en mars et se termine en novembre. Dans la période la plus froide, novembre-février, aucune croissance n'a lieu. La floraison a lieu de juin à juillet. Après la coupe estivale, la plante peut avoir une repousse végétative jusqu'en octobre. Pour assurer cette repousse, il est nécessaire d'irriguer la culture pendant la période sèche, en particulier de juin à septembre. La photopériode influence la croissance de la plante et la différenciation florale. La pollinisation débute en début de juin, suivie de la fertilisation (mi-juin) et de la maturation des graines qui débutent et prennent fin en juillet (Padulosi, 1997).

### **1.7. La récolte de l'origan**

Il est possible Cueillir de petites touffes de feuilles au besoin, à tout moment de la saison (Small et Deutsch, 2001). La récolte peut avoir lieu deux à six fois par an (Spiridon, 2002). La récolte s'effectue en juin dans les conditions climatiques du sud de l'Italie (Padulosi, 1997).

Pour le séchage, cueillir les feuilles et les tiges durant la floraison. Couper les tiges à 2,5 cm du sol, réunir en bottes et suspendre dans un lieu sombre, chaud et sec. Une fois les feuilles sèches, séparer de la tige et entreposer dans un contenant hermétique. Les feuilles séchées ont une saveur plus intense que les fraîches (Small et Deutsch, 2001).

### **1.8. Utilisation et effets de l'origan**

La famille des lamiacées est très connue pour posséder des propriétés thérapeutiques (Sagdiç, 2002) dont l'origan qui a une composition chimique riche, il renferme une huile essentielle, des tanins, résine, flavonoïdes, stéroïls (Baba Aïssa, 2011). Il est aussi largement utilisé comme épice en méditerranée (Carmo, et al. 1989).

En médecine populaire, il est établi qu'il combat les flatulences et stimule la sécrétion biliaire. L'origan est utilisé pour soigner les affections respiratoires telles que toux, angine, bronchite et asthme. Il favorise l'apparition des règles. En application, l'huile diluée soulage les douleurs dentaires et articulaires. (Larousse, 2001). A dose trop élevée, l'origan peut se révéler excitant, il convient donc de surveiller le dosage en cas de troubles cardiaques ou nerveux (Baba Aïssa, 2011). Cependant, aucun risque de toxicité n'a été signalé. La sensibilisation, bien que rare, est possible (Paul Goetz, 2012).

L'effet antioxydant de l'huile essentielle d'origan est due à sa haute concentration en carvacrol, thymol,  $\rho$ -cymène et  $\gamma$ -terpène (Kosar, et *al.*, 2003 ; AL-Bandak, 2007), les deux premiers composants lui confèrent, en outre, ses activités antifongique et antiseptique (Larousse, 2001).

### 1.9. Caractéristiques de l'huile essentielle d'origan

L'huile essentielle d'origan est de couleur jaune foncé à brun clair, d'odeur phénolique agreste, très aromatique et de saveur amère, chaude et épicée. Sa composition varie sensiblement suivant les espèces et leur provenance. D'une densité de 0,870 à 0,910 (Bardeau, 2009).

#### 1.10. Composition chimique de l'huile essentielle d'origan

Il y a un certain nombre de publications se référant à la chimie d'*Origanum*. L'origan recouvre des espèces riches en monoterpénoïdes phénoliques, principalement carvacrol, parfois thymol. Les espèces d'*Origanum* sont également riches en d'autres composés, tels que divers composés phénoliques, lipides et acides gras, flavonoïdes et anthocyanides (Spiridon, 2002). Les phénols totaux le thymol et son isomère le carvacrol (Ruberto, et *al.*, 2002) représentent jusqu'à 90 % de l'essence, avec un peu de pinène, terpinéol, bornéol et des traces d'esters (Ultee et *al.* 1999 ; Bardeau, 2009).

## 2. Le fraisier

### 2.1. Classification

Selon la base de données « Plants database » du United States Department of Agriculture, *Fragaria vesca* est classé comme suit :

Règne : Plantae

Embranchement : Spermatophyta

Classe : Magnoliopsida

Ordre : Rosales

Famille : Rosaceae

Genre : *Fragaria*

Espèce : *Fragaria vesca*

## 2.2. Description botanique

Plante herbacée vivace, à feuilles assez grandes à 3 folioles ovales, largement dentées, pâles, luisantes dessus, subsoyeuses dessous, longuement pétiolées à partir d'un rhizome rougeâtre.

Les fleurs sont blanches, moyenne (12-15 mm) à 5 pétales ovales arrondis, à calice en étoile, doublé d'un calicule et à nombreuses étamines à anthères jaunes. La floraison advient entre le mois d'avril et le mois de juin. La fraise est un gros réceptacle charnu, ovoïde ou globuleux, plus large à la base, à pulpe succulente, rouge ou plus rarement blanc, et parfumée à maturité, parsemé d'akènes (les fruits à proprement parler) ; souche stolonifère émettant des racines adventives qui donnent naissance à d'autres pieds (3 à 5). (Gunier, 1892 ; Baba Aissa, 2011)



**Figure 2 :** Fleurs de Fraisier (Duep et Davidson, 2015).



**Figure 3 :** Fraisier avec fraises (Duep et Davidson, 2015).

## 2.3. Culture

Il existe deux types de fraisiers, ceux qui donnent une seule récolte de fin mai à mi-juillet, qu'on appelle non remontants, et ce qui peuvent produire de façon plus ou moins continue de juin à fin octobre et qu'on appelle remontantes. Les variétés remontantes sont en général moins rustiques que les non remontantes (Collectif, 2013)

Le fraisier se reproduit par semis ou par éclatement des touffes pour les variétés des quatre saisons, par filets, ou stolons, pour les variétés à gros fruits. Le semis est réservé aux professionnels (Caron, 1986).

Pour planter des fraisiers il est conseillé de suivre ces recommandations :

- Planter entre août et septembre dans une terre préparée de longs mois à l'avance, bien fumée, aérée et légèrement tassée. Placer un pied tous les 25 cm, en lignes espacées de 45 cm pour les fraisiers à petit feuillage ; tous les 40 cm, en lignes espacées de 70 cm pour les autres.
- Habiller les plantes en raccourcissant les racines et les grandes feuilles.
- Placer en terre non pas sans trou fait au plantoir mais dans une fente, ou une tranchée, faite à la bêche et profonde de 25 cm environ. Mettre le plant sur enterrer le bourgeon central. Arroser chaque pied.
- Eviter la concurrence des mauvaises herbes en paillant le sol avec une feuille. Maintenir les bords du plastique avec de la terre.
- Pendant la floraison et la fructification, arroser régulièrement sans saturer d'eau, le sol. (Caron, 1986)

Les fraisiers peuvent être cultivés dans tous les sols riches, fumés à l'avance, bien drainés et retenant bien l'humidité, à l'exception des sols très calcaires. Ils seront de préférence plantés en exposition plein sud. Les variétés précoces seront placées à l'abri des vents froids, car elles craignent particulièrement les gelées tardives (Collectif, 2013).

#### **2.4. La récolte des fraises**

Les fraises sont cueillies lorsqu'elles sont d'une coloration rouge uniforme et encore fermes. Il est toujours possible de garder les fraises quelques jours dans un réfrigérateur, néanmoins elles sont bien meilleures viennent d'être cueilles. La cueillette s'étend sur 3 semaines pour les variétés non remontantes et sur une période de 2 mois pour les variétés remontantes. Elle s'échelonne sur 4 ou 5 mois pour les variétés des quatre saisons. Un plant de fraisier à gros fruits remontant (ou non) produit environ de 200 à 300 g de fruits par pied dans la saison. Pour une meilleure qualité organoleptique, il est conseillé de cueillir les fraises avec leurs collerettes de sépales verts adhérente au fruit. Ainsi l'eau ne pénétrera pas à l'intérieur de fruit. Ce qui nuirait gravement au goût. (Polese, 2005).

## 2.5. Qualité nutritionnelle et composition chimique des fraises

La fraise est un aliment d'index glycémique faible 40 il en faut 649 grammes de fruits pour avoir 50 grammes de glucides. La fraise renferme 90% d'eau (Polese, 2005) et contient entre 8 et 11 grammes de glucides dans 100 grammes de fruits, dont 2 grammes de saccharose, 3,5 grammes de glucose et autant de fructose et 2g de fibre, pour un apport calorique à l'ordre de 35 kilo calories (Médart, 2009).

Pour la teneur en vitamine, 55 à 60 Mg de vitamine C (acide ascorbique) par 100g cette teneur est égale à celle des agrumes (Médart, 2009). Sa teneur en vitamines du groupe B est tout à fait moyenne, mais notions la présence de deux vitamines assez rares dans les fruits : les vitamines B8 et B9 (acide follique). Le pH des fraises mûres se situe à environ 3,4 (Dupin, 1992) cela est dû à la présence de l'acide citrique. Bien que relativement faible, l'apport de minéraux est assez diversifié : potassium, calcium, fer et magnésium sont parmi les plus importants. On trouve aussi des oligoéléments plus rares comme le bore, le cobalt, le sélénium. Les fibres sont constituées en majorité par les pectines : ce sont elles qui donnent à la chair sa consistance moelleuse (Polese, 2005).

La fraise est riche en polyphénols, qui sont des composés végétaux possédant un pouvoir anti-oxydant, dont les anthocyanes qui sont responsables de sa couleur rouge (Médart, 2009). Les feuilles contiennent des tanins et des flavonoïdes (Baba Aissa, 2011).

## 2.6. Propriétés thérapeutiques

Comme beaucoup de plantes, le fraisier a d'importantes propriétés thérapeutiques, Baba Aissa, (2011) parle des effets des rhizomes et des feuilles qui sont, astringents (stomatite, gingivite) et diurétiques. Des fraises qui sont anti-inflammatoires (rhumatismes, goutte), antianémiques, antioxydant, dépuratives, rafraîchissantes, minéralisantes, toniques. Aussi, le thé de feuilles de fraisier est une boisson agréable aux propriétés curatives. Il cite aussi qu'un médecin américain du 19e siècle, Blackburn, assura qu'il avait obtenu des résultats satisfaisants, dans le traitement de dysenteries graves, avec de la décoction de feuilles de fraisier.

## 2.7. Production de fraises

Aucune donnée concernant la production des fraises en Algérie n'est recensée par la FAO, cependant la direction des services agricoles de la Wilaya de Skikda a fait état d'une production 12.985 quintaux de fraises en 2017 contre 25.075 quintaux au cours de

l'exercice de 2016 Le rendement moyen par hectare a atteint 66 quintaux à travers une superficie totalisant 303 hectares contre 80 hectares l'année dernière, où 285 hectares ont été réservés à la culture de ce fruit (APS, 2017).

9 118 336 de Tonnes sont produites dans le monde en 2016 selon les statistiques de la FAO, les productions des 10 plus grands producteurs au monde sont présentées dans le tableau suivant :

**Tableau 1** : la production européenne de fraises durant la période 2010-2016 (FAO, 2017).

Pays	2016
Etats-Unis	1420570
Mexique	468248
Egypte	464958
Turquie	415150
Chine	3801865
Espagne	366161
Russie	197523
Pologne	196972
Corée du sud	196122
Japon	159000

## 2.8. Maladies du fraisier

Le fraisier est sujet à de nombreuses maladies dues aux moisissures et bactéries, le tableau suivant (tableau 2) en regroupe les plus importantes :

**Tableau 2 :** Tableau récapitulatif des ravageurs du fraisier.

Maladie	Agent causal	Référence
Coeur rouge des racines du fraisier	<i>Phytophthora fragariae</i>	(Hickman, 2002)
Taches noires du fraisier	<i>Colleotrucum acutatum</i> ,	(EPPO, 2002)
Verticilliose	<i>Verticillium dahliae</i>	(EPPO, 2002)
Pourriture noire	<i>Rhizoctonia fragariae</i>	(Husaini, et al., 2016)
Moisissure chevelue	<i>Rhizopus stolonifer</i>	(Husaini, et al., 2016)
Pourriture grise	<i>Botrytis cinerea</i>	(Husaini, et al., 2016)

## 3. Monographie de *Botrytis cinerea*

### 3.1. Généralités

Le genre *Botrytis* dont l'espèce *B.cinerea* sont des agents phytopathogènes fongiques s'attaquant aux plantes de pépinière, aux fruits, aux légumes, aux plantes ornementales, ainsi que les denrées alimentaires stockées (Elad et al. 2007). Il est transporté par l'air, et il peut s'attaquer à plus de 200 espèces végétales (Jarvis, 1980) dont le fraisier. C'est un ascomycète omniprésent, polyphage et d'une grande variabilité génétique (Elad et al. 2007).

*Botrytis cinerea* est l'agent responsable de la pourriture grise. Ce dernier peut entraîner la destruction partielle ou totale de la plante hôte, et dans certains cas de la récolte (Husaini et al. 2016).

### 3.2. Classification

Le genre *Botrytis* comprend 22 espèces dont la plupart ont un spectre d'hôtes restreint comme *B. tulipae* (tulipes), *B. fabae* (légumineuses) ou *B. squamosa* (oignons) (Hennebert,

1973). *Botrytis cinerea* est l'anamorphe (phase asexuée) du téléforme (phase sexuée) *Botryotinia fuckeliana* (Bautista-Baños, 2014).

Selon la base de données *Genbank* du NCBI, le *Botrytis cinerea* peut se présenter sous ses deux formes qui se positionnent comme suit :

- Forme anamorphe:

**Règne :** Fungi

**Embranchement :** Ascomycota

**Sous-embranchement :** Pezizomycotina

**Classe :** Leotiomyceta

**Sous-classe :** Leotiomycetes

**Ordre :** Helotiales

**Famille :** Sclerotiniaceae

**Genre :** *Botrytis*

**Espèce :** *Botrytis cinerea*

- Forme téléforme :

**Règne :** Fungi

**Embranchement :** Ascomycota

**Sous-embranchement :** Pezizomycotina

**Classe :** Leotiomycetes

**Sous-classe :** Leotiomycetidaey

**Ordre :** Helotiales

**Famille :** Sclerotiniaceae

**Genre :** *Botryotinia*

**Espèce :** *Botryotinia fuckeliana* (de Bary) Whetzel

### 3.3. Morphologie

Le mycélium comprend des filaments articulés, grisâtres ou olivâtres, cylindriques, dont le diamètre varie considérablement suivant les conditions de développement des hyphes. Lorsque le mycélium est en fructification, il produit des touffes de conidiophores grisâtres

(Figure 2). Le *B. cinerea* peut produire du mycélium, des spores asexuées ou conidies, des spores sexuées (ascospores) ainsi que des sclérotés (Viennot-Bourgin, 1965).



**Figure 4** : Observation microscopique du mycélium et des conidiophores de *Botrytis cinerea* (Girard, 2010).

### 3.4. Biologie

Le *Botrytis cinerea* pénètre habituellement les tissus de la plante à un stade précoce de sa croissance, il demeure en quiescence pour de longues durées, quand les conditions du milieu et le stade physiologique de son hôte deviennent propices, il croît rapidement et les symptômes apparaissent (Tian, 2011).

#### 3.4.1. Reproduction

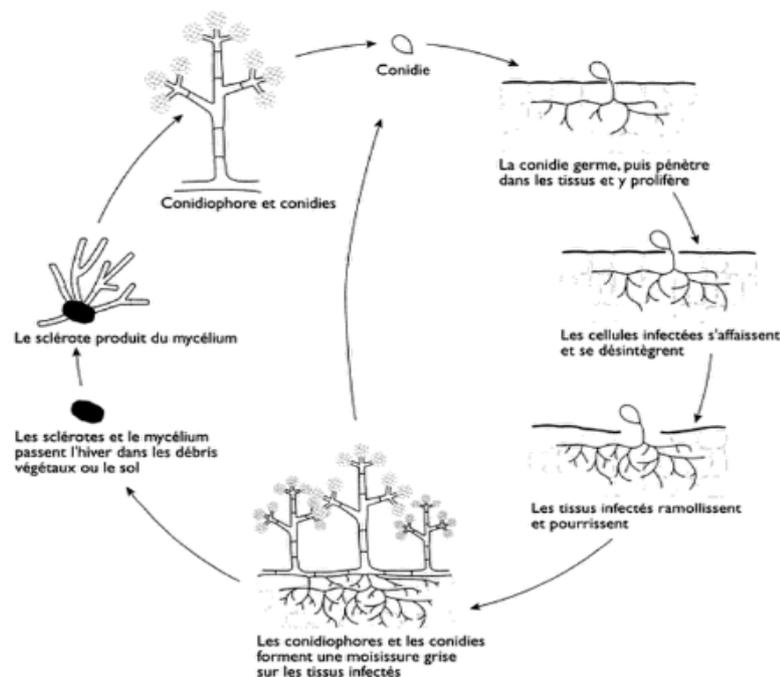
##### Reproduction sexuée

Le croisement d'isolats sexuellement compatibles portant des allèles de type sexuel différents, MAT1-1 et MAT1-2 donne des apothécies (Faretra et *al.* 1988). Elles contiennent des asques linéaires (Beever et Weeds, 2004), où chaque asque contient quatre paires d'ascospores. Les noyaux de chaque paire de ces derniers sont génétiquement identiques car produits par une division mitotique de l'un des quatre produits de la méiose (Faretra et Antonacci, 1987 ; Lorenz et Eichhorn, 1983). Bien que les apothécies soient rarement observées au champ (Faretra et Antonacci, 1987; Faretra et *al.* 1988), certaines études montrent que les ascospores peuvent avoir une importance épidémiologique. Par exemple chez *B. cinerea*, les ascospores libérées des apothécies peuvent infecter les feuilles d'oignon au champ et par conséquent, servir de source d'inoculum primaire du champignon (Lorbeer et *al.*, 2004). D'autre part, de récentes études de génétique des populations semblent indiquer que la reproduction sexuée est plus importante que

généralement supposée (Beever and Weeds, 2004). Malgré la rareté d'observation des apothécies dans la nature, elles peuvent être obtenues au laboratoire (Faretra et al., 1988). Leur production est déclenchée par des conditions stressantes défavorables à la multiplication végétative comme par exemple une température élevée, une humidité relative réduite ou un appauvrissement nutritionnel du milieu (Urbasch, 1983; Urbasch, 1984; Urbasch, 1985a; Urbasch, 1985b). Parfois, ce mode de multiplication peut disparaître et laisser place à une prolifération mycélienne blanche sous forme de "toile" (Viennot-Bourgin, 1965).

### Reproduction asexuée

Lorsque les conditions deviennent favorables, *B. cinerea* fructifie pour donner des conidies, elles sont produites dès le printemps dans le cas de culture en plein champ. En revanche, elles peuvent être produites en continue, selon les conditions climatiques et dans le cas de cultures sous abris. Leur libération est favorisée par un climat humide, puis elles sont transportées par le vent, la pluie et les insectes (Holz et al. 2004).



**Figure 5** : Cycle asexué de *Botrytis cinerea* (Claude et al. 1999).

#### 3.4.2. Forme de conservation

Lorsque les conditions deviennent défavorables au développement de mycélium et de conidies, des sclérotés se forment. Ils sont constitués par du mycélium agrégé blanchâtre.

En vieillissant, ils durcissent et deviennent noirâtres, composées d'un cortex de cellules épaisses formant une mince barrière de cellules pseudo-parenchymateuses et d'une large médulla centrale composée d'hyphes filamenteux (Coley-Smith, 1980).

Au printemps, les sclérotés peuvent germer et produire du mycélium ou des conidies (figure 5). Ils peuvent également être à l'origine de la formation des apothécies (Coley-Smith et Cooke, 1971). Van den Ende et Pennock (1996) ont observé que la formation de sclérotés sur les débris végétaux de lys se produit préférentiellement après la récolte entre octobre et décembre. La large gamme de température (5-25° C) à laquelle sont formés les sclérotés suggère que leur formation au champ est rarement limitée par la température (Lorbeer et *al.* 2004).

### **3.5. Pourriture grise de la fraise**

D'après Husaini et *al.* (2016), entre 80 à 90% des fleurs et fraises sont atteintes par la pourriture grise durant les périodes pluvieuses et nuageuses, juste avant ou pendant la cueillette ou l'entreposage.

Cet agent phytopathogène necrotrophe s'attaque aux jeunes pousses, feuilles, fleurs et fruits, il est plus virulent sur les tissus âgés et sénescents, il a généralement accès à ces derniers pendant la période de floraison. Les fleurs sont infectées en général pendant l'épanouissement, et le pathogène trouve accès aux fraises à un stage précoce de leur développement. Il reste en vie latente pendant une longue période avant de décomposer rapidement les tissus quand les facteurs environnementaux deviennent propices, tels que l'humidité relative et le stade physiologique du fruit.

Après infection, le champignon déforme le fruit, l'assèche et le couvre rapidement d'une couche poudreuse de spores (Figure 6), ce qui donne une coloration grise aux fraises. En général, les parties les plus susceptibles d'être infectées par cet agent sont les fraises atteintes, ou celles qui sont en contact avec la terre, ou bien les feuilles mortes en cas de feuillage dense.



**Figure 6** : Pourriture grise sur une fraise (Romanazzi et *al.* 2016)

### 3.6. Lutte et résistance

La longue période de latence du *B. cinerea* après l'infection et jusqu'à l'apparition des symptômes rend le contrôle de la pourriture grise très difficile, et la méthode la plus commune de lutte contre *B. cinerea* reste la pulvérisation de fongicides pendant la floraison (Husaini et *al.*, 2016). Selon Elad et *al.* (2007), cette lutte chimique se fait par le biais de plusieurs familles de fongicides, dont le dichlofluanide, le thirame, le fluazinam, le boscalid et les strobilurines. Toutefois, nombre de classes de fongicides n'ont pas réussi à contrôler ce champignon à cause de sa plasticité génétique (Williamson et *al.*, 2007). La résistance d'une proportion considérable de populations de *B. cinerea* aux fongicides devient de plus en plus problématique (Blancard, 2009 ; Leroy et *al.*, 2011 in Dean et *al.*, 2012). Elad en 1991 a prouvé que *B. cinerea* développe une résistance envers certains fongicides spécifiques (benzimidazoles, dicarboximides, diéthofoncarbendazole et les inhibiteurs de synthèse des stérols) dans un temps relativement court.

De nouvelles stratégies de contrôle biologique, telles que l'utilisation des antagonistes (bactéries et levures) ou des pesticides d'origine naturelle (extraits de plantes) sont en cours d'investigation (De Boer et *al.*, 2003 in Lorbeer et *al.*, 2007).

D'après Husaini et *al.* (2016), une autre alternative serait l'utilisation de cultivars résistants, cependant, Il y a eu peu de succès dans le croisement et la sélection de ces derniers, car, la difficulté majeure était l'absence de gènes naturels de résistance à la pourriture grise chez le fraisier, rendant vaines toutes tentatives d'induire une résistance.

Le développement de la biotechnologie a créé de nouvelles opportunités pour améliorer la défense contre les maladies du fraisier en effectuant des modifications génétiques.

Vellicce et *al.*, (2006) a obtenu des fraises transformées (cultivar “pajaro”) en utilisant trois gènes liés à la défense, obtenus du haricot *Phaseolus vulgaris* et du tabac *Nicotiana tabacum*. Les résultats ont montré que le gène du haricot était une stratégie efficace contre *B. cinerea*. (Husaini et al., 2016).

### **3.7. Importance économique**

Selon Gullino (1992), ce champignon est responsable de lourdes pertes économiques, il affecte de nombreuses productions végétales en culture sous serre ou en plein champ, comme par exemple : le raisin, la pomme, la poire, la cerise, la fraise et le kiwi en production fruitière, l’aubergine, la carotte, la laitue, le concombre, le poivron, la tomate, la courgette en production légumière ou des plantes ornementales comme la rose.

Il est économiquement considéré comme un problème phytosanitaire majeur en viticulture dans le monde (Martinez, 2005), on estime les pertes mondiales dues à *B. cinerea* sur vigne à 2 milliards \$ par an (Elmer, 2004).

Entre procédures culturales, botryticides, fongicides à large spectre et contrôle biologique, les dépenses à l’échelle mondiale dans le contrôle du *B. cinerea* dépassent un milliard d’euros par an. Malgré cela, les pertes en quantité et en qualité au cours des différentes étapes de la chaîne de vente seraient encore très importantes (Dean et *al.* 2012). Le marché mondial des produits de contrôle de *B. cinerea* est estimé à 15-25 millions de dollars par an (Elad, 2004).

## **4. Huiles essentielles**

### **4.1. Définition**

Les huiles essentielles appelées aussi essences (Bonnafous, 2013) sont des mélanges de substances aromatiques produites par de nombreuses plantes et présentent sous formes de minuscules gouttelettes dans les feuilles, la peau des fruits, la résine, les branches, les bois. Elles sont présentées en petites quantités par rapport à la masse du végétal : elles sont odorantes et très volatiles, c’est-à-dire qu’elles s’évaporent rapidement dans l’air (Padrini et *al.* 2003).

L'association française de normalisation définit une huile essentielle comme étant un produit obtenu d'une matière première végétale, soit par entraînement à la vapeur d'eau, soit par des procédés mécaniques à partir de l'épicarpe des agrumes, soit par distillation à sec. Elle est ensuite déparée de la phase aqueuse par des procédés physiques (AFNOR, 2000).

Il est important de distinguer entre les huiles essentielles, les huiles fixes (huile d'olive...) et les graisses contenues dans les végétaux. En effet, seules les huiles essentielles sont volatiles, ce qui les différencie des huiles fixes et graisses. Elles se distinguent des huiles fixes par leurs compositions chimiques et leurs caractéristiques physiques. Elles sont fréquemment associées à d'autres substances comme les gommes et les résines (Bekhechi et al. 2014).

#### **4.2. Localisation dans la plante**

Les HE peuvent s'accumuler dans des cellules isolées qui se distinguent des autres cellules par leur teinte plus jaune et leurs parois épaisses, légèrement subérifiées. C'est le cas chez les Lauracées. Elles peuvent former de fines gouttelettes parsemant le protoplasme de cellules épidermiques (épiderme supérieur des pétales de Rose). Mais généralement les épidermes des pétales de fleurs odorantes ne contiennent pas de grosses réserves d'essences. Elles sont vaporisées de façon continue au cours de leur formation (Werker et al. 1993).

#### **4.3. Propriétés thérapeutiques**

Plusieurs propriétés thérapeutiques sont attribuées aux huiles essentielles. D'après Bec (2013), elles seraient « antibactériennes, antivirales, antifongiques, expectorantes, mucolytiques, antispasmodiques, antalgiques, anti-inflammatoires, stimulantes calmantes nerveuses et cicatrisantes ». Les huiles essentielles peuvent être employées de manières diverses selon l'huile en question par voie orale, par voie cutanée.

Il est important de noter que dans la totalité des guides d'utilisation des huiles essentielles, des avertissements sont mis en avant pour attirer l'attention des lecteurs sur les dangers liés à leur mauvaise utilisation.

#### **4.4. Importance économique**

L'importance économique que représentent les huiles essentielles du fait de leurs propriétés biologiques, thérapeutiques, odoriférante, de leur impact au niveau de

l'environnement et de leurs multiples utilisations dans diverse industries, suscite un intérêt croissant en biologie et même en chimie organique (Hammiche, 1982).

#### **4.5. Importance dans Les Industries Agroalimentaires**

L'activité antimicrobienne des extraits de plantes utilisées dans l'assaisonnement des aliments a été reconnue depuis longtemps, c'est pour cela, que l'on pense de plus en plus à les utiliser dans la conservation des denrées alimentaires, sans pour autant en dénaturer le goût puisque ces aromates entrent dans la composition de préparations alimentaires. C'est ainsi que l'on trouve le laurier dans certaines conserves et dans le miso qui est un met japonais traditionnel (Kurita, et *al.* 1982). Le thym peut être utilisé dans diverses préparations alimentaires comme le smen par exemple (Ismaili Allaoui, 1987).

Busta et Foegeding en 1983, ont eux aussi étudié la conservation alimentaire par les épices les aromates et les huiles essentielles qui sont rajoutés aux aliments pour rehausser le goût qui ont aussi un effet antimicrobien empêchant les contaminants alimentaires de se développer. En effet, tous les secteurs alimentaires sont consommateurs : alcools, boissons non alcoolisées, confiserie, produits laitiers, produits carnés, sauces, soupes, produits de boulangerie, sans oublier la nutrition animale (Bruneton, 2009)

Il est à noter que les huiles essentielles sont aussi utilisées dans le milieu hospitalier pour la désinfection des locaux. En 1979, Mallea et *al.* ont rapporté l'utilisation du «paragam ». Ce produit se présente sous forme de bombe qui diffuse un brouillard de particules de l'ordre de 10 µm, d'une solution volatile à base d'essence naturelle (citron, lilas, citronnelles), d'alcools (salol, terpinéol), d'acide benzoïque et surtout d'huiles hydrogènes (75%). Le pouvoir bactéricide, acaricide et fongistatique sont établis. Il s'est révélé sans aucune toxicité pour l'homme.

#### **4.6. L'hydrodistillation**

C'est le seul procédé retenu par la pharmacopée européenne (Mimica-Dukic, et *al.* 2004) car elle convient aux huiles ayant une forte composante volatile qui peut être facilement transportée par des particules de vapeur d'eau en mouvement. (Padrini ; Lucheroni ;1996), elle est fortement préconisée du fait qu'elle produit des substances volatiles facilement analysables par chromatographie en phase gazeuse et exigeant une technologie relativement simple, donc un coût plus bas ainsi qu'une reproductibilité facilement contrôlable. (Benjlali,2004). D'autant plus que la plupart d'huiles essentielles sont

obtenues par distillation, à l'exception des huiles essentielles d'hespéridés (citron, orange, etc) et l'huile de cade (Belaïche, 1979).

Le matériel végétal est immergé dans un alambic rempli d'eau, le mélange est porté à ébullition à pression atmosphérique, ce qui permet la libération des molécules odorantes que renferment les cellules végétales. Le mélange bouille lorsque la somme des tensions de vapeur de chacun des constituants est égale à la pression d'évaporation, elle est donc inférieure à chacun des points d'ébullition des substances pures. Ainsi le mélange azéotropique « eau + huile essentielle » distille à une température égale 100°C à pression atmosphérique, les vapeurs hétérogènes sont condensées sur une surface froide et l'huile essentielles se sépare par différence de densité. On les récupère alors par décantation (Bruneton, 1999 ; Franchomme et Penoel, 1990).

#### **4.7. Rendement en extrait de plante**

Le rendement en extrait d'une plante est le pourcentage de la quantité de l'extrait par rapport à la quantité du matériel végétal à partir duquel l'extraction a été faite. À titre d'exemple, le rendement en extrait de plante est souvent exprimé en millilitre d'huile essentielle par 100 g de matière sèche (Yuan et *al.* 2016) ou bien par 100 g de plante séchée (Roby et *al.* 2013).

### **5. Etude de l'activité antifongique des huiles essentielles**

L'étude de l'activité antifongique d'un produit est la détermination de son pouvoir potentiel d'arrêter, ou de diminuer le développement d'un champignon pathogène. Cela de manière sélective et avec un minimum d'effets secondaires sur l'hôte (Lion, 2017). Cette étude est communément réalisée sur milieu gélosé (Sawai, et *al.* 2004).

Il est scientifiquement établi que certaines plantes possèdent une activité antimicrobienne, d'après la bibliographie. Pour déterminer l'activité antimicrobienne de l'huile essentielle plusieurs techniques expérimentales sont rapportées par la littérature, celles du contact direct et de la micro atmosphère sont les plus présentées.

#### **5.1. Technique de contact direct**

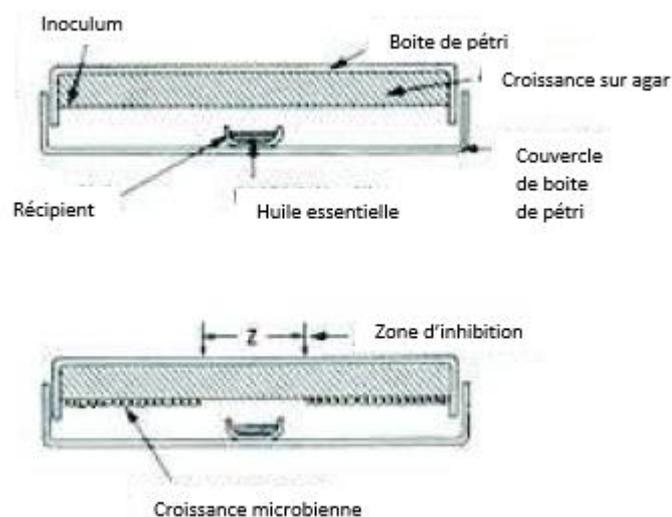
La technique de contact direct est utilisée pour étudier le pouvoir inhibiteur des huiles essentielles vis-à-vis des champignons phytopathogènes (Messgo-Moumene, et *al.* 2014 ; Lambert Sameza, et *al.* 2014). Cette méthode est l'une des plus utilisées dans la détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) d'un agent antimicrobien

(Wiegand, et *al.* 2008). Elle consiste à placer un disque mycélien est placé au centre d'une boîte de Pétri contenant l'huile essentielle ou ses composants ou n'importe quel autre agent antimicrobien dans un milieu solide gélosé, (Sawai, et *al.* 2004). Les cultures des microorganismes contenant les huiles essentielles sont accompagnées par les cultures témoins négatives, où les huiles sont remplacées par de l'eau ou du solvant. Biondi, et *al.* 1993 proposent l'utilisation de cultures témoins positives contenant un fongicide standard pour évaluer la sensibilité des souches testées comme témoin positif.

## 5.2. Méthode de micro atmosphère

Cette méthode se focalise sur l'activité de la fraction volatile d'un produit à tester (huile essentielle principalement) sur l'agent pathogène étudié (Inouye, et *al.* 2006). Dans ce cas, le produit étudié (huile essentielle) n'est pas dissout dans l'agar, ni mis en contact direct avec l'agent pathogène, mais diffusé sur du papier stérile qui est déposé sur le couvercle de la boîte de Pétri ensemencée, celle-ci étant tournée à l'envers et hermétiquement fermée (Baser, et *al.* 2010 ; Ben Arfa, et *al.* 2006).

Après incubation une zone d'inhibition se forme ce qui correspond à l'activité antimicrobienne (figure 7) (Inouye, et *al.*, 2001 ; Nakahara, et *al.*, 2003). Cette méthode reste moins citée que d'autres, car les auteurs l'ayant employée ou qui se sont intéressés à la phase gazeuse des huiles essentielles sont peu nombreux (De Billerbeck, 2000).



**Figure 7 :** Illustration de la méthode de microatmosphère (Zaika, 1988).

## MATERIEL ET METHODES

L'expérimentation a été réalisée dans le laboratoire de recherche sur les plantes aromatiques et médicinales de l'université Saad Dahleb de Blida, dans la période allant du 23 avril jusqu'au 20 juin.

### 1. Matériel

#### 1.1. Matériel végétal

Les parties feuillues et les sommités florales de l'origan *Origanum glandulosum* ont été récoltées dans la région d'El Oued puis séchées à l'abri de la lumière et à la température ambiante.

Les fraises sont issues du marché local de Blida.

#### 1.2. Matériel Fongique

Un isolat fongique de *Botrytis cinerea* nous a été parvenu. Il a été prélevé à partir de quelques échantillons de fruits d'origine commerciale. Son identification a été basée sur la caractérisation culturale et morphologique de cultures monosporales purifiées, après 2 semaines d'incubation sur milieu PDA à 25°C. Cette identification nous a été communiquée par le Dr. Messgo-Moumene, du laboratoire de recherche des Plantes Médicinales et Aromatiques, de la faculté SNV de l'université de Blida 1.



**Figure 7 : une fraise atteinte de *Botrytis cinerea***

## 2. Méthode

### 2.1. Extraction de l'huile essentielle

L'extraction de l'huile essentielle d'*O. glandulosum* a été réalisée par hydrodistillation en utilisant un appareil de type Clevenger selon la technique décrite par la Pharmacopée Européenne (1997).

Elle consiste à introduire 100 g de la plante séchée dans un ballon en verre de la capacité de 1000 ml puis rempli d'eau du robinet jusqu'à immersion totale de la matière végétale. Le ballon est ensuite mis à chauffer dans un chauffe-ballon électrique. La durée de l'extraction est de deux heures, cela a été déterminé après un premier essai.

L'huile essentielle a été récupérée dans des tubes Eppendorf stérilisés d'une capacité de 2ml, ces derniers seront enveloppés avec du papier aluminium puis conservés à une température de 4°C.

### 2.2. Calcul du rendement en huile essentielle

Le rendement en huile essentielle de la plante est calculé en rapportant la masse de l'huile extraite à la masse de la matière végétale utilisée, selon la formule décrite par Benabdelkader et *al.* (2011) :

$$\text{RHE (\%)} = \frac{M}{M_0} \times 100$$

Avec :

- RHE (%) : Rendement en huile essentielle (en %).
- M : Masse de l'huile essentielle (en gramme).
- M0 : Masse de la matière végétale sèche utilisée (en gramme).

### 3. L'étude de l'activité antifongique de l'huile essentielle d'*Origanum glandulosum* vis-à-vis de *Botrytis cinerea*

#### 3.1. Activité antifongique *in vitro*

L'activité antifongique de l'huile essentielle d'*O. glandulosum* sur *B. cinerea* prélevé sur les fraises locales, a été mis en évidence *in vitro* dans des conditions expérimentales selon deux méthodes, à savoir, le contact direct, en incorporant l'huile essentielle dans le milieu de culture, et selon la méthode de micro-atmosphère, qui consiste à évaluer l'effet de la fraction volatile de l'huile essentielle sur le micro-organisme. Les isolats fongiques ont été incubés dans une étuve à 25°C pendant 7 jours.

Pour les deux méthodes 5 répétitions ont été réalisées.

Un témoin a été préparé avec du milieu PDA (Annexe 1) frais inoculé avec un disque mycélien prélevé d'une culture mycélienne pure de *B. cinerea* âgée de 15 jours.

##### 3.1.1. Préparation de l'émulsion de l'huile essentielle dans de l'eau-Agar :

On prépare d'abord une solution d'Agar-agar dans de l'eau à 0,2%, en Pesant 2 g d'agar-agar auxquels est Ajouté 1 L d'eau distillée. La solution est stérilisée à l'autoclave à 100 kPa pendant 20 minutes.

Ensuite la réparation de la concentration 1/250 v/v (0,4 %) de l'huile essentielle pour chaque boîte de Pétri commence par la préparation de l'émulsion qui commence par l'ajout de 0,06 ml de l'huile essentielle à 1,5 ml d'eau-agar autoclavé (dilution 1/25 v/v). Agiter l'émulsion vigoureusement au vortex. Ensuite, verser 1,5 ml de l'émulsion précédente dans la boîte de Pétri. Et ajouter 13,5 ml du milieu PDA en surfusion dans la même boîte. Faire des mouvements en 8 soigneusement pour homogénéiser le milieu. Laisser refroidir avant inoculation.

##### 3.1.2. Technique de contact direct

Cette méthode consiste à mettre l'huile essentielle à évaluer dans le milieu de culture, pour ce faire, une émulsion à 4% de l'huile essentielle étudiée a été préparée à base d'une solution d'eau-agar à 0,2%, les deux phases sont par la suite agitées au vortex, l'émulsion résultante est ajoutée à 13,5 ml de milieu PDA en surfusion, la dilution finale de l'huile essentielle est de l'ordre de 0,4%.

Les milieux témoins sont préparés avec 1,5 ml d'eau-agar, sans l'ajout d'huile essentielle, et 13,5 ml de milieu PDA en surfusion

Les préparations précédentes seront coulées dans des boîtes de pétri, dans les conditions d'asepsie, sous hôte à flux laminaire. Elles seront mises à refroidir pour être inoculées par la suite.

L'inoculation est réalisée en prélevant un disque mycélien de 5mm d'une culture pure de *Botrytis cinerea* âgée de 15 jours.

Les boîtes de Pétri inoculées sont scellées par du parafilm, codifiées et mises à incuber dans une étuve réglée à une température de 25°C pendant 7 jours. La croissance mycélienne des cultures a été suivie quotidiennement. Elle est déterminée par la mesure de deux diamètres perpendiculaires passant par le centre du disque mycélien déposé.

La description morphologique de l'isolat de *B. cinerea* étudié repose sur l'observation vitale des cultures développées dans les conditions expérimentales décrites.

La sporulation est exprimée par le comptage des spores par le biais de la cellule de Malassez après 12 jours d'incubation, ainsi que la survie et la production de sclérotés après 1 mois d'incubation. Et cela pour pouvoir déterminer l'effet du traitement comparativement aux témoins. (Laghchimi et al., 2014)

### 3.1.3. Technique de micro-atmosphère

Cette technique permet l'évaluation de l'activité antifongique de la fraction volatile de l'huile essentielle étudiée, vis-à-vis de l'isolat de *B. cinerea* étudié, par mise à diffusion de cette dernière sans être en contact direct avec les isolats.

Suivant le protocole décrit par Laghchimi et al. (2014), les boîtes de Pétri sont inoculées aseptiquement avec un disque mycélien de *B. cinerea*, dans du milieu PDA pure préalablement coulé et refroidi. L'huile essentielle est mise en émulsion selon le même mode opératoire précédant, on en imbibe ensuite des disques de papier buvard de 80 mm de diamètre, le disque est par la suite fixé sur le couvercle de la boîte de pétri, cette dernière est ainsi scellée avec du parafilm et est mise à incuber à l'envers pour favoriser la diffusion des molécules volatiles.

L'inhibition de la croissance mycélienne est déterminée en mesurant les moyennes des diamètres des zones d'inhibition après 7 jours d'incubation (Tripathi et al., 2008).

### 3.1.4. Inhibition de la croissance mycélienne

Le taux d'inhibition de la croissance mycélienne est calculé selon la formule suivante (Tripathi et *al.*, 2008) :

$$IM = \frac{d_c - d_t}{d_c} \times 100$$

Avec :

- IM : Pourcentage de l'inhibition mycélienne.
- $d_c$  : Moyenne des diamètres des colonies fongiques des témoins (en mm).
- $d_t$  : Moyenne des diamètres des colonies traitées (en mm).

### 3.1.5. Etude de la survie

Pour déterminer la survie ou non des isolats traités, un disque mycélien est repiqué depuis les cultures précédemment inhibées dans des boîtes contenant du milieu de culture PDA frais. Au bout de 7 jours d'incubation, deux résultats peuvent être observés : soit l'inhibition persiste, l'huile essentielle est alors dite fongicide, ou il y a reprise de la croissance mycélienne et donc on parle d'un effet fongistatique dans ce cas.

### 3.1.6. Modifications de la morphologie de l'isolat de *Botrytis cinerea* inhibé par l'huile essentielle d'*Origanum glandulosum*

Des observations vitales au microscope photonique ont été réalisées pour les isolats de *B. cinerea*, préalablement inhibés, pour déterminer les modifications structurales qu'ils ont subies sous l'effet de l'huile essentielle. Elles sont ensuite comparées aux observations des cultures témoins.

### 3.2. Etude de l'activité antifongique de l'huile essentielle d'*Origanum glandulosum* vis-à-vis de *Botrytis cinerea in-vivo*

La deuxième étape de notre étude consiste en l'application des résultats obtenus *in vitro* sur les fraises.

Les fraises du commerce ont été stérilisées dans une solution d'eau de javel à 2,5%, pendant 10 minutes, elles sont ensuite soumises à des rinçages successifs à l'eau du robinet pour éliminer les résidus de l'eau de javel.

Les fraises pré-stérilisées ont été traitées selon 2 méthodes, le contact direct et la microatmosphère. La première consiste en une aspersion des fraises d'une émulsion d'huile

essentielle d'*O. glandulosum* dans de l'eau-Agar, d'une concentration de 4%. Concernant la technique de la micro-atmosphère, l'huile essentielle est mise en émulsion à 4% puis incorporée à 13,5 ml d'un gel inerte à base d'Agar-Agar et d'eau, ainsi l'huile est mise à diffuser dans l'emballage dans lequel les fraises sont conservées. Les deux traitements, sont répétés selon deux conditions d'incubation, à température ambiante égale à 25°C et à froid à 4°C.

Le témoin est constitué de fraises rincées à l'eau distillée stérile. Chaque traitement est répété 9 fois pour les deux conditions d'incubation.

### **3.2.1. Technique de contact direct**

Une émulsion à 4% d'huile essentielle (Annexe 3), a été préparée puis aspergée directement sur les fraises, qui sont ensuite mises dans des boites en plastique, et sont couvertes et scellées avec du ruban adhésif. Elles sont mises à incuber selon les deux conditions d'incubation décrites préalablement, avec 9 répétition à 4°C et 9 répétition à 25°C.

### **3.2.2. Technique de micro-atmosphère**

Cette technique a pour but de tester l'activité antifongique de l'huile essentielle testée sur l'isolat.

L'émulsion d'huile essentielle (Annexe 3) est incorporée dans un gel inerte à 2% d'agar dans de l'eau distillée en surfusion, le mélange est ensuite coulé dans des boites en plastique du commerce stérilisé aux rayons ultra-violet pendant 10 minutes. Après solidification, le gel est recouvert d'une feuille d'aluminium stérilisée, perforée, pour isoler les fraises de l'huile essentielle tout en permettant à cette dernière de diffuser, les boites sont recouvertes jusqu'à refroidissement total. Les fraises sont distribuées à hauteur de 3 par boite, ces dernières sont ensuite scellées au ruban adhésif.

### **3.3. Description de l'altération des fruits**

Un suivi quotidien de l'état d'avancement de l'altération des fruits a été effectué durant une période de 14 jours pour les fruits incubés à 25°C et 45 jours pour les fruits incubés à 4°C. Le taux d'infection est rapporté en pourcentage par rapport au nombre total des fruits selon chaque technique de traitement et températures d'incubation.

### 3.4. Variabilité du taux de l'altération des fruits

Le taux d'altération est comparé entre les différents modes de traitement et les différentes températures.

### 3.5. Taux d'inhibition de la croissance mycélienne

Le taux d'inhibition de la croissance mycélienne selon les traitements et les condition de températures, est calculé en rapportant la surface recouverte de mycélium à la surface totale des fruits

Le taux d'inhibition de la croissance mycélienne est calculé selon la formule suivante (Tripathi et *al.*, 2008) :

$$IM = \frac{d_c - d_t}{d_c} \times 100$$

Avec :

- IM : Pourcentage de l'inhibition mycélienne.
- $d_c$  : Moyenne des diamètres des surfaces recouvertes de mycélium des fruits témoins.
- $d_t$  : Moyenne des diamètres des surfaces recouvertes de mycélium des fruits traités.

## 4. Analyse statistique :

Afin d'évaluer le pouvoir antifongique de l'huile essentielle d'*O. glandulosum* sur l'isolat fongique de *B. cinerea* et sur l'ensemble des paramètres étudiés, des analyses statistiques ont été réalisées sur les taux d'inhibition *in-vitro* de la croissance mycélienne, de la sporulation et du nombre de sclérotés produits, ainsi que les taux d'inhibition de la croissance mycélienne *in-vivo*.

Ces analyses statistiques ont été effectuées en calculant la variance par le test ANOVA et le modèle GLM (Generalized Linear Model), sur le logiciel SYSTAT vers.13.

Les différences ont été considérées significatives pour  $P \leq 0,05$  (Gouet, 1989).

## RESULTATS

### 1. L'huile essentielle

Le rendement en huile essentielle obtenue par hydrodistillation de la partie aérienne (feuilles, tiges et sommités florales) de la plante étudiée (*Origanum glandulosum*) est de l'ordre de 1,2%.

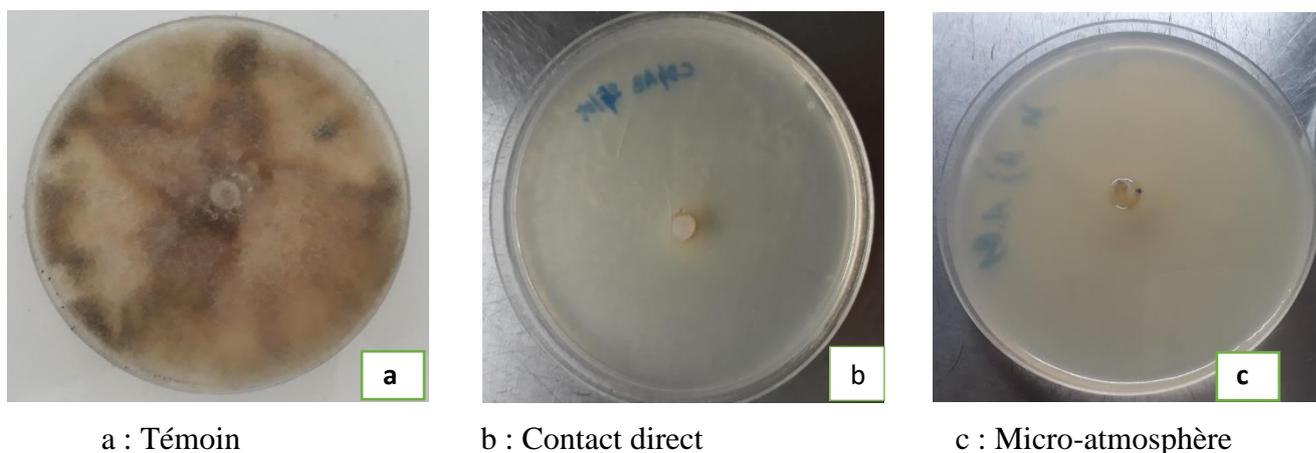


**Figure 8 : Huile essentielle d'*Origanum glandulosum* obtenue par hydrodistillation.**

## 2. Etude de l'activité antifongique de l'huile essentielle d'*Origanum glandulosum* sur *Botrytis cinerea* *in-vitro*

### 2.1. Observation macroscopique

Après 12 jours d'incubation, les boîtes ayant reçu un traitement au contact direct et en micro-atmosphère, ne présentent encore aucune croissance mycélienne. Contrairement aux boîtes témoins qui sont complètement recouvertes d'un mycélium très dense, avec une sporulation importante.

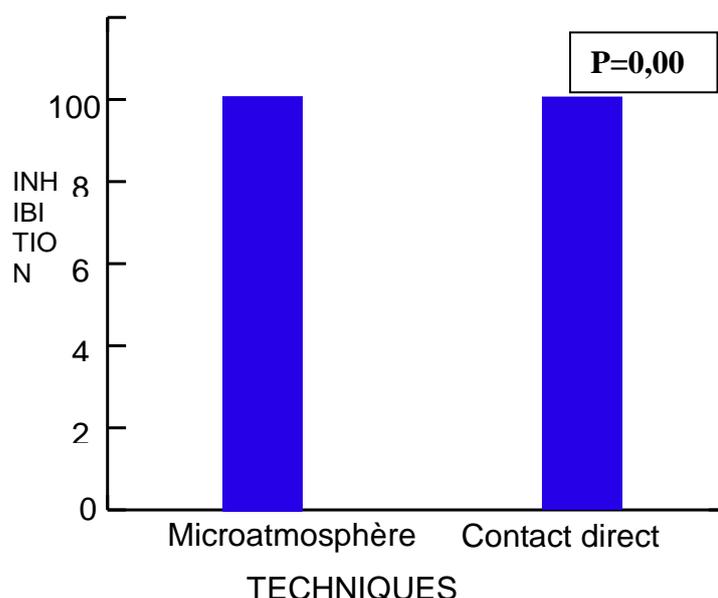


**Figure 9 : Pouvoir inhibiteur de l'huile essentielle de *Origanum glandulosum* sur *Botrytis cinerea* cultivé sur milieu PDA après 12 jours d'incubation à 25° C.**

### 2.2. Inhibition de la croissance Mycélienne

Selon la méthode de contact direct, l'huile essentielle à 0,04% a induit une inhibition totale de la croissance mycélienne de l'isolat de *Botrytis cinerea* du fraisier, inoculé dans du milieu PDA.

Avec un taux d'inhibition égal à 100%, avec  $P < 0,001$  ce qui confirme l'efficacité des

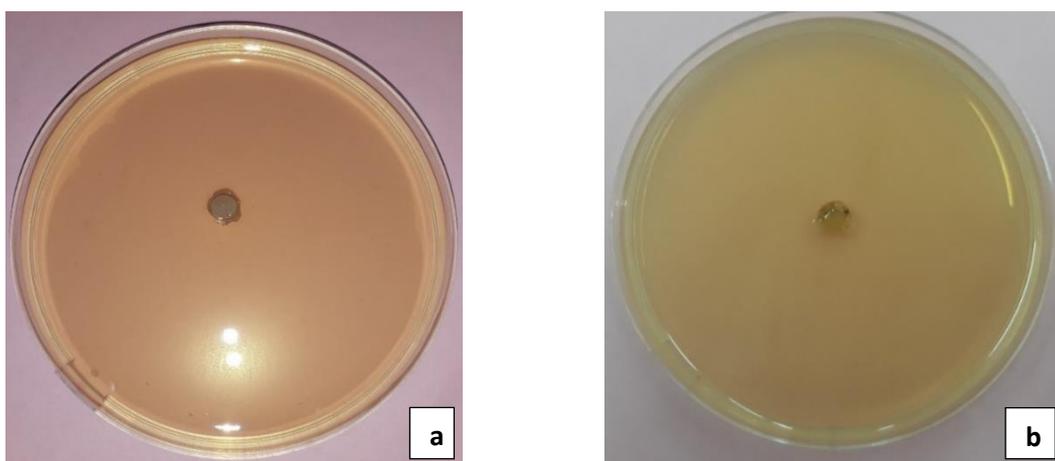


**Figure 10 : Inhibition de la croissance mycélienne selon les techniques de contact direct et de microatmosphère.**

deux méthodes.

### 2.3. Etude de la survie

Les isolats de *B. cinerea* inhibés par l'huile essentielle d'*O. glandulosum* selon les techniques de contact direct et de microatmosphère n'ont pas repris leur croissance après repiquage sur milieu PDA et incubation pendant 5 jours à 25°C. Ce qui confirme l'effet inhibiteur total de l'huile essentielle sur *B. cinerea*.

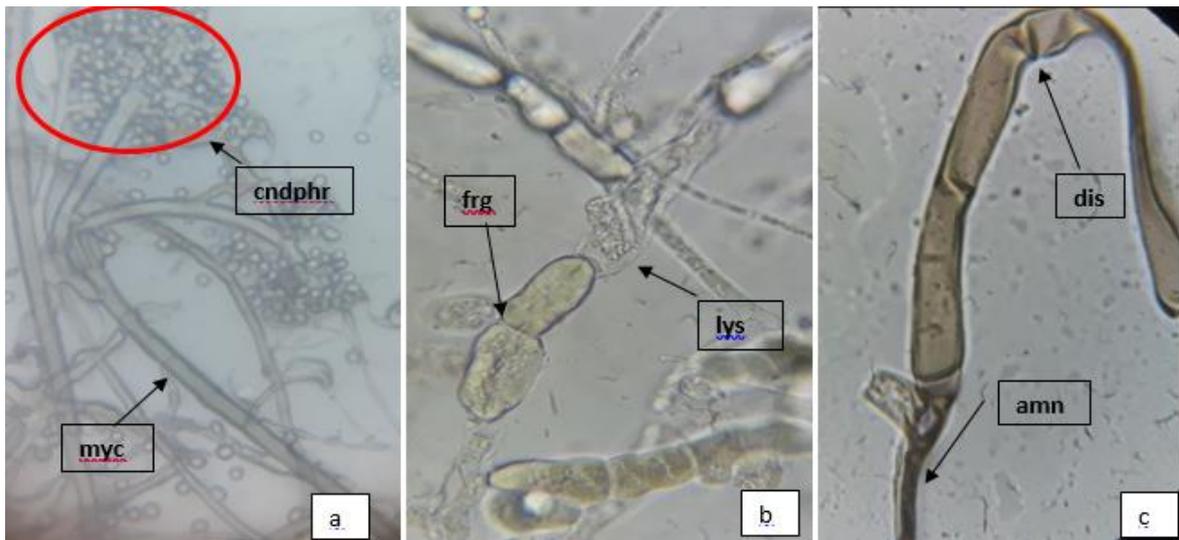


(a) : Disque mycélien traité par microatmosphère (b) : Disque mycélien traité au contact direct.

**Figure 11 : Absence de reprise de croissance mycélienne de *Botrytis cinerea* après traitement par l'huile essentielle d'*Origanum glandulosum*.**

#### 2.4. Etude microscopique des modifications de la morphologie de l'isolat de *Botrytis cinerea* après traitement

L'huile essentielle testée a montré un effet remarquable sur la structure des mycéliums de *Botrytis cinerea*. D'importantes modifications morphologiques sont observées, elles se résument par des déformations exprimées par des distortions, amincissements, lyse et fragmentation des mycéliums comparativement aux témoins (Figure 12).



a :mycélium témoin Gr. X 600

b :modifications structurales  
contact direct Gr. X1500

c :modifications structurales  
microatmosphère Gr. X1500

Myc : mycélium cndphr : conidiophore amn : amincissement

**Figure 12 : Morphologie du mycélium de *Botrytis cinerea* témoin observé au microscopique photonique.**

### 3. Etude de l'activité antifongique de l'huile essentielle d'*Origanum glandulosum* sur *Botrytis cinerea in-vivo*

#### 3.1. Observation de l'évolution de l'altération des fraises

##### 3.1.1. Incubation à température ambiante

##### 3.1.1.1. Les témoins

A partir du deuxième jour d'incubation, les fruits témoins ont commencé à montrer des signes d'altération, flétrissement et décoloration sur 2 fruits et début d'apparition de mycéliums sur un fruit, les 6 fruits restants étaient d'apparence saine.

A partir du troisième jour 6 fruits sont contaminés par *B. cinerea*, début d'apparition de mycéliums blancs sur de petites zones. Les trois fruits restants sont moyennement frais mais ne montrent aucun signe apparent de contamination fongique.

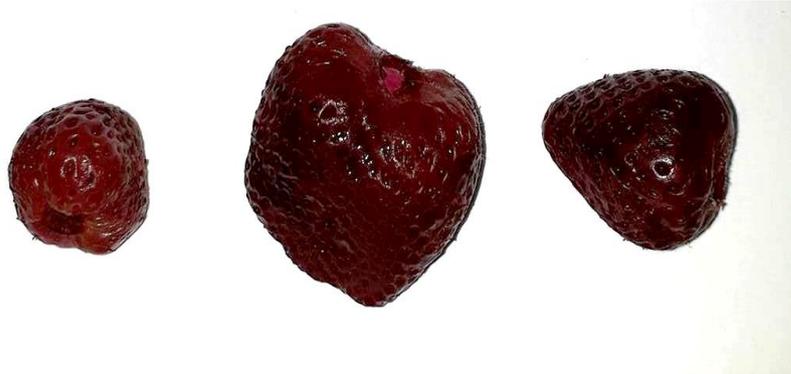
Au sixième jours les fruits témoins sont complètement recouvert d'un mycélium dense produisant des conidies en grande quantité (la quantité de la poudre grise est très importante) (Figure 13).



**Figure 13 : Les fraises témoins après 10 jours d'incubation à température ambiante.**

### 3.1.1.2. Contact direct

Les fraises ayant reçu une aspersion de l'émulsion de l'huile essentielle dans de l'eau-agar à 0,4%, ont gardé une apparence exempte de contamination de *B. cinerea*, aucune croissance mycélienne n'est à signaler jusqu'à la décomposition totale des fraises un mois après le début de l'expérimentation. Le taux d'inhibition de la croissance mycélienne de *B. cinerea* est alors de 100% (Figure 14).



**Figure 14 : Fraises traitées au contact direct après 10 jours d'incubation à température ambiante.**

### 3.1.1.3. Micro-atmosphère

En micro atmosphère, l'huile essentielle a montré une activité fongistatique, légère, au bout de 10 jours les fraises sont recouvertes d'un mycélium sur la totalité de leurs surfaces (Figure 15).



**Figure 15 : fraises traitées par microatmosphère après 10 jours d'incubation à température ambiante.**

### 3.2. Incubation à 4°C

#### 3.2.1. Observation de l'évolution de l'altération des fraises

##### 3.2.1.1. Les témoins

Après 14 jours d'incubation, aucun signe de croissance mycélienne n'est à signaler. Après 45 jours d'incubation, les fraises sont recouvertes d'un mycélium dense, montrant une sporulation importante et une production de sclérotés (Figure 16).



**Figure 16 : Fraise témoin montrant un croissance mycélienne et production de sclérotés après 45 jours d'incubation à 4°C.**

##### 3.2.2. Microatmosphère

Après 45 jours d'incubation, les fraises traitées selon la microatmosphère, sont recouvertes de mycélium avec une sporulation importante (Figure 17).



**Figure 17 : Croissance mycélienne de *Botrytis cinerea* sur les fraises traitées par microatmosphère à l'huile essentielle d'*Origanum glandulosum* à la température d'incubation de 4° après 45 jours d'incubation.**

### 3.2.3. Contact direct

Après 45 jours d'incubation, les fraises traitées au contact direct ne montrent encore aucun signe de croissance mycélienne ou d'altération microbienne (Figure 18).



**Figure 18 : Fraises traitées par aspersion à l'émulsion de l'huile essentielle d'*Origanum glandulosum* après 45 jours d'incubation à 4°C.**

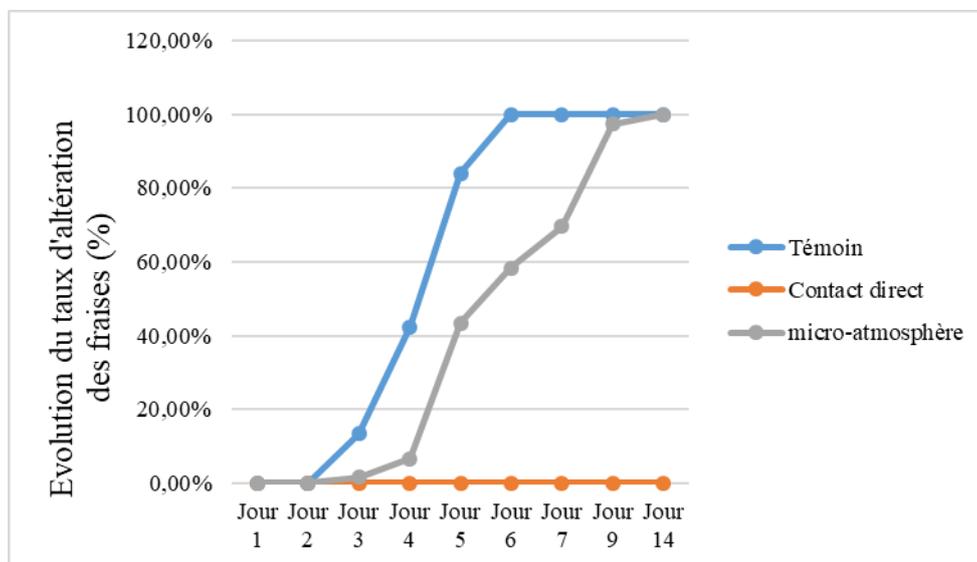
### 3.2.4. Evolution du taux d'infection

Le traitement à l'huile essentielle de *O. glandulosum*, à température ambiante, au contact direct a montré une inhibition totale de la croissance mycélienne de *B. cinerea*, sur la durée d'observation. Cependant le traitement par microatmosphère, a prolongé la durée de vie des fraises de 24 heures avant le début d'apparition des mycéliums sur la surface des fraises. Il est également noté que le taux d'infection a atteint la valeur de 100% après 10 jours contrairement au témoin qui a atteint 100% d'infection au bout de 6 jours. L'huile essentielle a donc prolongé la période de latence de *B. cinerea*, les conidies ont germé après 48 heures et ont commencé à donner des mycéliums. En microatmosphère, l'huile essentielle n'a pas de pouvoir inhibiteur sur *B. cinerea* (Figure 19).

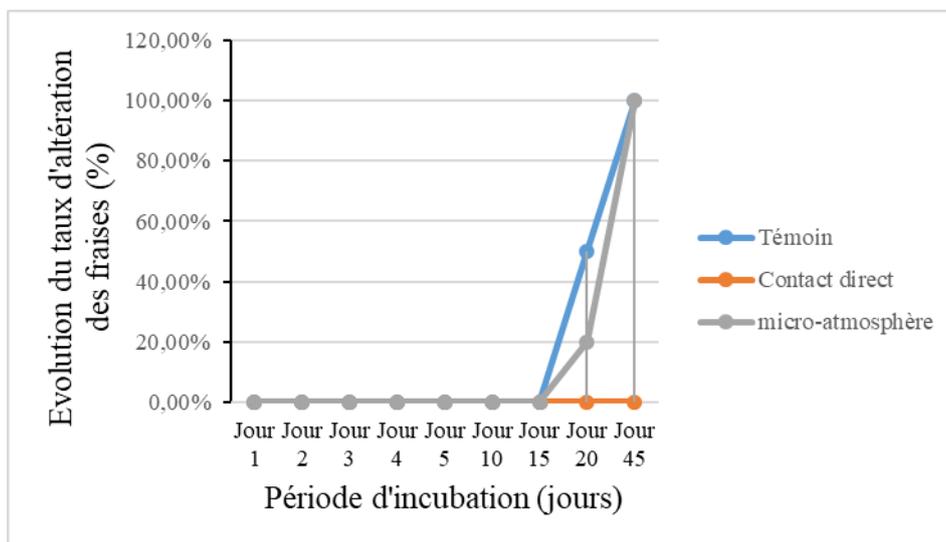
Le traitement à l'huile essentielle de *O. glandulosum* selon la technique de contact direct à la température d'incubation de 4°C, a eu un effet inhibiteur de l'altération. En effet, le taux d'infection est resté stable à 0% pendant 45 jours d'incubation, les fraises ont gardé un aspect sain. Cependant le traitement par microatmosphère, n'a eu qu'un effet fongistatique, l'infection a évolué de façon moins rapide que chez le témoin. Le taux d'infection a atteint la valeur de 50% des fruits après 15 jours pour le témoin contrairement à celui des fraises

traitées par micro-atmosphère qui a atteint 20% d'infection au bout de 20 jours. Ces taux ont atteint 100% après 45 jours (Figure 20).

Le prolongement de l'infection dans le temps pourrait être expliqué par l'effet de la température sur le cycle de *B. cinerea*.



**Figure 19 : Evolution de l'altération des fraises par *Botrytis cinerea* sous l'effet de l'huile essentielle d'*Origanum glandulosum* sur une période de 14 jours à la température ambiante.**

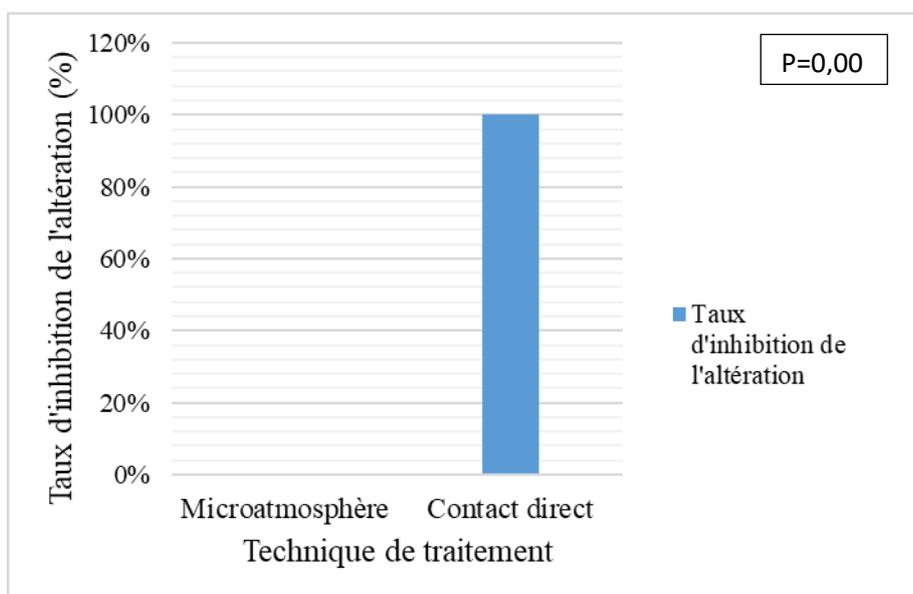


**Figure 20 : Evolution de l'altération des fraises par *Botrytis cinerea* sous l'effet de l'huile essentielle d'*Origanum glandulosum* sur une période de 45 jours à la température 4°C .**

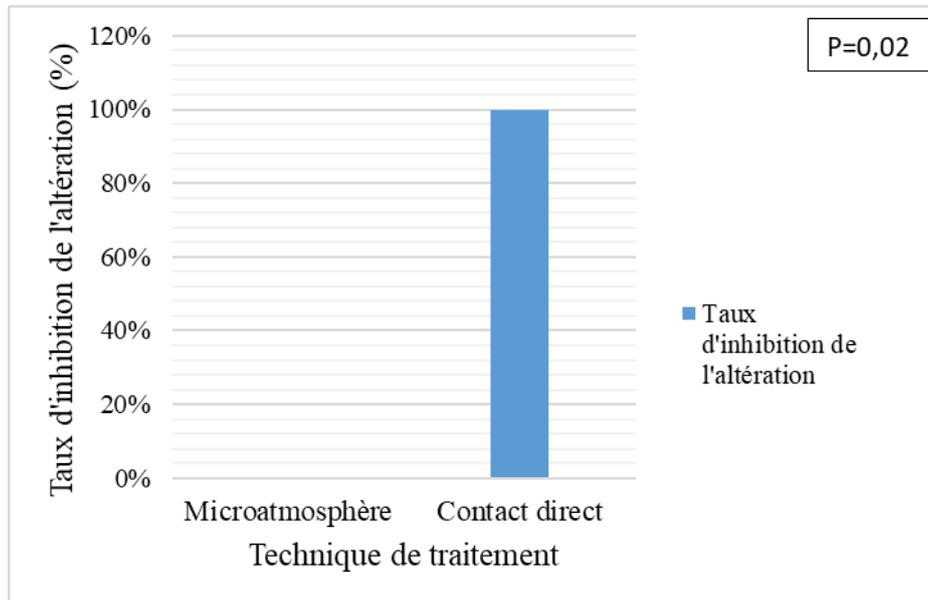
### 3.2.5. Taux d'inhibition de *Botrytis cinerea* par l'huile essentielle d'*Origanum glandulosum*

Après 14 jours d'incubation à température ambiante, les taux d'inhibition ont été calculés pour les deux traitements et sont comparés aux témoins. L'inhibition de *B. cinerea* a été totale pour la technique de contact direct avec un taux d'inhibition de 100%. La technique de microatmosphère n'a par contre donné aucune efficacité, avec un taux d'inhibition de 0% et avec  $P < 0,001$ . (Figure 21).

Après 45 jours d'incubation, les taux d'inhibition de la croissance mycélienne de *B. cinerea* par l'huile essentielle de *O. glandulosum* à la température d'incubation de 4°C, ont été calculés pour les deux techniques, à savoir, la microatmosphère et le contact direct, et sont comparés aux témoins. L'inhibition de *B. cinerea* a été totale (100%). La technique de microatmosphère n'a par contre donné aucune efficacité, avec un taux d'inhibition de 0% avec  $P < 0,001$  (Figure 22).



**Figure 21 : Inhibition de l'altération due au *Botrytis cinerea* par l'huile essentielle d'*Origanum glandulosum* selon les deux techniques de microatmosphère et de contact direct.**



**Figure 22 : Inhibition de l'altération due au *Botrytis cinerea* par l'huile essentielle d'*Origanum glandulosum* selon les deux techniques de microatmosphère et de contact direct (incubation à 4°C).**

## DISCUSSION

L'étude phytochimique de cette même espèce poussant dans la région de Sétif, effectuée par Belhattab, et *al.* (2005), leur a permis d'obtenir des rendements en huiles essentielles de l'ordre de 2,7 %. Les rendements en huile essentielle de cette même plante récoltée dans différentes stations de la région Est de l'Algérie, effectuée par Sari, et *al.* en (2006), leur a permis d'obtenir des rendements en huiles essentielles allant de 0,8 à 3 %.

Bekhechi & Abdelouahid en (2008) ont obtenus des rendements moyens en huiles essentielles d'*O. vulgare* récolté dans la région de Sétif, extraites par hydrodistillation via un dispositif de type Clevenger, variant sensiblement entre les différentes stations de récolte, allant de 3,53 %, jusqu'à 3,95 %.

Padulosi (1997) souligne que la moyenne du rendement en huile essentielle des parties aériennes des différentes espèces d'origans se situe aux environs de 1,8%. Il explique cette variabilité quantitative mais aussi qualitative des huiles essentielles par la variabilité génétique de la plante, son stade végétatif, le procédé d'extraction choisi et surtout des conditions de l'environnement dans lequel la plante a évolué.

Les résultats obtenus révèlent une activité antifongique intéressante de l'huile essentielle d'*Origanum glandulosum*, *in-vitro*, selon les techniques de contact direct et de microatmosphère, et *in-vivo* selon la technique de contact direct. L'huile essentielle testée a donné une inhibition totale, dont l'effet est fongicide contre *Botrytis cinerea* à 6µl/ml *in-vitro*, selon les deux techniques de test, et au contact direct *in-vivo* selon les deux températures d'incubation.

En effet, des travaux de recherche sur différentes espèces appartenant au genre *Origanum*, ont prouvé leur activité antifongique, notamment sur les agents phytopathogènes. Comme Chebli, et *al.* (2003), qui a affirmé une inhibition complète (100%) de la croissance mycélienne de *B. cinerea*, par l'huile essentielle d'*Origanum compactum* marocaine avec une concentration inhibitrice moyenne de 35,1 µl/ml.

*B. cinerea* a été complètement inhibé par l'huile essentielle d'*O. vulgare* et *O. dictamnus* à 200µl/ml et à 300 µg/ml pour *O. majorana* d'après Dimitra J., et *al.*(2003).

L'huile essentielle d'*Origanum syriacum* a provoqué inhibition du mycélium de *B. cinerea* à de faibles concentrations (0,2 µg / ml d'air et 12,8 µg /ml de milieu respectivement) avec inhibition complète de la germination des conidies à 3,2µg/ml (Emine, et *al.* 2010).

L'activité antifongique, contre *B. cinerea*, de la fraction volatile de l'huile essentielle d'*O. glandulosum* a été déjà confirmée par Bendahou *et al.* (2008), à une concentration de 3µl sur un disque de 8mm, .

Les observations microscopiques de l'isolat fongique inhibé, ont révélé des déformations des mycélium préalablement traités à l'huile essentielle. Il existe des études qui ont démontré que la germination des spores requiert la synthèse d'ARN et de protéines et la respiration (Chitarra *et al.* 2003) et qui peuvent être inhibés sous l'effet des huiles essentielles, qui sont dotées d'une capacité de pénétrer et perturber la paroi cellulaire fongique et les membranes cytoplasmiques, ce qui entraîne l'endommagement et la perméabilité des membranes mitochondriales (Akthar *et al.* 2014). En effet, il est suggéré que le mécanisme d'action du carvacrol (un des deux composés majoritaires de l'huile essentielle des origans), est l'entrée en interaction avec la membrane cellulaire du pathogène (Chebli *et al.* 2003).

Aucun travail n'a été rencontré sur l'application *in vivo* de l'huile essentielle d'*O. glandulosum*. Cependant, d'autres espèce appartenant au même genre ont été testées et ont montré une activité inhibitrice intéressante, à l'instar des travaux de Jorge Giovanni *et al.* (2010) qui confirme que l'huile essentielle d'*O. vulgare* à 10µl montre une inhibition complète et comparable à celle d'un fongicide chimique (Tebuconazol).

Doneche, 1986 affirme qu'à des températures variant entre 5 °C et 22°C, la vitesse de croissance de *B. cinerea* augmente avec la température, entraînant une durée du cycle de plus en plus courte Au-dessus de 25 °C, le développement du champignon est ralenti et il y a très rapidement inhibition totale. Il n'a pas été possible d'obtenir la germination des conidies pour des températures supérieurs à 35 °C. Comme de nombreux champignons inférieurs *B. cinerea* se développe plus rapidement dans un milieu légèrement acide. La vitesse de croissance est optimale pour des pH compris entre 3,0 et 5,0.

## Conclusion

Le présent travail vise la recherche d'une alternative biologique aux pesticides chimiques par le biais d'huile essentielle de plantes, pour une meilleure conservation des fruits au cours de leur stockage, en termes de sécurité et de durabilité.

Dans ce contexte, notre étude porte sur l'activité antifongique d'une huile essentielle, sur un isolat fongique prélevé à partir fruits altérés par les moisissures au cours de leur stockage. Une huile essentielle a été extraite par hydrodistillation à partir de la partie aérienne d'*Origanum glandulosum*. Récolté de la région d'El Oued Souf. D'un rendement en H.E de 1,2%. L'isolat fongique étudié est *Botrytis cinerea* prélevé de fraises locales.

L'étude antifongique s'est faite *in-vitro* selon la technique de contact direct avec 1/250<sup>ième</sup> (0,4 %) d'huile essentielle. Cette technique a été suivie par celle de micro-atmosphère, pour déterminer l'activité de la fraction volatile de l'huile essentielle à 60µl par disque. L'étude a été complétée par une application *in-vivo* des résultats, dans deux conditions expérimentales simulant l'entreposage dans une chambre froide à 4°C et dans un magasin à température ambiante (entre 20 et 32°C), les deux fractions, liquide et volatile, ont été testées, avec la même quantité d'huile essentielle, à savoir 60µl/ répétition.

Les résultats obtenus ont montré que l'huile essentielle détient un pouvoir antifongique intéressant à la concentration testée sur *B. cinerea*.

La technique de contact direct pour les deux tests *in-vivo* et *in-vitro*, dans chacune des conditions d'incubation, ainsi que la méthode de microatmosphère employée *in-vitro*, ont montré une activité antifongique contre *B. cinerea* traduite par inhibition complète de sa croissance mycélienne à la concentration testée, et ce pendant une période d'observation de 2 mois.

L'huile essentielle d'*O. glandulosum* a eu un effet fongicide sur *B. cinerea* à la concentration de 60µl/ répétition selon les techniques de contact direct et de microatmosphère *in-vitro* et selon la méthode de contact direct *in-vivo*. Ce résultat a été confirmé par des observations microscopiques qui ont révélé des lyses, déformation et digestion des mycélia.

Les résultats de cette étude peuvent être complétés par :

-La détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) de l'huile essentielle étudiée en micro-atmosphère pour augmenter son effet sur la conservation des fruits.

- Etude de la composition chimique de l'huile essentielle d'*O. glandulosum*, pour déterminer la ou les molécules actives.
- Elargir le spectre d'utilisation sur d'autres agents phytopathogènes.
- Essai *in-vivo* sur des plants de fraisier en traitement curatif et/ou préventif contre *B. cinerea*.
- Essai sur d'autres supports que l'agar-agar pour la diffusion de l'huile essentielle.
- Etudier de l'impact de cette huile essentielle sur la qualité nutritive et organoleptique du fruit.
- Etudier la toxicité sur les concentrations de l'extrait de plante et/ou du composé actif à employer sur le terrain.
- Tester sur des chambres froides en diffusion.

**REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES**

1. Abdel-Hamied A. A., Nassar A. G. and El-Badary, N., 2009. Investigation on antioxidant and antibacterial activities of some natural extracts. *World Journal of Food Science*, 4(1) : 1-7.
2. Adam A., 2008. Elicitation de la résistance systémique induite chez la tomate et le concombre et activation de la voie de la lipoxycgénase par des rhizobactéries non-pathogènes. Thèse de Doctorat : Sciences. Université de Liège, Liège, 166 p.
3. AFNOR, 1982. Recueil des normes françaises des huiles essentielles, Association française de normalisation. AFNOR, Paris, 180 p.
4. AFNOR, 2000. Echantillonnage et méthodes d'analyse. Recueil de normes : les huiles essentielles. AFNOR, Paris, 440 p.
5. Agrawal A., Anurag., 2008. Inhibitory effect of *Phyllanthus amarus* on sporulation of dermatophytic fungus *Microsporum gypseum*. National symposium of biochemistry biochemical sciences : health and environmental aspects.
6. Agrios G.N., 2005. Plant pathology 5th eds. Elsevier, San Diego, 952 p.
7. AL-Bandak G. and Oreopoulou V., 2007. Antioxidant properties and composition of *Majorana syriaca* extracts. *European Journal of Lipid Science and Technology*., 109(3) : 247-255.
8. Baba Aïssa F., 2011. Encyclopédie des plantes utiles. El Maarifa, Alger, 471 p.
9. Bardeau F., 2009. Les Huiles Essentielles, découvrir les bienfaits et les vertus d'une médecine ancestrale. Edition Lanore, Paris, 315 p.
10. Baser K.H.C. and Buchbauer G., 2010. Handbook of Essential Oils: Science, Technology, and Applications. Taylor & Francis Group, London, 1112 p.
11. Bec L., 2013. Mes Huiles Essentielles : 30 plantes pour me soigner au quotidien. Mango Bien-Être, Paris, 93 p.
12. Beever R. and Weeds P., 2004. Taxonomy and genetic variation of *Botrytis* and *Botryotinia*, p. 29-52, in: *Botrytis: biology, pathology and control*. Y. Elad, B. Williamson, P. Tudzynski and N. Delen, eds. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.
13. Bekhechi C. et Abdelouahid D. E., 2014. Les huiles essentielles. Office des Publications Universitaires, Alger, 55 p.
14. Bekhechi C., Abdelouahid F. et Atik-Bekkara D. E., 2008. Composition et activité antibactérienne des huiles essentielles d'*Origanum glandulosum* d'Algérie. *Phytothérapie*. 6(3) : 153-159.

15. Belaiche P., 1979. *Traité de phytothérapie et d'aromathérapie*. Editions Maloine, S.A, 204 p.
16. Belhattab R., Larous L. and Figueiredo C. A., 2005. *Origanum glandulosum* Desf Grown Wild in Algeria: Essential oil composition and glycosidic bound volatiles. *Flavour and Fragrance Journal*. 20(2) : 209-212.
17. Ben Arfa A., Combes S., Preziosi-Belloy L., Gontard N., and Chalier P., 2006. Antimicrobial activity of carvacrol related to its chemical structure. *Letters in Applied Microbiology*. 43(2) : 149-154.
18. Benabdelkader T., Zitouni A., Guitton Y., Jullien F., Maitre D., Casabianca H., Legendre L. and Kameli A., 2011. Essential oils from wild populations of Algerian *Lavandula stoechas* L.: composition, chemical variability, and in vitro biological properties. *Chemistry & Biodiversity*, 8(5): 937-953.
19. Biondi D., Cianci P., Geraci C., Ruberto G. and Piattelli, M., 1993. Antimicrobial activity and chemical composition of essential oils from sicilian aromatic plants. *Flavour and Fragrance Journal*. 8(6) : 331-337.
20. Blancard D., 2009. *Les maladies de la tomate: identifier, connaître, maîtriser*. Quae, Paris, 680 p.
21. F., Busta et P.M, Foegeding. 1983. *Chemical food preservation in S. block : "desinfection, strelization and preservation"*. s.l. : Lea and Febieger Ed, 1983
22. Block S. S., 1983. *Disinfection, Sterilization, and Preservation*. Lea and Febieger Ed, S.A., 1504 p.
23. Bogino P. C., Oliva M. D. L. M., Sorroche F. G. and Giordano W., 2013. The Role of Bacterial Biofilms and Surface Components in Plant-Bacterial Associations. *International journal of molecular sciences*. 14(8) : 15838-15859.
24. Bonnafous C., 2013. *Traité scientifique Aromathérapie: Aromatologie & aromachologie*. Dangles Ed., Paris, 522.
25. Bouchra C., Achouri M., Hassani L. I. and Hmamouchi M., 2003. Chemical composition and antifungal activity of essential oils of seven Moroccan Labiatae against *Botrytis cinerea* Pers: Fr. *Journal of Ethnopharmacology*. 89(1) : 165-169.
26. Brul S., and Coote P., 1999. Preservative agents in foods: mode of action. *International Journal of Food microbiology*. 50(1-2) : 1-17.
27. Bruneton J., 2009. *Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales*. Tec & Doc Lavoisier, Paris, 1269 p.
28. Carmo M.M., Frazao S. and Venancio F., 1989. The chemical composition of portugese *Origanum vulgare*. *Journal of essential oil research*. 1(2) : 69-71.

29. Caron M. et Vuitton L., 1986. Jardin de légumes. Hachette, S.A., 127 p.
30. Chandler D., Bailey A.S. Tatchell G.M., Davidson G., Greaves J. and Grant W.P., 1998. The development, regulation and use of biopesticides for integrated pest management. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*. 366(1573) : 1987-1998.
31. Civello P. M., Martínez G. A., Chaves A. R. and Añón M. C., 1997. Heat treatments delay ripening and postharvest decay of strawberry fruit. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 45(12) : 4589-4594.
32. Claeson A. S., Levin J. O., Blomquist G. and Sunesson A. L. 2002. Volatile metabolites from microorganisms grown on humid building materials and synthetic media. *Journal of Environmental Monitoring*. 4(5) : 667-672.
33. Coley-Smith J. R., Verhoeff K. and Jarvis W. R., 1980. The biology of *Botrytis*. Academic Press, Londres, 318 p.
34. Coley-Smith J.R. and Cooke R.C., 1971. Survival and germination of fungal sclerotia. *Annual Review of Phytopathology*. 9(1): 65-92.
35. Collectif, 2013. Savoir tout faire au jardin. 9e. Election Reader's Digest, S.A., 720 p.
36. Crocker P., 2005. Oregano, 2005 herb of year. Riversong Studios Ltd, Canada, 63 p.
37. Daouk R. K., Dagher S. M. and Sattout E. J., 1995. Antifungal Activity of the Essential Oil of *Origanum syriacum* L. *Journal of Food Protection*. 1995, 58(10) : 1147-1149.
38. De Billerbeck V. G., 2000. Activité antifongique de l'huile essentielle de *Cymbopogon nardus* sur l'*Aspergillus niger*. Evaluation d'un bioréacteur pour l'étude de l'effet inhibiteur des substances volatiles en phase vapeur. Thèse de Doctorat : Microbiologie. Faculté de sciences pharmaceutiques. Ecole Nationale Polytechnique de Toulouse, Toulouse, 236 p.
39. Dean R., Van Kan J. A., Pretorius Z. A., Hammond-Kosack K. E., Di Pietro A., Spanu P. D., Rudd J. J., Dickman M., Kahmann R., Ellis J. and Foster G. D., 2012. The Top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology. *Molecular Plant Pathology*. 13(4) : 414-430.
40. Domson J. F. and Al-Doory Y., 1984. Mould Allergy. Lea and Febiger, Philadelphia, 287 p.
41. Dupin, H., 1992. Alimentation et nutrition humaines. ESF editeurs, Paris, 1533 p.
42. Elad Y, Stewart A., 2004. Microbial control of *Botrytis* spp. *Botrytis: biology, pathology and control*. 2004, pp. 223–41.
43. Elad Y., Williamson B., Tudzynski P. and Delen N., 2007. *Botrytis: Biology, pathology and control*. Springer, Dordrecht, 403 p.

44. Elad, Y., Yunis H. and Katan T., 1991. Multiple resistance to benzimidazoles dicarboximides and diethofencarb in field isolates of *Botrytis cinerea*. *Plant Pathology*. 41(1) : 41-46.
45. Elmer, P.A.G., and Michailides, T.J. 2004. Epidemiology of *Botrytis cinerea* in orchard and vine crops. *Botrytis: biology, pathology and control*. 2004, pp. 243-272.
46. European Council, 1997. European pharmacopea. 3e. European Council, Strasbourg, 1799 p.
47. Faretra F. and Antonacci E., 1987. Production of apothecia of *Botryotinia fuckeliana* (de Bary) Whetz. under controlled environmental conditions. *Phytopathologia Mediterranea*. 26: 29-35.
48. Faretra F. and Pollastro S., 1991. Genetic basis of resistance to benzimidazole and dicarboximide fungicides in *Botryotinia fuckeliana* (*Botrytis cinerea*). *Mycological Research* 95(8): 943-951.
49. Faretra F. and Pollastro S., 1993. Isolation, characterization, and genetic analysis of laboratory mutants of *Botryotinia fuckeliana* resistant to the phenylpyrrole fungicide CGA 173506. *Mycological Research*. 97(5): 620-624.
50. Faretra F., Antonacci E. and Pollastro S., 1988. Sexual behaviour and mating system of *Botryotinia fuckeliana*, teleomorph of *Botrytis cinerea*. *Journal of General Microbiology*. 134(9): 2543-2550.
51. Faretra F., Pollastro S. and Di Tonno A.P., 1989. New natural variants of *Botryotinia fuckeliana* (*Botrytis cinerea*) coupling benzimidazole-resistance to insensitivity toward the N-phenylcarbamate diethofencarb. *Phytopathologia Mediterranea*. 28: 98-104.
52. Franchomme P. et Péroël D., 1990. L'aromathérapie exactement. Roger Jollois Editeur, Limoges, 490 p.
53. Goetz P. et Ghédira K., 2012. Phytothérapie anti-infectieuse. Springer, Paris, 394 p.
54. Gouet J. P. et Philippeau G., 1989. Comment interpréter les résultats d'une analyse de variance ? Institut technique des céréales et des fourrages (ITCF), Paris, 81 p.
55. Gross K.C., Wang C. Y. and Saltveit M., 2016. The commercial storage of fruits, vegetables, and florist and nursery stocks. United States Department of Agriculture, Washington D.C., 780 p.
56. Gunier E., 1892. Sur la coloration accidentelle de la fleur du fraisier commun. *Bulletin de la Société Botanique de France*. 39(1) : 64-66.
57. Haas D. and Défago G., 2005. Biological control of soil-borne pathogens by fluorescent pseudomonads. *Nature Reviews Microbiology*. 3(4) : 309-3017.

58. Hammiche V., 1982. Plantes médicinales et aromatique, perspectives algériennes. *Le pharmacien du Maghreb*. (2).
59. Heinrich M., Kufer J., Leonti M. and Pardo-de-Santayana M., 2006. Ethnobotany and ethnopharmacology-Interdisciplinary links with the historical sciences. *Journal of ethnopharmacology*. 107(2) : 157-160.
60. Hennebert G. L., 1973. Botrytis and Botrytis-like genera. *Persoonia*. 7(2) : 183-204.
61. Hoffman, DR. 1984. Mould allergens. [éd.] Lea & Febieger. Mould allergy. 1984, pp. 104–116.
62. Holz, G., Coertze, S., and Williamson, B. (2004). The ecology of Botrytis on plant surfaces, p. 9-27, in: Botrytis: biology, pathology and control. Y. Elad, B. Williamson, P. Tudzynski and N. Delen, eds. Kluwer Academic Press, Dordrecht, The Netherlands.
63. Husaini A. M. and Neri D., 2016. Strawberry: Growth, Development and Diseases. CABI, S.A., 347 p.
64. Inouye S., Takizawa T. and Yamaguchi H., 2001. Antibacterial activity of essential oils and their major constituents against respiratory tract pathogens by gaseous contact. *Journal of antimicrobial chemotherapy*. 47(5) : 565-573.
65. Inouye S., Uchida K., Maruyama N., Yamaguchi H. and Abe S., 2006. A novel method to estimate the contribution of the vapor activity of essential oils in agar diffusion assay. *Japanese Journal of Medical Mycology*, 47(2): 91-98.
66. Ismaili-Allaoui M., 1987. Pouvoir antiseptique de l'huile essentielle du thym sur les microorganismes du smen. Mémoire 4<sup>ème</sup> année : Agroalimentaire. Institut agronomique et vétérinaire Hassan 2, Rabat, S.A. p.
67. Kintzios. S. E., 2002. Oregano, the genera *Origanum* and *Lippia*. Taylor and francis, Londres et New York, 296 p.
68. Kosar M., Dorman H. J. D., Bachmayer O., Baser K. H. C. and Hiltunen R., 2003. An improved on-line HPLC-DPPH\* method for the screening of free radical scavenging compounds in water extracts of Lamiaceae plants. *Chemistry of natural Compounds*. 39(2) : 161–166.
69. Kurita N. and Noike S., 1982. Synergistic antimicrobial effect of sodium chloride and essential oils components. *Agricultural and Biological Chemistry*. 1(46) : 159-165.
70. Laghchimi A., Znini M., Majidi L., Renucci F., El Harrak A. et Costa J., 2014. Composition chimique et effet des phases liquide et vapeur de l'huile essentielle de *Lavandula multifida* sur la croissance mycélienne des moisissures responsables de la pourriture de la pomme. *Journal of Materials and Environmental Science*, 5(6): 1770-1780.
71. Larousse, 2001. Encyclopédie des plantes médicinales. LAROUSSE, S.A., 335 p.

72. Larousse, 2017. Larousse Dictionnaire de Français. <http://www.larousse.fr/dictionnaires/francais/> : 31 Août 2017.
73. Lorbeer J. W., Seyb A. M., de Boer M. and van den Ende J.E., 2004. *Botrytis* species on bulb crops, p. 273-294, in: *Botrytis: biology, pathology and control*. Y. Elad, B. Williamson, P. Tudzynski and N. Delen, eds. Kluwer Academic Press, Dordrecht, The Netherlands.
74. Mallea M., Soler M., Anfosso F. et Charpin J., 1979. Activité antifongique d'essences aromatiques. *Pathologie et biologie moléculaire. Pathologie Biologie*. 27 : 597-602.
75. Martinez F., Dubos B. and Fermaud M., 2005. The role of saprotrophy and virulence in the population dynamics of *Botrytis cinerea* in vineyards. *Phytopathology*. 95(6) : 692-700.
76. Médart J., 2009. Manuel pratique de nutrition: L'alimentation préventive et curative 2<sup>e</sup> édition. De boek, Bruxelles, 296 p.
77. Messgo-Moumene S., Li Y., Bachir K., Houmani Z., Bouznad Z. and Chemat F., 2014. Antifungal power of citrus essential oils against potato late blight causative agent. *Journal of Essential Oil Research*. 27(2) : 169-176.
78. Mimica-Dukic N., Bozin B., Sokovic M. and Simin N., 2004. Antimicrobial and antioxydant activities of *Melissa Officinalis* L. (lamiaceae) essential oil. *Journal of agricultural and food chemistry*. 52(9) : 2485-2489.
79. Nakahara K., Alzoreky N. S., Yoshihashi T., Nguyen H. T. and Trakoontivakorn G., 2003. Chemical composition and antifungal activity of essential oil from *Cymbopogon nardus* (citronella grass). *Japan Agricultural Research Quaterly*. 4(37) : 249-252.
80. NCBI, 2018. Taxonomy browser. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?mode=Info&id=1897509&lvl=3&lin=f&keep=1&srchmode=1&unlock> : 29 Mai 2018.
81. NIIR Board of Consultants and Engineers, 2006. *The Complete Book on Spices & Condiments (with Cultivation, Processing & Uses)*. ASIA PACIFIC BUSINESS PRESS Inc, S.A., 880 p.
82. Oamri C., 2016. Objectifs de développement des filières stratégiques de l'Agriculture. MADRP, Alger, 13 p.
83. Padrini F. et Lucheroni M.-T. 2003. *Le grand livre des huiles essentielles*. De Vecchi, Paris, 206 p.
84. Padulosi S., 1997. *Oregano - Proceedings of the IPGRI International Workshop on Oregano*. CIHEAM, Bari, 181 p.
85. Pignatti S. 1982. *Flora d'Italia vol. 2*. Edagricole, Bologna, 732 p.

86. Polese J.-M., 2005. La culture des fruits rouges. Editions Artemis, S.A., 95 p.
87. Pombo M. A., Rosli H. G., Martínez G. A. and Civello P. M., 2011. UV-C treatment affects the expression and activity of defense genes in strawberry fruit (*Fragaria × anaanssa* dutch). *Postharvest biology and technology*. 59(1) : 94-102.
88. Prusky D., Gullino M. L., 2010. Post-harvest Pathology. vol. 2. Springer, 212 p.
89. Quezel P. et Santa S., 1963. Nouvelle flore d'Algérie et des régions désertiques méridionales. Ed CNRS, Paris, 1170 p.
90. Raina-Fulton R., 2015. New trends in pesticide residue analysis in cereals nutraceuticals, baby foods, and related processed consumer products. *Journal of AOAC international*. 98(5) : 1163-1170.
91. Richard H., 1992. Epices et aromates. Lavoisier, Paris, 339 p.
92. Roby M. H. H., Sarhan M. A. and Selim K. A. H. and Khalel K. I., 2013. Antioxidant and antimicrobial activities of essential oil and extracts of fennel (*Foeniculum vulgare* L.) and chamomile (*Matricaria chamomilla* L.). *Industrial Crops and Products*. 44 : 437-445.
93. Romanazzi G., Smilanick J. L., Feliziani E. and Droby S., 2016. Integrated management of postharvest gray mold on fruit crops. *Postharvest Biology and Technology*, 113: 69-76.
94. Ruberto G., Baratta M. T., Sari M. and Kaâbeche M., 2002. Chemical composition and antioxidant activity of essential oil from Algerian *Oreganum glandulosum* Desf. *Flavour and Fragrance Journal*. 17(4) : 251-254.
95. Sağdıç O., Kuşçu A., Özcan M. and Özçelik S., 2002. Effect of Turkish spice extracts at various concentrations on the growth of *Escherichia coli* O157: H7. *Food Microbiology*. 19(5) : 473-480.
96. Sameza M. L., Boat M. A. B., Nguemezi S. T., Mabou L. C. N., Dongmo P. M. J., Boyom F. F. and Menut C., 2014. Potential use of *Eucalyptus globules* essential oil against *Phytophthora colocasiae* the causal agent of taro leaf blight. *European Journal of Plant Pathology*. 140(2) : 243-250.
97. Sari M., Biondi M. D., Kaâbeche M., Mandalari G., D'Arrigo M., Bisignano G., Saija A., Daquino C., Ruberto G., 2006. Chemical composition, antimicrobial and antioxidant activities of the essential oil of several populations of Algerian *Origanum glandulosum* Desf. *Flavour and Fragrance Journal*. 21(6) : 890-898.
98. Sawai J. and Yoshikawa T., 2004. Quantitative evaluation of antifungal activity of metallic oxide powders (MgO, CaO and ZnO) by an indirect conductimetric assay. *Journal of Applied Microbiology*. 96(4) : 803-809.
99. Seidemann J. 2005. World Spice Plants: Economic Usage, Botany, Taxonomy. Springer Science & Business Media, Berlin, 262 p.

100. Small E. et Deutsch G., 2001. Herbes culinaires pour nos jardins de pays froid. CNRC-NRC et ISMANT PRONY PRESS, Canada, 193 p.
101. Thompson D.P., 1996. Inhibition of growth of mycotoxigenic *Fusarium* species by butylated hydroxyanisole and/or carvacrol. *Journal of Food Protection*. 59(4) : 412-415.
102. Tian S., Qin G., Li B., 2011. Loquat (*Eriobotrya japonica* L.). *Postharvest Biology and Technology of Tropical and Subtropical Fruits*. 424–444e.
103. Tripathi P., Dubey N. K. and Shukla A. K., 2008. Use of some essential oils as post-harvest botanical fungicides in the management of grey mould of grapes caused by *Botrytis cinerea*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 24: 39-46.
104. Ultee A., Kets E.P.W. and Smid E.J., 1999. Mechanisms of action of carvacrol towards the food-borne pathogen *Bacillus cereus*. *Journal of Food Protection*. 63: 620-624.
105. Urbasch I., 1983. Über entstehung und keimung der chlamydosporen von *Botrytis cinerea* Pers. *Phytopathologische Zeitschrift*. 108(1): 54-60.
106. Urbasch I., 1984. Kugelige, umhüllte Mikrokonidien-Aggregate als Überdauerungs- und Verbreitungseinheiten von *Botrytis cinerea* Pers. *Phytopathologische Zeitschrift*. 109(3): 241-244.
107. Urbasch I., 1985a. Dedifferenzierung der appressorien von *Botrytis cinerea* Pers. Unter bildung von mikrokonidien –relation zur resistenz von *Lycopersicon* spp. gegen *B. cinerea*. *Phytopathologische Zeitschrift*. 113(4): 348-358.
108. Urbasch I., 1985b. Ultrastructural studies on the microconidia of *Botrytis cinerea* Pers. And their phialoconidial development. *Journal of Phytopathology*. 112(3): 229-237.
109. USDA, 2018. Plant Profile of *Origanum vulgare* (origano). <https://plants.usda.gov/core/profile?symbol=ORVU> : 09 mai 2018.
110. Vallée C. et Bilodeau G., 1999. Les techniques de culture en multicellules. Presse Université Laval, Laval, 245 p.
111. Van den Ende J.E. and Pennock I., 1996. The perfect stage of *Botrytis elliptica*. XIth International Botrytis Symposium, Wageningen, The Netherlands, 16 p.
112. Vellicce G. R., Ricci J. C. D., Hernández L. and Castagnaro A. P., 2006. Enhance resistance to *Botrytis cinerea* mediated by the transgenic expression of the chitinase gene Ch58 in strawberry. *Transgenic Research*. 15(1) : 57-68.
113. Verhoeff K., Malathrakis N. E. and Williamson B., 1992. Recent Advances in Botrytis Research: Proceedings of the 10th International Botrytis Symposium, Heraklion, Crete, Greece, 5-10 April 1992. Backhuys Publishers, S.A., 250 p.
114. Viennot-Bourgin G., 1965. Encyclopédie mycologique XXVII. Lechevalier, Paris, 350 p.

115. Wiegand I., Hilpert K. and Hancock R. E., 2008. Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances. *Nature Protocols*. 3(2) : 164-175.
116. Wilken-Jensen K., Gravesen S., 1984. Atlas of Moulds in Europe Causing Respiratory Allergy 2<sup>nd</sup> edition. ASK Publishing, S.A., 110 p.
117. Williamson B., Tudzynski B., Tudzynski P. and Van Kan J. A. L., 2007. *Botrytis cinerea*: the cause of grey mould disease. *Molecular Plant Pathology*. 8(5) : 561-580.
118. Wilson M., 2007. Fleurs comestibles, du jardin à la table. Editions Fides, Canada. 278 p.
119. Yuan Y., Huang M., Pang Y. X., Yu F. L., Chen C., Liu L. W., Chen Z. X., Zhang Y. B., Chen X. L. and Hu X., 2016. Variations in essential oil yield, composition, and antioxidant activity of different plant organs from *Blumea balsamifera* (L.) DC. at different growth times. *Molecules*, 21(8): 1024.
120. Zaika L. L., 1988. Spices and Herbs: Their Antimicrobial Activity and Its Determination. *Journal of Food Safety*. 9(2) : 97-118.

**Annexes :**

**Annexe 1 : Préparation du milieu PDA** (Potato Dextrose Agar, agar de dextrose de pomme de terre) selon Ismaili et *al.* (2014)

- Bouillir 200 g de pomme de terre dans 1000 ml d'eau distillée
- Filtrer le bouillon résultant,
- Ajouter 20 g de dextrose et 20 g d'agar en poudre.
- Ajuster par de l'eau distillée jusqu'à un volume de 1000 ml.
- Stériliser à l'autoclave à 100 kPa pendant 20 minutes.

**Annexe 2 : Préparation de la suspension d'eau-agar (à 0,2%)**

- Peser 2 g d'agar-agar.
- Ajouter 1 L d'eau distillée.
- Stériliser à l'autoclave à 100 kPa pendant 20 minutes.

**Annexe 3 : Préparation de la concentration 1/250 v/v (0,4 %) de l'huile essentielle**

Pour chaque boîte de Pétri :

- Emulsion : Ajouter 0,06 ml de l'huile essentielle à 1,5 ml d'eau-agar autoclavé (dilution 1/25 v/v).
- Agiter l'émulsion vigoureusement au vortex.
- Verser 1,5 ml de l'émulsion précédente dans la boîte de Pétri.
- Ajouter 13,5 ml du milieu PDA en surfusion dans la même boîte.
- Faire des mouvements en 8 soigneusement pour homogénéiser le milieu.
- Laisser refroidir.

**Annexe 4 : Tableau d'analyse de variance des taux d'inhibition In vitro selon les méthodes microatmosphère et contact direct.**

Analysis of Variance					
Source	Type III SS	df	Mean Squares	F-Ratio	p-Value
TRAITEMENTS	4,000	2	2,000	3,378E+016	0,000
Error	0,000	15	0,000		

**Annexe 5 : Tableau d'analyse de variance du taux d'infection in vivo traitement par micro atmosphère.**

Analysis of Variance					
Source	Type III SS	df	Mean Squares	F-Ratio	p-Value
TRAITEMENTS	964,873	1	964,873	2,913	0,000
Error	3 312,056	10	331,206		

**Annexe 6 :Tableau d'analyse de variance d'inhibition in vivo à température ambiante.**

Analysis of Variance					
Source	Type III SS	df	Mean Squares	F-Ratio	p-Value
TRAITEMENTS	0,510	1	0,510	13,533	0,000
Error	0,151	4	0,038		

**Annexe 7 :Tableau d'analyse de variance du taux d'inhibition de la croissance mycélienne in vivo à froid.**

Analysis of Variance					
Source	Type III SS	df	Mean Squares	F-Ratio	p-Value
TRAITEMENTS	20 000,000	2	10 000,000	.	.0,021
Error	0,000	6	0,000		