

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE  
SCIENTIFIQUE



UNIVERSITE BLIDA 1



FACULTE DES SCIENCES DE LA NATURE ET DE

LA VIE

DEPARTEMENT DE BIOTECHNOLOGIE

Projet de fin d'études en vue de l'obtention du Diplôme de Master académique en Sciences  
agronomiques

Spécialité : Agro-ressource et impact environnement

**Thème**

**Effet saisonnier sur l'activité antimicrobienne des huiles  
essentielles du romarin *Rosmarinus officinalis L.* de la région  
de Tissimssilt.**

Présenté par :

AZZOUNE Hamid

Devant le jury :

<b>M<sup>me</sup> CHAOUIA C.</b>	M.C.A	Université BLIDA 1	Présidente
<b>M<sup>r</sup> BENMOUSSA M.</b>	Professeur	Université BLIDA 1	Examineur
<b>M<sup>me</sup> BENRBIHA F.Z.</b>	Professeur	Université BLIDA 1	promotrice
<b>M<sup>me</sup> MOUAS Y.</b>	Attaché de recherche	Université BLIDA 1	Co-promotrice

Année universitaire : 2016-2017

## **Remerciements**

*Avant tout, mes remerciements infinis sont adressés à « Dieu le Tout Puissant » de m'avoir donné le courage et la santé pour achever ce travail.*

*Nos remerciements vont en particulier à : **Mme BENRBIHA F.Z.** notre promotrice, Professeur à l'Université Blida 1, que nous la remercions vivement pour son soutien, ses conseils précieux et ses critiques qui nous ont aidés au sein du laboratoire.*

***Mme CHAOUIA. C.** M.C.A. À l'Université Blida 1 Blida, que nous remercions pour nous avoir fait l'honneur de présider ce jury. **Mr BENMOUSSA M.** Professeur à l'Université Blida 1, pour avoir accepté d'examiner ce travail. **Mme MOUAS Y.** attachée de recherche, notre Co promotrice à l'Université Blida 1, qu'elle trouve ici l'expression de notre gratitude pour ses conseils et ses critiques qui nous ont aidés au sein de notre expérience.*

*Nous adressons encore nos remerciements à : L'ensemble des membres du département d'agronomie ; L'ensemble des membres de laboratoire ;*

***Monsieur Djazouli Z, E** le responsable de laboratoire de recherche université de Blida 1.*

***Mes dames, Sabrina, Hiba et Sihem** Ingénieurs de laboratoire chimique, université Blida 1.*

***Madame Abbabcia A.** Directrice de la SRPV Boufarik.*

***Madame Saddek D** Ingénieur de laboratoire de bactériologie de la SRPV Boufarik.*

***Madame Bencheikh kh** Ingénieur de laboratoire de Mycologie de la SRPV Boufarik.*

*Nous remercions tous les membres de l'équipe de laboratoires de la SRPV de Boufarik pour leur accueil, leur sympathie ainsi que leurs idées constructives.*

*Je dédie ce travail à :*

*- Mes très chers parents qui m'ont toujours encouragé, que dieu les protège et je profite cette occasion pour leur dire encore merci pour tout que vous avez fait pour moi et je vous souhaite le tout le bonheur*

*-Mes chers frères et sœurs*

*-Mes amis surtout : AMINE, SOFIANE  
KHAOULA, RYM SOFINE, ABDOU B, HAFID  
M, MIDOU, LOKMAN, ISMAIL, ABDOU,  
ISLAM, AMINE, HOCINE, YASSER,  
YACOUB, TAQI EL DIN, NOUREDDINE, FARES  
, ET, IMINE S, ET SARAH...*

*-toutes mes connaissances du département  
Biotechnologie....*

*HAMID.*

### Résumé

#### **Effet saisonnier sur l'activité antimicrobienne des huiles essentielles du romarin *Rosmarinus officinalis L.* de la région de Tissimssilt.**

Cette étude a pour objectif d'évaluer l'activité biocide *Rosmarinus officinalis L.* de la région de Tissemsilt sur deux souches phytopatogènes. Notre travail de recherche a porté sur le pouvoir antimicrobien de l'huile essentielle en fonction des saisons et des doses. L'extraction de l'huile essentielle a été effectuée par hydro distillation. L'aromatogramme a permis de mettre en évidence le pouvoir antimicrobien de l'huile essentielle, vis-à-vis les souches phytopathogènes testées. L'activité insecticide de romarin des trois saisons vis-à-vis la mineuse de la tomate, a été évaluée par l'estimation de taux de mortalité des larves. Les tests antifongiques de l'huile essentielle de romarin *Rosmarinus officinalis L.* ont donné une zone d'inhibition de 16,66 mm pour la souche *Fusarium sp.* Avec inhibition de la germination et la sporulation de ce champignon.

Les résultats montrent que l'huile essentielle du *Rosmarinus officinalis* possède une activité antibactérienne plus ou moins importante sur *Erwinia amylovora* avec des diamètres d'inhibition allant de 6,73mm à 13.05mm. La sensibilité des souches testées (bactérie et champignon) varie selon les saisons et selon les doses. Un taux de mortalité de 100% de l'insecte *tuta absoluta* la mineuse de la tomate est enregistré pour la dose D7 =1%.

**Mots clés :** *Rosmarinus officinalis*, huile essentielle, hydrodistillation, activité biocide.



## Abstract

---

### Effect Seasonal on antimicrobial activity of *rosmarinis officinalis*.L essential oils tissimsilt region

The objective of this study is to evaluate the *Rosmarinus officinalis* L. biocidal activity of the Tissemsilt region on two phytopathogenic strains. Our research focused on the antimicrobial power of essential oil in relation to seasons and doses.

The extraction of the essential oil was carried out by hydro distillation. The chromatogram showed the antimicrobial power of essential oil, in relation to the phytopathogenic strains tested. The insecticidal activity of rosemary in the three seasons against the tomato leaf miner was assessed by estimating larval mortality rates.

The anti-fungal tests of *Rosmarinus officinalis* L. rosemary essential oil gave a zone of inhibition of 16.66 mm for the *Fusarium* sp. With inhibition of germination and sporulation of this fungus.

The results show that the essential oil of *Rosmarinus officinalis* has a more or less important antibacterial activity on *Erwinia amylovora* with an inhibition diameter ranging from 6.73 mm to 13.05 mm. The sensitivity of the strains tested (bacteria and fungus) varies according to the seasons and the doses. A mortality rate of 100% of the insect *tota absoluta* the tomato leaf miner is recorded for the dose D7 = 1%.

All the results are only a first step in the search for biologically active substances of natural origin.

**Key words:** *Rosmarinus officinalis* L. essential oil, hydrodistillation, biocidal activity.

## التأثير الموسمي لنشاط المضادات الميكروبية للزيوت الأساسية لإكليل الجبل *Rosmarinus officinalis L* لمنطقة تيسمسيلت

هذه الدراسة تهدف إلى تقييم نشاط المبيد البيولوجي لإكليل الجبل *Rosmarinus officinalis L* لمنطقة تيسمسيلت مجرب على سلالتين من مسببات الأمراض النباتية. حيث يركز بحثنا على تأثير المضادات الميكروبية للزيوت الأساسية وفقاً للمواسم والجرعات. تم استخراج الزيوت الأساسية بواسطة التقطير المائي.

الأروماتوغرام سمح بإظهار تأثير المضادات البكتيرية للزيوت الأساسية مجربة على السلالات الممرضة.

نشاط المبيد الحشري لإكليل الجبل في ثلاث مواسم مجرب ضد عثة الطماطم *tuta absoluta* تم تقييمه عن طريق تقدير معدل وفيات اليرقات.

أعطت اختبارات المضادات الفطرية لزيوت الأساسية لإكليل الجبل منطقة تثبيط تتراوح ب 16,66 ملم ضد سلالة *Fusarium sp* مع إيقاف نمو وانتشار هذا الفطر.

بينت النتائج كذلك أن الزيوت الأساسية لإكليل الجبل تحتوي على نشاط ضد بكتيريا *Erwinia amylovora* في منطقة تثبيط تتراوح ب 6, 73 إلى 13,05 ملم. تتغير حساسية السلالات المجرية (بكتيريا و فطريات) بتغير المواسم و الجرعات. كذلك وصلت نسبة وفيات 100 % لحشرة عثة الطماطم *tuta absoluta* في جرعة سجلت ب 1%D7.

كل هذه النتائج ليست سوى خطوة أولى في البحث عن المواد الطبيعية الاصل ذات النشاط بيولوجي.

### الكلمات المفتاحية:

إكليل الجبل، الزيوت الأساسية، التقطير المائي، نشاط المبيد البيولوجي.

## LISTE DES TABLEAUX

<b>Tableau 1</b> : Les diamètres d'inhibition et leurs degrés de sensibilités.....	29
<b>Tableau 2</b> : Rendement en huile essentielle de <i>Rosmarinus officinalis l</i> , spontané des trois saisons : automne, hiver et printemps.....	31
<b>Tableau 3</b> : Caractéristiques organoleptiques de l'huile essentielle de <i>Rosmarinus officinalis l</i> .....	33
<b>Tableau 4</b> : analyse de la variance de l'activité antimicrobienne vis-à-vis <i>Erwinia amylovora</i> .....	Annexe 4.
<b>Tableau 5</b> : analyse de la variance de l'activité antimicrobienne vis-à-vis <i>fusarium sp</i> .....	Annexe 5.
<b>Tableau 6</b> : analyse de la variance de l'activité insecticide vis-à-vis <i>Tuta absoluta</i> .....	Annexe 6.
<b>Tableau 7</b> : Sensibilité des bactéries et champignons à l'huile essentielle de <i>Rosmarinus officinalis l,spontane</i> .....	34

## LISTE DES FIGURES

<b>Figure 01</b> : Montage d'entraînement à la vapeur d'eau (EL-Haib, 2011).....	5
<b>Figure 02</b> : <i>Rosmarinus Officinalis</i> .....	10
<b>Figure 3</b> : Situation géographique de la zone d'étude.....	13
<b>Figure 4</b> : Répartition mensuelle de la température dans la wilaya de Tissemsilt.....	14
<b>Figure 5</b> : Evolution des moyennes des précipitations annuelles (1976-2006).....	15
<b>Figure 6</b> : les feuilles de romarin, <i>Rosmarinus officinalis</i> L. spontané de la Région tissimssilt utilise dans l'expérimentation. ....	16
<b>Figure 7</b> : Séchage du Romarin (photo originale).....	17
<b>Figure 8</b> : culture de tomate sous serre attaqué par <i>Tuta absoluta</i> .....	18
<b>Figure 9</b> : <i>Tuta absoluta</i> stade larvaire.....	19
<b>Figure 10</b> : Système d'hydrodistillation Clevenger (photo originale).....	20
<b>Figure 11</b> : Illustration de la méthode des aromatoigrammes sur boîte de Pétri (Zaika, 1988).....	25
<b>Figure 12</b> : Principe de la méthode de diffusion par disque.....	28
<b>Figure 13</b> : Rendement en huiles essentielles de <i>Rosmarinus officinalis</i> , spontané..	32
<b>Figure 14</b> : Huile essentielle de <i>Rosmarinus officinalis</i> .spontané.pour trois saisons, automne, hiver, printemps.....	33
<b>Figure 15</b> : Histogramme représentant les zone de d'inhibition des Bactérie (Erwinia amylovova) pour les trois saisons.....	35
<b>Figure 16</b> : Histogramme de effet comparé par le test d'anova pour bactérie <i>Erwinia</i> pour trois huile de romarin.....	36
<b>Figure 17</b> : Histogramme représentant les zones inhibitions de Champignon <i>fusarium sp</i> , pour trois saisons, automne, hiver et printemps.....	37
<b>Figure 18</b> : Effet comparé par le test d'anova pour <i>Fusarium sp</i> .....	38
<b>Figure 19</b> : Effet de trois huiles essentielles de romarin sur la croissance mycélienne des souches de <i>Fusarium sp</i> .....	39
<b>Figure 20</b> : Effet de trois huiles essentielles de romarin sur la croissance mycélienne des souches de <i>Fusarium sp</i> .....	40
<b>Figure 21</b> : Effet de trois huiles essentielles de romarin sur la germination de champignon <i>fusarium sp</i> .....	40

<b>Figure 22</b> : Effet de trois huiles essentielles de romarin sur la sporulation de champignon <i>fusarium sp</i> .....	41
<b>Figure 23</b> : Effet biocide des différentes huiles de romarin.....	42

## LISTE DES ABREVIATIONS

**%** : pourcentage

**°** : degré

**AFNOR** : Association Française de Normalisation.

**H.E** : Huile Essentielle .

**M<sub>HE</sub>** : Masse de l'Huile Essentielle.

**min** : minute.

**mm** : millimètre.

**M<sub>v</sub>** : Masse de la matière végétale

**OMS** : Organisation Mondiale de la Santé

**P** : Pluviométrie

**P.S** : Période sèche.

**R<sub>HE</sub>** : Rendement en Huiles Essentielles.

**V<sub>HE</sub>** : Volume de l'Huile Essentielle.

**W** : Wilaya.

# Table des matières

Introduction.....	1
<b>Chapitre 1 :LES HUILES ESSENTIELLES</b>	
I. Généralité sur les huiles essentielles.....	3
I.1.Historique.....	3
I.2. Définition des huiles essentielles.....	3
I.3. Localisation des huiles essentielles dans la matière végétale.....	4
I.4. caractéristiques physico-chimiques des huiles essentielles .....	4
I.5.Classification des huiles essentielles .....	4
I.6. Techniques d'extraction des huiles essentielles .....	5
I.7. Activités biologiques des Huiles essentielles .....	5
I.7.1. Activité antimicrobienne.....	5
I.7.1.1 Activité antibactérienne.....	6
I.7.1.2 Activité antifongique.....	6
I.7.2. Activité liée à la composition chimique.....	6
I.7.3. Domaine d'utilisation des huiles essentielles.....	7
I.7.4. Utilisation des huiles essentielles dans la protection des cultures .....	8
<b>Chapitre 2 : GENERALITES SUR ROSMARINUS OFFICINALIS</b>	
I. Origine, position systématique et caractéristiques botaniques.....	10
I.1. Ecologie et répartition de <i>Rosmarinus officinalis</i> .....	10
I.1.1.Répartition géographique.....	11
I.2. Utilisation de Romarin.....	11
I.3. Propriétés thérapeutiques et indications de Romarin.....	11
I.3.1. <i>Usage interne</i> .....	11
I.3.2. Usage externe.....	12
<b>Chapitre 3 : Matériel et méthodes</b>	
1 .Objectif.....	13
2 .Présentation de la région d'étude.....	13
2.1. Situation géographique.....	13
2. 2. Couvert végétal .....	14

---

## Table des matières

2.3. Caractéristiques climatiques.....	14
2.3. 1 .Températures.....	14
2.3.2. Précipitations.....	15
3. Lieux d'expérimentation.....	16
4. Matériel végétale.....	16
4.1. Récolte du matériel végétal.....	17
4.2. Traitement du matériel végétal.....	17
5. Matériel biologique.....	17
5.1. Souche bactérienne.....	17
5.2. Souche fongique.....	18
5.3. Insecte.....	18
6. Extraction des huiles essentielles.....	19
6.1. Méthoded'extraction .....	19
6.2. Présentation du dispositif d'extraction .....	20
6.3. Mode opératoire.....	20
7. Paramètres étudiés.....	21
7.1. Le rendement en huiles essentielles.....	21
7.2.Les caractéristiques organoleptiques.....	21
7.3. Etude de l'activité biocide.....	22
7.3.1. Activité fongicide .....	22
7.3.1.1- Isolats fongiques .....	22
7.3.1.2. Etude du pouvoir antifongique <i>in vitro</i> d'huile essentielle du romarin .....	23
7.4.1. Evaluation de l'activité antimicrobienne.....	25
7.4.2. Activité bactéricide .....	26
7.4.2.1 Préparation des dilutions d'huile essentielle.....	26
7.4.2.2..Evaluation de l'activité antimicrobienne de l'HE de <i>Rosmarinus officinalis</i> .....	26
7.5.1. Activité insecticide .....	29
7.5.1.1. Prélèvements des échantillons.....	29
7.5.1.2. Préparation et application des doses du bio-pesticide à base de l'huile de romarin.....	29
8. Analyses statistiques .....	30
<b>Chapitre 4 : Résultats et discussions</b> 31	
1. Détermination du rendement en huile essentielle.....	31

---



## Table des matières

2. Résultats des analyses organoleptiques.....	32
3. Evaluation de L'activité antimicrobienne de l'HE de <i>Rosmarinusofficinalis</i> .....	34
3.1. Evaluation de l'activité antimicrobienne de l'huile essentielle de romarin vis-à-vis <i>Erwinia amylovora</i> .....	35
3-2 Evaluation de l'activité antimicrobienne de l'huile essentielle de romarin vis-à-vis <i>fusarium sp</i> .....	36
3.2.1. Evaluation la croissance mycélienne de <i>fusarium sp</i> vis-à-vis les trois huiles essentielles de romarin.....	38
3.2.2. Evaluation de la germination de <i>Fusariumsp</i> vis-à-vis les trois HE de romarin.....	40
3.2.3. Evaluation de la sporulation de <i>Fusarium sp</i> vis-à-vis les trois HE de romarin.....	41
4. Evolution de l'effet biocide des huiles essentielles de romarin sur l'abondance larvaire de la mineuse de tomate ( <i>tutaabsoluta</i> ).....	41
<b>Discussion</b>	
1. Effet de l'huile essentielle de <i>R. officinalis</i> sur <i>Erwinia amylovora</i> .....	43
2. Effet d'huile essentiel de <i>R. officinalis</i> sur <i>Fusarium sp</i> .....	44
3. Effet d'huile essentiel de <i>R. officinalis</i> sur la mineuse <i>Tuta absoluta</i> de la tomate.....	46
Conclusion.....	47
<b>Annexe</b> .....	63

## INTRODUCTION

---

Depuis le début de la civilisation humaine. Les paysans pratiquaient des techniques traditionnelles en ajoutant aux culture les produits locaux tels que les minéraux, les huiles, les feuilles ou extraits de plante pour leur protection contre les infestations multiples depuis **(Regnault-Roger *et al.*, 2008; Philogène *et al.*, 2008; Vincent *et al.*, 2000; Vincent *et al.*, 2003; Foua-Bi, 1993)**. D'après ces auteurs, les produits végétaux à action phytosanitaire ont une très longue histoire et les techniques, traditionnellement bien établies, ont apporté leur preuve d'efficacité dans plusieurs pays africains. Ces pratiques ont été abandonnées au profit des méthodes modernes à cause des nombreux changements subits par l'agriculture au cours des dernières décennies **(Thiam et Ducommun, 1993; FAü, 1990)**.

Malgré les moyens dont dispose la science, les insectes continuent encore à peser lourdement au bilan des pertes. Dans les pays en développement, les estimations varient de 30 à 50% des récoltes **(Helbig, 1995; Foua-Bi, 1992; Alzouma, 1990; Hall, 1970)**. Autrement dit, le tiers ou la moitié de ce qui est produit ne parvient jamais aux consommateurs et le travail et l'argent investis sont irrémédiablement perdus **(Weidner et Rack., 1984; Wheathey, 1973; Scotn, 1973)**.

Un grand nombre des plantes, aromatiques, médicinales, des plantes épices et autres, possèdent des propriétés biologiques très intéressantes, qui trouvent application dans divers domaines à savoir en médecine, pharmacie, cosmétologie et l'agriculture. Cependant, l'évaluation des propriétés phytothérapeutiques comme antioxydante et antimicrobienne, demeure une tâche très intéressante et utile, en particulier pour les plantes d'une utilisation rare ou moins fréquentes ou non connues dans la médecine. Ces plantes représentent une nouvelle source des composés actifs. **(Vanden Berghe et Vlietinck, 1991)**.

Aujourd'hui, les traitements à base de plantes reviennent au premier plan, car l'efficacité des médicaments tels que les antibiotiques décroît. Les bactéries et les virus se sont peu à peu adaptés aux médicaments et leur résistent de plus en plus . Une grande partie des recherches actuelles porte sur l'étude de molécules antioxydantes et antimicrobiennes comme les vitamines, les caroténoïdes et les polyphénols. Récemment, l'attention s'est portée sur les herbes et les épices comme source d'antioxydants.

## INTRODUCTION

---

Les bactéries sont responsables de plusieurs maladies. Leur résistance aux antibiotiques est de plus en plus prononcée. Pour arrêter ce processus de synthèse-résistance, il est nécessaire de chercher une autre approche afin de diminuer ou d'éliminer les affections sans l'utilisation des produits synthétiques, donc il est évident de trouver des solutions par l'utilisation des molécules bioactives qui sont à base de plantes. Jusqu'à présent, l'activité biologique des huiles essentielles n'a été considérée que comme un biocide et/ou biostatique à l'encontre des bioagresseurs, ensuite décomposée en un ensemble de variables sous-jacentes comme la dose et la durée d'exposition (**RAVI KIRAN et al., 2006 ; SARTORELLI et al., 2007**).

Dans le cadre de la valorisation des espèces végétales algériennes, et compte tenu des vertus thérapeutiques que représentent les Lamiacées (Labiées), nous nous sommes intéressés à l'huile essentielle de « *Rosmarinus Officinalis L.* » provenant de la région de Tissimssilt . Le romarin (*Rosmarinus Officinalis L.*), herbe aromatique de la famille des Labiées, appréciée pour ses propriétés aromatiques, antioxydantes, antimicrobiennes, antispasmodiques, emménagogues et anti-tumorales, largement utilisée dans les produits pharmaceutiques et en médecine traditionnelle **Athamena.S (2009)**.

Il nous semble donc, intéressant d'inscrire notre travail dans ce contexte de recherche. Notre choix est porté sur le romarin spontané car c'est une plante cosmopolite aussi pour ses propriétés thérapeutiques et antioxydants.

L'objectif de notre travail est d'analyser les huiles essentielles du Romarin issus de différente saison et les propriétés antimicrobiennes (fongique le *Fusarium sp.* de ble, bacterien visa- vi la souche *Erwinia amylovora*. et insecte la mineuse de la tomate *Tuta absoluta* ) de cette huile.

L'objectif de ce travail consiste à déterminer l'effet de la saison sur les variations dans le rendement en huile essentielle et de mettre en évidence son pouvoir biocide vis-à-vis deux microorganismes phytopathogènes (*Erwinia amylovora* et *Fusarium sp*) et la mineuse de la tomate (*Tuta absoluta*).

## I. Généralité sur les huiles essentielles

### I.1. Historique :

L'utilisation des huiles essentielles remonte à la Haute antiquité, période à laquelle ces dernières furent connues. En effet, 4000 ans avant J.C., les Egyptiens préparaient déjà l'essence de cèdre par distillation sèche et effectuaient aussi les momifications suivant une technique très minutieuse à l'aide d'essences aromatiques dont ils avaient remarqué les propriétés antiseptiques. La première essence signalée dans un traité médical est celle du romarin utilisée au XIII<sup>e</sup> siècle pour ses propriétés curatives. Le romarin est connu depuis l'Antiquité pour son parfum balsamique. **(Valisolalao, 1989)**.

En 1931, le chimiste français René-Maurice Gatte fossé publia ses découvertes dans son livre intitulé «Aromathérapie». Il est considéré comme le père de l'aromathérapie moderne. Durant la guerre de 1939-1945, le Dr. **Jean Valnet** guérissait les blessures en utilisant des huiles essentielles. Les vertus curatives des huiles essentielles furent vulgarisées par son premier livre publié en 1964 : « L'aromathérapie, traitement des maladies par les essences des plantes » **(Anonyme 2015)**.

Cependant, on se rend compte de la supériorité de la valeur olfactive et thérapeutique des huiles essentielles, ainsi que de leur innocuité, d'où l'intérêt pour les essences jusqu'à nos jours **(Nourachani, 2010)**.

### I.2. Définition des huiles essentielles :

Les huiles essentielles sont des substances huileuses, volatiles et odorantes qui sont sécrétées par les plantes aromatiques que l'on extrait par divers procédés dont l'entraînement à la vapeur d'eau et l'hydro distillation **(Oakes R. S. et al., 2001)** par pressage ou incision des végétaux qui les contiennent. Elles se forment dans un grand nombre de plantes comme sous-produits du métabolisme secondaire **(Angus S. et al., 1976)** Elles sont très utilisées dans l'industrie des produits cosmétiques, pharmaceutiques et agro-alimentaire **(Eckert C. A., Knutson B. L. 1993)**.

Les huiles essentielles se retrouvent dans des glandes minuscules situées dans différentes parties de la plante aromatique : les feuilles, les fleurs, les fruits, les graines, l'écorce et pour certaines plantes dans les racines. Plus de 2000 espèces de plante sont riches en huiles essentielles ; elles sont réparties sur 60 familles dont les principaux sont: Lauraceae, Labiatea, Umbelliferae, Rutaceae, Compositae, Myrtaceae et les Pinaceae **(Luque deCastro M.D. et al., 1994)**

Les huiles essentielles des plantes ont trouvé leur place en aromathérapie, en pharmacie, en parfumerie, en cosmétique et dans la conservation des aliments. Leur utilisation est liée à leurs larges spectres d'activités biologiques reconnues (**Jitaru M. et al ., 1997**).

### **I.3. Localisation des huiles essentielles dans la matière végétale**

Les huiles essentielles se trouvent dans des glandes minuscules situées dans les différentes parties de la plante aromatique **BRUNETON, J. (1993)**.

- Dans les feuilles comme le basilic.
- Dans les fleurs comme la rose.
- Dans les fruits comme le citron.
- Dans les graines comme la coriandre.
- Dans l'écorce comme la cannelle.
- Dans les racines pour certaines plantes.

Les huiles essentielles sont souvent localisées sur ou à proximité de la surfaces de la plante. Si l'on écrase la feuille (ou partie concernée) d'une plante aromatique, des petites poches vont se briser laissant s'échapper la substance aromatique. C'est pour cette raison que la récolte se fait au meilleur moment en fonction des substances que l'on veut extraire et des conditions extérieures (climat, période de l'année ...), car la plante ne développe pas les mêmes composants selon la période de l'année.

### **I.4. caractéristiques physico-chimiques des huiles essentielles**

Les huiles essentielles ne sont pas des huiles grasses, leurs composants volatils ne tachent pas le papier, leur rapidité et leur puissance d'effet, l'étendue du champ thérapeutique contrôlé et surtout leurs actions électromagnétiques et vibratoires sont autant de paramètres actif et étonnants qui fond leur particularité (**Grosjean, 2007**).

### **I.5. Classification des huiles essentielles**

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

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

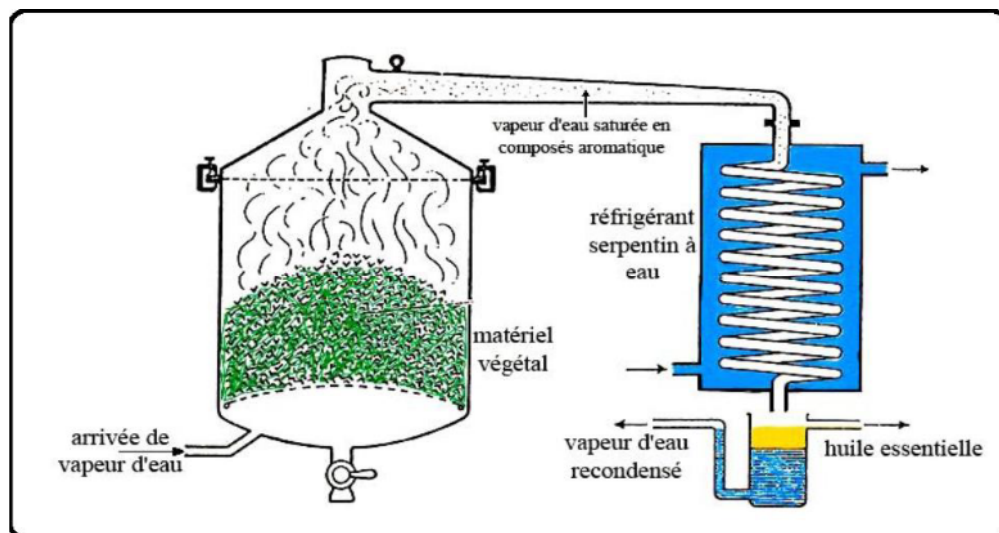
## I.6. Techniques d'extraction des huiles essentielles

Selon **Bruneton (1999)**, les huiles essentielles peuvent être extraites par diverses méthodes

:

- 1- l'hydrodistillation et l'entraînement à la vapeur,
- 2- l'expression,
- 3- l'enfleurage,
- 4- l'extraction par les solvants volatils,
- 5- l'extraction par le dioxyde de carbone supercritique
- 6- l'extraction au four à micro-ondes.

Les méthodes les plus utilisables sont l'hydro distillation et l'entraînement à la vapeur.(**Figure 01**)



**Figure 01. Montage d'entraînement à la vapeur d'eau (EL-Haib, 2011)**

## I.7. Activités biologiques des Huiles essentielles

### I.7.1. Activité antimicrobienne

De nombreux auteurs ont rapporté que les extraits d'herbes ont des composés chimiques capables d'avoir une activité antimicrobienne (**DORANTES *et al.*2000; DJENANE *et al.* 2002 et 2006 ; KUDA *et al.* 2004, BOUSBIA, 2004**).

### I.7.1.1 Activité antibactérienne

Les Huiles essentielles les plus étudiées pour leurs propriétés antibactériennes appartiennent aux *Labiatae* : origan, thym, sauge, romarin, clou de girofle sont d'autant de plantes aromatiques à Huiles essentielles en composés phénoliques comme l'eugénol, le thymol et le carvacrol. Ces composés ont un effet antimicrobien contre un large spectre de bactéries : *E. Coli*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Listeria monocytogenes*, *Clostridium sp.*, *Helicobacter pylori* (PAULI, 2001).

Les mécanismes par lesquels les Huiles essentielles exercent leur activité antibactérienne sont mal connus.

Du fait de la complexité de leur composition chimique, il est difficile de donner une idée précise sur le mode d'action des Huiles essentielles. Il est probable que leur activité antibactérienne ne soit pas attribuable à un mécanisme unique, mais à plusieurs sites d'action au niveau cellulaire (DORMAN & DEANS, 2000)

### I.7.1.2 Activité antifongique

Le pouvoir antifongique des Huiles essentielles des plantes aromatiques, contre les moisissures allergisantes, a été mis en évidence par de nombreux travaux (BILLERBECK *et al.* 2002 ; KOBAYASHI *et al.* 2004 ; OUSSOU *et al.* 2004 ; OURAINI *et al.* 2005).

TEIXEIRADUARTE, 2005 a rapporté un effet antifongique contre les dermatophytes et les champignons pathogènes et opportunistes tels que *Candida albicans* (levure), *Cryptococcus neoformans* et *Aspergillus fumigatus*.

Des travaux similaires ont été réalisés par MOMAMMEDI, (2006) sur l'huile essentielle de *Cistus ladaniferus* contre sept moisissures : *Rhizopus*, *Mucor*, *Alternaria*, *Fusarium*, *Penicillium*, *Trichoderma* et *Aspergillus*.

OMIDBEYGI *et al.* (2007) ont démontré que les Huiles essentielles de thym, de la sarriette et du clou de girofle présentent une activité antifongique « *in vitro* » contre *Aspergillus flavus*.

Les Huiles essentielles d'*Eucalyptus saligna* et d'*Eucalyptus camaldulensis* ont montré un effet fongistatique vis-à-vis de *Phaeoramularia angolensis* (JASET-DONGMO *et al.* 2008).

### I.7.2. Activité liée à la composition chimique

L'efficacité d'une huile essentielle dépend de sa richesse en composés phytochimiques; plus l'huile essentielle est riche en substances actives, plus son activité est importante.

L'activité biologique d'une huile essentielle est liée à sa composition chimique et aux groupements fonctionnels des composés majoritaires (alcools, phénols, les composés terpéniques

et cétoniques). Les composés minoritaires jouent aussi un rôle important dans l'activité des Huiles essentielles et semblent agir en synergie avec les composés principaux (ZHIRI, 2006).

Les composés chimiques qui ont plus d'efficacité et, à large spectre sont les phénols (thymol, carvacrol, eugénol), les alcools ( $\alpha$ -terpinéol, terpinen-4-ol, linalol), les aldéhydes, les cétones et rarement les terpènes (DORMAN & DEANS, 2000).

### I.7.3. Domaine d'utilisation des huiles essentielles

- **Phytothérapie**

C'est une branche de la phytothérapie qui utilise les HE pour traiter un certain nombre de maladies. Le terme aromathérapie vient du chimiste français **Gattefosse**, qui a utilisé l'HE de lavande pendant la première guerre mondiale, pour soigner des blessures et des infections. Selon lui la lavande était plus appropriée pour traiter les infections, que plusieurs antiseptiques utilisés à cette époque. Cette spécialité préoccupe de plus en plus des médecins et des pharmaciens, qui ont publié un nombre important d'ouvrages d'aromathérapie (**Roulier, 1992**). Les HE sont largement utilisées pour traiter certaines maladies internes et externes (infections d'origine bactérienne ou virale, troubles humoraux ou nerveux) [**Kato et al., (1990)** et **Schwartz et al., (1992)**]

- **En cosmétologie**

Les HE sont largement utilisées dans la fabrication des produits cosmétiques tels que les parfums, savons, lotions et pommade de soins (**Wilson, (2002)** ; **Worwood, (2001)** ; **Aquino, (2002)**).

D'après **Demange et Serrano (2007)**, les huiles essentielles sont connues depuis des millénaires pour leurs incroyables vertus, elles sont utilisées comme conservateurs, parfums naturels et agents actifs efficaces dans les produits cosmétiques bios. Cependant, étant des produits actifs très concentrés, il est nécessaire de respecter le dosage.

Les HE sont destinés à être utilisées sous forme diluée dans les produits cosmétiques (**Anton et al., 2006**).

- **En agroalimentaire**



Les HE peuvent être utilisés comme additifs alimentaires (**Deba et al, 2008**). Elles sont actuellement employées comme arômes alimentaires, et peuvent servir en même temps comme agents de conservation des aliments, grâce à leur effet antimicrobien, et ce d'autant plus qu'elles sont reconnues comme saines (**Caillet et Lacroix, 2007**).

#### **I.7.4 . Utilisation des huiles essentielles dans la protection des cultures**

La lutte contre les ravageurs des cultures est aussi ancienne que l'agriculture elle-même. Chaque époque a donc mis son savoir au service de la recherche de nouvelles techniques. Ainsi, dès l'antiquité les premiers recours à des produits chimiques ont été documentés. Mais c'est au cours des deux siècles écoulés que les méthodes de lutte ont connu leur apogée, permettant d'augmenter considérablement les rendements et de conserver les précieuses récoltes.

L'utilisation répandue des insecticides synthétiques a mené à beaucoup de conséquences négatives (la résistance des insecticide, la toxicité sur la faune auxiliaire, les problèmes de résidu et la pollution environnemental) ayant pour résultat l'attention croissante étant donnée aux produits naturels (**Isman, 2005**).

Les plantes peuvent fournir des solutions de rechange potentielles aux agents actuellement utilisés contre les insectes parce qu'elles constituent une source riche en produits chimiques bioactifs. Beaucoup d'effort a été donc concentré sur les matériaux dérivés de plante pour les produits potentiellement utiles en tant qu'agents commerciaux de lutte contre les insectes (**Kim et al., 2003**). Les plantes aromatiques sont parmi les insecticides les plus efficaces d'origine botanique et les huiles essentielles constituent souvent la fraction bioactive des extraits de plantes (**Shaaya et al., 1997**).

- **Activité insecticide des huiles essentielles**

L'effet insecticide des huiles essentielles par contact, ingestion et par fumigation a été bien démontré contre les déprédateurs des denrées entreposées, de nombreux travaux ont porté sur l'amélioration des formes d'utilisation des plantes qui permettent de renforcer et de rentabiliser leur activité insecticide (**Isman, 1994**).

Certaines observations ont montré que l'extrait brut éthanolique (**Tierito-Nieber et al. 1992**), hexanique (**Nuto, 1995**) ou à l'éther de pétrole (**Gakuru et Foua-bi, 1996**), de matériel végétal possède une toxicité effective vis-à-vis des ravageurs de stocks.

Des tests de l'efficacité insecticide des huiles essentielles de certaines plantes, ont été réalisés sur des ravageurs de denrées stockées *Callosobruchus maculatus* et *Callosobruchus chinensis*, montrent qu'une concentration de 0,4 % provoqua la mortalité de plus de 60 % des bruches après deux jours de traitements **(Tapondjou et al., 2002)**.

### I. Origine, position systématique et caractéristiques botaniques

*Rosmarinus* : ancien nom latin de cette plante. *Marinus* : du latin marin, *Ros* : Rosée apparenté à rhus : buisson. Cette plante habite souvent les coteaux maritimes. (Figure 02) Habituellement considérée comme monotypique, elle est présente sur le littoral dans tout le bassin méditerranéen surtout en région calcaire. Elle y fleurit toute l'année, ses fleurs sont mellifères. Elle peut être sous forme d'arbuste, sous-arbrisseau ou plante herbacée



Figure 02. *Rosmarinus Officinalis*,(photo originale2017)

Selon **Quezel et al. (1963)**, le romarin appartient au sous-règne des Cormophytes, à l'Embranchement des Spermaphytes, au Sous embranchement des Angiospermes, à la Classe des Eudicots, à la Série des super ovaires des Tétracyclique, à l'Ordre des Lamiales, à la Famille des Lamiacées, au Genre *Rosmarinus* et à l'espèce *Rosmarinus officinalis* (**Linné, 1757**). Elle est connue sous le Nom vulgaire : Romarin.

#### I.1. Ecologie et répartition de *Rosmarinus officinalis*

Le romarin est retrouvé à l'état spontané comme il peut être cultivé. C'est la plante la plus populaire dans le bassin méditerranéen : en Algérie, nous la trouvons dans les jardins, les parcs des sociétés, des écoles. Elle se trouve toujours en bordure sous forme d'une bande odorante. Les fleurs bleues s'épanouissent tout au long de l'année ce qui attire de nombreux insectes. Nous

pouvons rencontrer le romarin à différentes altitudes suivant les étages bioclimatiques (Emberger, 1960).

### **I.1 .1.Répartition géographique**

Selon Guinochet et *al.* (1973), le romarin se reparti tout au long de la mer méditerranéenne et le reste de l'Europe d'où son nom « rose de la mer ». « Rose »,

D'après Perrot et Paris (1971), cette plante existerait aussi en Corse et au Portugal. En France, elle pousserait abondamment dans les terrains calcaires du midi en particulier sur le littoral méditerranéen (aux faibles altitudes) d'où il remonte même jusqu'au massif central (Provence, Roussillon, Languedoc) Cette plante est également cultivée dans de nombreux pays tel que l'Espagne, l'Italie, la Tunisie, le Maroc et l'Algérie (Garnier et *al.*, 1961).

En Algérie cette plante est bien apparente en différente région. En Oranie elle est souvent cultivée comme plante romarin à différente d'ornement cette plante est retrouvée dans la steppe à Sid Djilali dans la région de Sid El Makhfi, ainsi on peut la voir dans le littoral a Béni Saf dans la zone de Sid Safi. Nous pouvons rencontrer le altitude suivant les étages bioclimatiques à titre d'exemple, il est retrouvé à Tlemcen : lala Seti 1025 mètre, le grand bassin 750 mètres, et chetouan (Mostefai , 2012).

### **I.2. Utilisation de Romarin**

#### **- Agriculture**

Les hautes plaines steppiques connaissent aujourd'hui une forte dégradation qui se traduit par la réduction du potentiel biologiques et la rupture des équilibres écologiques et socio-économiques.

Afin de préserver et d'améliorer les sols de ces régions, la valorisation des espèces spontanées (fourragères et médicinales) connues pour leurs tolérances à la sécheresse et à la salinité telle que le romarin, s'avère indispensable.

Le romarin préfère les sols argilo-calcaires, de pH 7 à 8. En sol trop calcaire, le chlorose ferrique entraine un jaunissement du romarin. Poussant naturellement dans la garrigue, le romarin peut valoriser des terrains pauvres, mais se développe mieux en terrain profond, léger et perméable. I.T.E.I.P.M.A.I (1991).

### **I.3. Propriétés thérapeutiques et indications de Romarin**

Depuis longtemps, le romarin est utilisé à des fins très diverses.

### **I.3.1. Usage interne**

Le romarin est connu pour ces multiples propriétés. En raison de sa teneur en huile essentielle, la drogue est utilisée comme carminatif et stomachique dans les troubles digestifs, les ballonnements, les flatulences, mais aussi pour stimuler l'appétit et les sécrétions gastriques. Son usage comme cholagogue et cholérétique, rare en Allemagne, plus répandu en France, est surtout dû aux principes amers, le romarin présente aussi, des propriétés emménagogues dues à l'hyperémie qu'il détermine dans les organes du bassin. Ses propriétés emménagogues, sont mises à profit dans le traitement de l'aménorrhée, oligoménorrhée, dysménorrhée (**Garnier et al., 1961**).

### **I.3.2 . Usage externe**

Le romarin entrait dans la composition du «vinaigre des 4 voleurs». Il entre dans les baumes tranquilles, de l'eau de dardel (stimulant), du baume nervin (stimulant, antirhumatismal) (**Valnet, 1984**). L'huile essentielle et certaines préparations à base de romarin entrent dans la composition d'huile et de pommades comme liniment analgésique contre les rhumatismes et comme additif de bain pour une stimulation sanguine locale et leur effet vasodilatateur (**Anton et Wicht, 1999**

- **En médecine vétérinaire**, elle utilise largement les vertus du romarin que ce soit en usage externe (antiseptique, cicatrisant) ou interne (tonique, cholérique et cholagogue) (**Bezanger et al., 1990**).

## 1 .Objectif

Dans cette étude nous avons entrepris d'évaluer l'effet biocide d'un bioproduit à base d'huiles essentielles, extraite de *Rosmarinus officinalis L.* spontanée récolté au niveau de la région de tissemsilt. Pour trois saisons à différentes concentration sur les propriétés fongicides (*fusarium sp*), bactéricide (*Erwinia amylovora*) et larvicide. La mineuse de la tomate *Tuta absoluta*.

## 2 .Présentation de la région d'étude

### 2.1. Situation géographique

La présente étude a été menée dans la wilaya de tissemsilt qui se situe au centre du pays dans la région des hauts plateaux, à 220 km d'Alger et à 300 km d'Oran<sup>4</sup>. Elle est délimitée au nord, par la Wilaya de AïnDefla ;à l'ouest, par la wilaya de Relizane et la Wilaya de Chlefa ,à l'est, par la wilaya de Médéa et au sud, par la wilaya de Tiaretet la Wilaya de Djelfa.

Le territoire de la wilaya est constitué des zones montagneuses qui représentent 65 % de sa surface globale, le reste est occupé par les hauts plateaux et dans une moindre mesure les steppes.

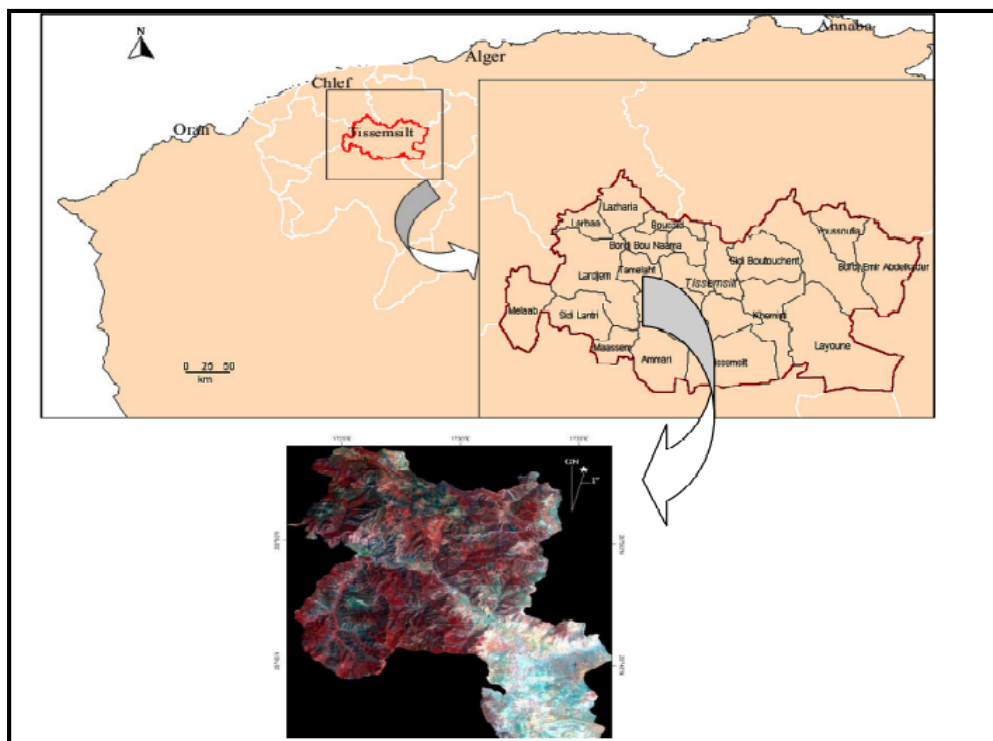


Figure 3 : Situation géographique de la zone d'étude.

## 2. 2. Couvert végétal

Le milieu floristique de la zone d'étude est constitué par des formations forestières variés, on trouve principalement le pin d'Alep (*Pinus halepensis*) qui est l'espèce la plus dominant avec 7185,5 ha. Sur les versants avec des conditions favorables de sol et d'humidité.

Dans les zones où les conditions sont moins favorables, la forêt est transformée en un maquis clair (5975,485 ha) composé d'une strate buissonnante et herbacée constituée de formations mixtes ou individualisées dont le romarin (*Rosmarinus officinalis*), l'armoise blanche (*Artemisia herba alba*) et le Diss (*Ampelodesma mauritanica*).

## 2.3. Caractéristiques climatiques

### 2.3. 1 .Températures

Les températures moyennes mensuelles sont, de novembre à avril, inférieures à la moyenne annuelle et sont supérieures à cette moyenne de mai à octobre, divisant ainsi l'année en deux saisons : l'une froide et l'autre chaude.

Au cours de la saison froide, on relève les moyennes les plus basses pendant les trois mois de décembre, janvier et février, avec un minimum en janvier. Au cours de la saison chaude, on relève les moyennes les plus élevées avec un maximum enregistré en juillet.

**Figure 4**

mois T°	01	02	03	04	05	06	07	08	09	10	11	12	Moyenne interannuelle
T.max	12.1	12.8	15.3	17.7	21	27.5	32.2	31.1	27.7	21.7	16.0	12.8	20.7
T.min	5.4	6	7.2	9.3	11.8	17.2	21.2	20.2	17.4	13	8.7	6.8	12
T.moy	8.3	9	10.8	13	15.9	22	26.3	25.1	21.7	16.7	11.9	9.2	15.8

**Figure 4 : Répartition mensuelle de la température dans la wilaya de Tissemsilt.**

**2.3.2. Précipitations**

La zone d'étude se caractérise principalement par un climat continental à hiver froid humide et à été chaud et sec. La moyenne pluviométrique calculée sur une période de 31 ans (1976 à 2006) est égale à 379,84 mm. Les valeurs de la pluviométrie pendant ces années ont oscillé



### 3. Lieux d'expérimentation

Au cours de notre travail expérimentale nous avons étudié différentes activités de la plante. Ces derniers ont eu lieu dans différents laboratoires qui sont présentés ci-dessous :

- L'extraction des huiles essentielles a été réalisée au sein du laboratoire de Physiologie, Phytopharmacie et (labo Sabrina) au niveau de département de Biotechnologie à l'université Saad Dahleb de Blida1.
- L'étude de l'effet biocide est réalisée au niveau du laboratoire de mycologie, bactériologie et entomologie de la Station Régionale de l'Institut National de la Protection des Végétaux (INPV) de Boufarik (Wilaya de Blida)

### 4. Matériel végétale

Le matériel végétal provient de la région de Tissemsilt, il est présenté par les feuilles de romarin spontané, *Rosmarinus officinalis* L. (figure 6)



**Figure 6** : les rameaux de romarin, *Rosmarinus officinalis* L. spontané de la région tissemsilt utilise dans l'expérimentation.

#### 4.1. Récolte du matériel végétal

Les parties aériennes de *Rosmarinus officinalis* L., des trois saisons automne, hiver et printemps, ont été collectées sur des arbustes d'apparence saine dans la date suivante : le 28/10/ 2016, le 7/03/ 2017 et le 13/04/2017.

#### 4.2. Traitement du matériel végétal

La matière végétale, cueillie, a été séchée à l'air libre, à l'ombre jusqu'à la stabilisation de son poids (7 jours). **Ayadi. S et al 2011.**

Elle a été étendue en une seule couche sur les paillasses et tournée de temps en temps afin d'éviter tout risque de fermentation qui pourrait altérer la qualité des huiles essentielles. (Figure7)

Une fois la plante est séchée, les feuilles ont été séparées de leurs rameaux et conservées dans des sacs, cependant elles sont destinées à l'extraction.



**Figure 7 .Séchage du Romarin (photo originale 2017)**

### 5. Matériel biologique

Afin d'évaluer l'activité biocide de *Rosmarinus officinalis* L., une bactérie un champignon et un insecte ont été utilisés.

#### 5.1. Souche bactérienne

La souche bactérienne utilisée est représentée par *Erwinia amylovora*, isolée à partir des fleurs, des pédoncules floraux et des rameaux de pommier infectés,

obtenues dans le cadre des analyses de proximité de la station régional de le protection végétale de Boufarik.

### 5.2. Souche fongique

Le matériel fongique utilisé dans notre étude est constitué d'isolat du genre *Fusarium* *sp.*, isolés à partir des plantules de céréales (blé dur) et des échantillons.

La réalisation de l'activité antifongique se faite au niveau de la station régionale de la protection végétaux de Boufarik.

### 5.3. Insecte

Le matériel biologique destiné à l'évaluation de l'effet biocide des traitements est limité à un ravageur primaire de la tomate dont la sensibilité aux insecticides de synthèse est très limitée; la mineuse de la tomate, *Tuta absoluta* (Figure 8 et 9 ). Elle est classée en Algérie parmi les organismes de quarantaine à cause des dégâts qu'elle occasionne en particulier à la tomate.



Figure 8 : culture de tomate sous serre attaqué par *Tuta absoluta*





**Figure 9 :*Tuta absoluta* stade larvaire.**

## **6. Extraction des huiles essentielles**

### **6.1. Méthode d'extraction**

L'extraction de l'huile essentielle de la partie aérienne de *Rosmarinus officinalis* a été réalisée par hydrodistillation (type Clevenger)(figure).C'est La méthode d'extraction la plus utilisée pour les huiles essentielles, car elle est très simple d'une part, d'autre part, parce que l'eau est un bon solvant qui capte les produits les plus subtiles et les plus fragiles élaborés par le végétal et sans altérer leur qualité et leur composition chimique en maîtrisant la température et la pression pendant le procédé **PONCE G.2003.**



**Figure 10 : Système d'hydrodistillation Clevenger (photo originale)**

## 6.2. Présentation du dispositif d'extraction

Le dispositif d'extraction comprend principalement :

- Un chauffe-ballon
- Un ballon de 2 litre
- Un Clevenger
- Un réfrigérant alimenté par un système de refroidissement
- Une ampoule à décanter pour récupérer l'hydrolat (eau+ huile essentielle).

## 6.3. Mode opératoire

Cette technique d'extraction se base sur le pouvoir que possède la vapeur d'eau à transporter les phases volatiles extraites du matériel végétal. L'opération consiste à

introduire 150 à 200 g de masse végétale de la plante , dans un ballon en verre de 2 litres, en y ajoutant une quantité suffisante d'eau (2/3) sans le remplir pour éviter les débordements de l'ébullition. L'appareil est porté à ébullition à l'aide d'une chauffe ballon. Les vapeurs chargées en huiles essentielles passent à travers le tube vertical puis dans le réfrigérant où aura lieu la condensation. Les gouttelettes ainsi produites s'accumulent dans une ampoule à décanter qui permettra la séparation de la phase aqueuse (Hydrolat) de celle organique (Huile), cette opération dure entre 3 à 4 heures à partir du début de l'ébullition.

L'eau et l'huile se séparent par différence de densité. L'huile récupérée est déshydratée par le sulfate de sodium ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ) et conservée dans des flacons stériles en verre à + 5°C.

## 7. Paramètres étudiés

### 7.1. Le rendement en huiles essentielles

Selon les normes d'AFNOR (2000), le Rendement en Huiles Essentielles ( $R_{HE}$ ) est défini comme le rapport entre la masse d'huile essentielle obtenue après l'extraction ( $M_H$ ) et la masse de la matière végétale utilisée ( $M_v$ ).

Le rendement est exprimé en pourcentage et donné par l'expression suivante :

$$R_{HE} (\%) = M_H / M_v$$

$M_H$  : La Masse d'Huile Essentielle en gramme.

$M_v$  : la masse de la matière végétale utilisée en gramme.

$R_{HE}$  : Rendement en Huiles Essentielles

### 7.2. Les caractéristiques organoleptiques

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

### 7.3. Etude de l'activité biocide

#### 7.3.1. Activité fongicide

##### 7.3.1.1- Isolats fongiques :

###### a) Milieu de culture

Le milieu de culture utilisé pour l'isolement des souches fongiques, est le milieu PDA (Potatos Dextros Agar). Ce dernier est un milieu très favorable pour le développement des Champignons notamment ceux du genre *Fusarium* pour sa richesse en éléments nutritifs particulièrement le glucose et l'amidon. **Devet P., Rouxel F., 1997.**

###### • Milieu PDA :

La composition du milieu est comme suit :

- 200 g de pomme de terre
- 20 g de Glucose
- 20 g de Gélose (Agar agar)
- 1000 ml d'eau distillée

Une fois le milieu est prêt, il est mis dans un autoclave pendant une durée de 20 à 30 Minutes à 120°C pour stériliser son contenu.

###### b) Technique d'isolements :

La technique consiste à rincer les échantillons représentés par les graines de Blé avec l'eau du robinet pour éliminer les débris des végétaux et du sol, ensuite les passer dans un bain d'hypochlorite de sodium (eau de javel) à 2°C pendant 4 minutes dans le but de l'élimination des souches saprophytes. Suite à cela, rincer les échantillons dans trois bains d'eau distillée stérile pendant 5 minutes chacun, ensuite les séchés sur papier wattman stérile.

Enfin, déposer les échantillons dans des boites de pétri contenant le milieu PDA a raison de cinq (05) graines ou fragments par boite ensuite fermées par para-filme. Les boites sont ensuite incubées dans l'étuve à une température de 25°C.

**c) Purification :**

La purification de ces champignons a été réalisée après repiquages consécutifs par transplantation des disques mycéliens dans des boîtes de Pétrie contenant le milieu PDA.

**7.3.1.2. Etude du pouvoir antifongique *in vitro* d'huile essentielle du romarin :**

Le pouvoir antifongique *in vitro* a été basé sur l'inhibition de la croissance mycélienne, de la sporulation et de la germination de champignon *Fusarium sp.*

**a. Inhibition de la croissance mycélienne :**

L'inhibition de la croissance mycélienne a été basée sur la méthode de contact direct, décrite par (Mishra A.K. & Dubey N.K., 1994). Ainsi, à l'aide de pipettes Pasteur stériles, un disque d'inoculum de 5 mm de diamètre de chaque isolat a été prélevé séparément puis déposé au centre des boîtes de pétri. L'incubation des boîtes ainsi préparées se fait dans l'étuve réglée à la température de 25°C pour évaluer la croissance mycélienne. Cette dernière a été estimée quotidiennement, pendant une durée d'incubation de 04 jours, en calculant la moyenne des deux diamètres mesurés sur deux axes perpendiculaires tracés au revers des boîtes de culture. Dans le protocole

Le taux d'inhibition de la croissance mycélienne a été déterminé pour isolat de *Fusarium sp.*, selon la formule décrite par Sy A.A., 1976 et Rollan M.C., Monaco C.I. & Nico A., 1999

$$I\% = \frac{(DT - DPA)}{DT} \times 100$$

IC : Taux d'inhibition de la croissance mycélienne en %.

DT : croissance mycélienne de l'agent phytopathogène témoin (mm).

DPA : croissance mycélienne de l'agent phytopathogène traité (mm).



**b. Inhibition de la sporulation et de la germination :**

Les taux d'inhibition de la sporulation ont été déterminés après une période d'incubation de 08 jours de croissance des isolats de *Fusarium* en confrontation directe. Ce qui consiste à verser 10 ml d'eau distillée stérile dans chaque boîte de culture d'isolat de *Fusarium* puis, racler cette dernière à l'aide d'une pipette pasteur stérile pour récupérer les suspensions des conidies dans des tubes à essai stérilisés. Ces derniers ont été soumis à l'agitation à l'aide d'un agitateur de tubes vortex. Les suspensions des conidies de chaque isolat phytopathogènes issues de la confrontation directe, ainsi que celles des isolats témoins ont fait l'objet de détermination de la concentration en conidies par le biais d'une cellule de Malassez sous microscope optique. Ainsi, les taux d'inhibition de la sporulation ont été déterminés pour chaque isolat de *Fusarium* selon la formule décrite par **Hibar K. et al 2005** et **Hmouni A. et al 1996**.

$$\text{IS (\%)} = \frac{(ST-St)}{ST} \times 100$$

IS : Taux d'inhibition de la sporulation en %.

ST : Concentration en sporanges de l'inoculum témoin (nombre des conidies /ml).

St : Concentration en sporanges de l'inoculum traité (nombre des conidies /ml).

D'autre part, la détermination des taux d'inhibition de la germination repose sur la préparation de suspensions des conidies de l'ordre de  $10^5$  conidies/ml pour chaque isolat de *Fusarium*.

La germination IG a été déterminée pour isolats de *Fusarium* à raison de trois répétitions, en utilisant la formule décrite par **Berber F. et al , 2009** :

$$\text{IG (\%)} = \frac{(NT-NPA)}{NT} \times 100$$

IG : Taux d'inhibition de la germination en %.

NT : Concentration en sporanges germés de l'inoculum témoin (nombre de spore germés/ml).

**NPA** : Concentration en sporanges germés de l'inoculum traité (nombre de spore germés/ml).

#### 7-4-1 Evaluation de l'activité antimicrobienne :

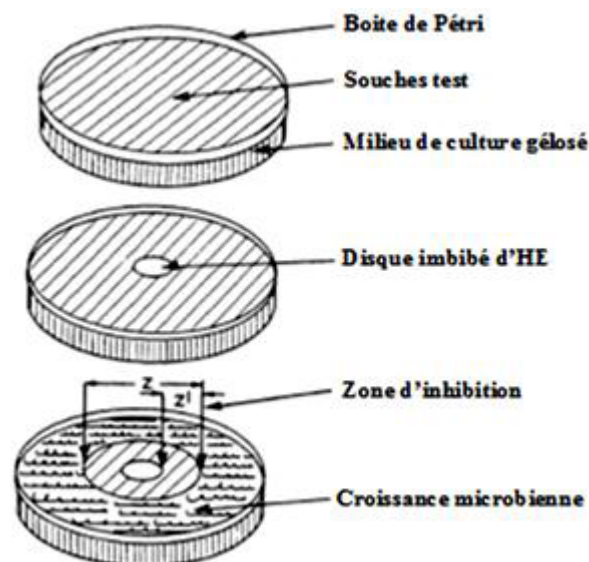
Pour évaluer l'activité antimicrobienne des huiles essentielles, nous avons adopté la méthode de diffusion sur milieu gélosé, appelée «aromatogramme»

##### a. L'aromatogramme :

C'est une technique microbiologique qui permet d'étudier comme un antibiogramme la sensibilité des germes à différentes huiles essentielles, c'est-à-dire, leur pouvoir antibactérien et antifongique (Salle., 1991).

##### b. Principe :

Le principe de la méthode repose sur la diffusion du composé antimicrobien en milieu solide dans une boîte de Pétri, après un certain temps de contact entre le produit et le microorganisme cible. L'effet du produit antimicrobien sur la cible est apprécié par la mesure d'une zone d'inhibition, et en fonction du diamètre d'inhibition (**Figure11**). La souche sera qualifiée de sensible, très sensible, extrêmement sensible ou résistante (**Benjeleli Etal., 1986**)



**Figure 11** : Illustration de la méthode des aromatoigrammes sur boîte de Pétri (Zaika, 1988).

### 7.4.2. Activité bactéricide

#### 7.4.2.1. Préparation des dilutions d'huile essentielle :

L'huile essentielle de *Rosmarinus Officinalis* L, n'est pas miscible à l'eau, elle flotte au-dessus du bouillon de culture et le contact avec les bactéries n'est pas bon. Pour remédier à cela, nous avons utilisé un émulsifiant : le Tween 80. Les huiles essentielles ont été diluées en série allant de C1 = 100%, C2 = 75%, C3 = 50% et C4 = 25% dans le tween 80, à 30%. **Ben Hamida N., et al 2001 et Ayadi S., et al 2005**

#### 7.4.2.2. Evaluation de l'activité antimicrobienne de l'HE de *Rosmarinus officinalis* :

##### a) Méthode de diffusion en milieu gélosé

Pour évaluer l'activité antimicrobienne des HE, nous avons adopté la méthode de diffusion sur milieu gélosé en utilisant des disques stériles en cellulose, cette méthode est appelée aromatoگرامme. Le principe de la méthode est tiré à partir du titrage des antibiotiques **Benjelali .b et al 1986,**

##### b) Principe

Le principe consiste à estimer l'inhibition de la croissance des microorganismes (bactéries et champignons), soumis au contact de l'huile essentielle et ceci par méthode de diffusion en milieu gélosé. Ce test est effectué par dépôt des disques en papier buvard stériles de 6mm imprégnés d'une quantité de 25 µl de l'huile essentielle sur un milieu gélosé préalablement ensemencé par étalement. **Chao.S.C, Young.D.G, Oberg.G.J, 2000**

##### c) Préparation des disques

Les disques sont préparés à partir du papier wattman N3 de 6 mm de diamètre, ensuite elles sont mises dans un tube à essai (hermétiquement fermé), stérilisés à l'autoclave 20 minutes à 120°C, puis stockés à une température ambiante

##### d) Préparation de l'inoculum:

A partir d'une jeune culture de 18 heures pour les bactéries, en prélevant 3 à 5 colonies bien isolées et identiques dans 1ml d'eau physiologique stérile, on agite au vortex pendant quelques secondes.

**e) Milieu de culture :**

Le milieu de culture utilisé lors de notre travail est le milieu levane semi sélectif d'*Erwinia amylovora*, King, E.O., Ward, M.K. & Raney, D.E. (1954)

**• Milieu levane :**

-Extrait de levure .....	2,0 g
-Bactopeptone (Difco) .....	5,0 g
-Saccharose .....	50,0
-Chlorure de sodium .....	5,0 g
-Agar bactériologique .....	20,0 g

Ajuster le pH à 7,2. Après autoclavage à une température  $> 121^{\circ}\text{C}$  pendant environ 20 minutes, le milieu est laissé à refroidir suffisamment pour pouvoir le couler en boîtes de Pétri.

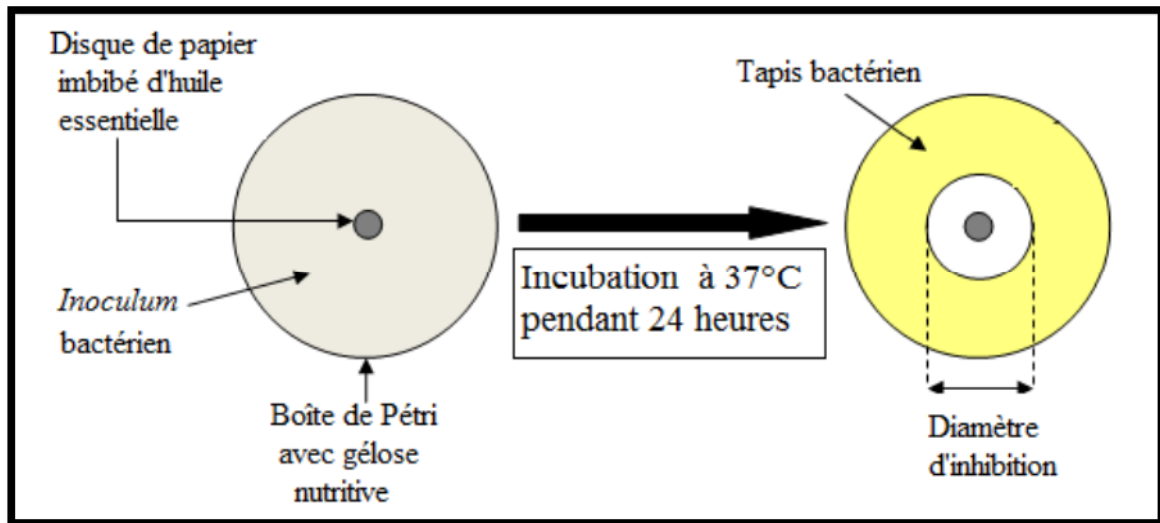
**f) Ensemencement et repiquage des boites de Pétri:**

On a pris 100  $\mu\text{l}$  de la suspension d'*E. amylovora* puis on étale par le rateau sur une boîte de Pétri stérile contenant le milieu levane. Repiquages de *Fusarium* sp par transplantation successive des disques mycéliens dans des boîtes de Pétri contenant le milieu PDA, à trois répétitions pour chaque concentration et pour chaque saison.

**g) dépôt de disques**

Les disques absorbants stériles de 6mm de diamètre sont imprégnés d'huile essentielle puis déposés à l'aide d'une pince stérile à raison de 3 disques par boîte de pétri (figure 11). Le témoin correspond aux disques imprégnés par le tween 80 à 30%.

Les trois disques/boîte correspondent à des répétitions. Les boîtes de Pétri sont ensuite fermées par parafilme et laissées diffuser à température ambiante pendant 30 minutes ensuite mises à l'étuve à température de  $27 - 28^{\circ}\text{C}$  pendant 24 à 48 heures pour les bactéries.



**Figure 12:** Principe de la méthode de diffusion par disque.

La lecture de l'activité antibactérienne se fait par la mesure du diamètre de la zone d'inhibition autour de chaque disque à l'aide d'un pied de coulisse ou une règle en (mm). Les résultats sont exprimés par le diamètre de la zone d'inhibition et peut être symbolisé par des signes d'après la sensibilité des souches vis à vis des huiles essentielles. **PONCE G.2003**,

Le diamètre des zones d'inhibition (ZI), nous permet d'estimer la résistance ou la sensibilité des différents germes testés vis-à-vis l'HE. Pour classer les germes nous avons utilisé les normes établies par **PONCE G.2003**,

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

Le résultat de cette activité est exprimé par le diamètre de la zone d'inhibition et peut être symbolisé par des croix (tableau 2).

**Tableau 1** : Les diamètres d'inhibition et leurs degrés de sensibilités **PONCEG.2003**.

Diamètre de la zone d'inhibition	Le degré de la résistance
D<6mm	Souche résistante (-).
6mm D 11mm	Souche sensible (+).
12mm D 16mm	Souche très sensible (++).
D 17 mm	Souche extrêmement sensible (+++).

### 7.5.1. Activité insecticide

#### 7.5.1.1. Prélèvements des échantillons

Les larves âgées du troisième et quatrième stade larvaire, les L3 et les L4 de la mineuse, ont été rassemblées à partir des feuilles de tomate infectées

Ces larves ont été mis dans des boites à pétri stériles, chaque boite contient 10 larves.

#### 7.5.1.2. Préparation et application des doses du bio-pesticide à base de l'huile de romarin

La préparation des différentes doses du traitement du bio-pesticide à été basée sur l'huile essentielle de *Rosmarinus Officinalis*L., et l'émulsifiant Tween 80 à 30%.

Les délutions ont été préparées en série allant de C1 = 100% pure (HE pure) , C2 = 75%, C3 = 50%, C4 = 25%, C5 =10%, C6 = 5%, C7 = 0,1% et C8 = 0,01%.

Les traitements ont été réalisés par micro pipette, en contact direct avec les larves.

L'opération est répétée deux fois pour chaque dose, pour les trois saisons, soit 60 essais au total (annexe 3).

**C- Estimation de mortalité de la mineuse**

Le pourcentage de la mortalité des larves a été calculée selon la formule de l'Abbott (*ABBOTT WS., 1925*).

**% de mortalité= (nombre de larves immobiles/nombre total de larves) ×100.**

**8- Analyses statistiques :**

L'analyse statistique (tableaux, histogrammes) des données traité par un logiciel Excel stat 2007 pour la détermination de la signification des résultats.

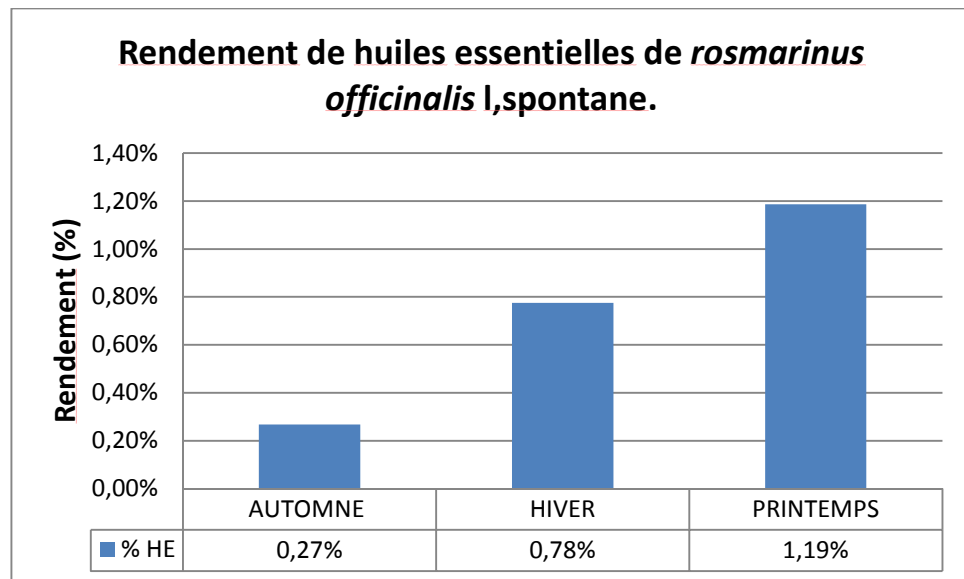
### 1. Détermination du rendement en huile essentielle

Les rendements en huile essentielle de *Rosmarinus officinalis* sont représentés dans le **Tableau 2** et par la **figure 13**.

**Tableau 2** : Rendement en huile essentielle de *Rosmarinus officinalis l.*, spontané des trois saisons : automne, hiver et printemps.

Espèce	Rendement(%)		
	Automne	Hiver	Printemps
<i>Rosmarinus officinalis l.</i> Spontané.			
	0.27%	0.78%	1,19%
Norme AFNOR	0.5 à 2		





**Figure 13** : Rendement en huiles essentielles de *Rosmarinus officinalis* l, spontané.

Les résultats obtenus montrent que les rendements en huile essentielle de la saison automnale est très faible par rapport aux normes d'AFNOR(2000) (0.27%).Alors que le rendement des deux saisons hiver et printemps sont comparable à ceux d'AFNOR avec respectivement 0.78% et 1.19%.

## 2. Résultats des analyses organoleptiques

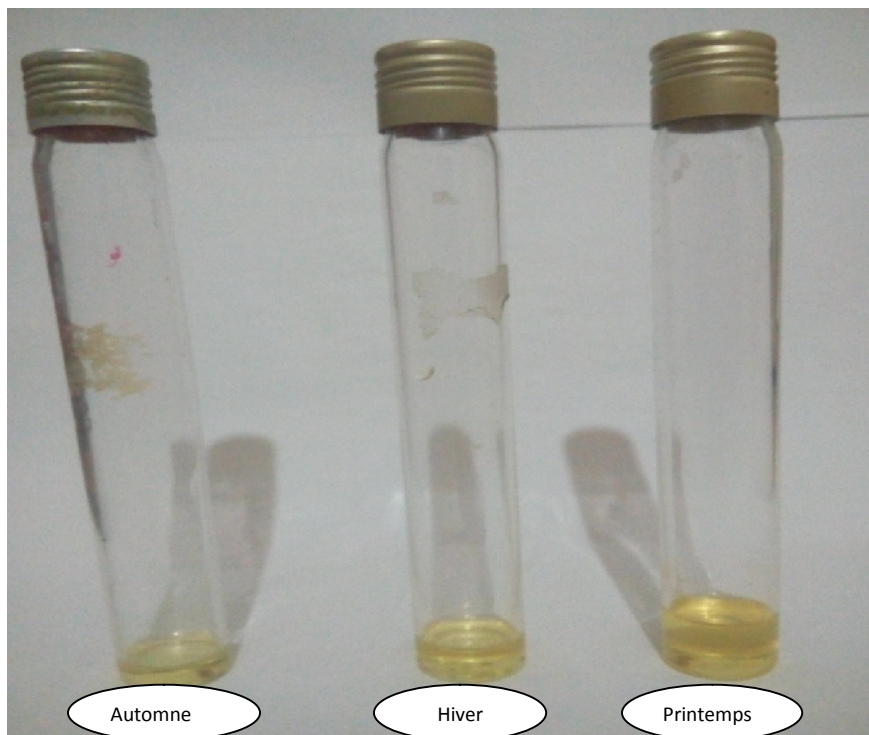
Les résultats des analyses des caractéristiques organoleptiques d'huile essentielle de *Rosmarinus officinalis* des trois saisons sont présentés dans le

**Tableau 3 :**

**Tableau 3** : Caractéristiques organoleptiques de l'huile essentielle de *Rosmarinus officinalis*.

Caractéristiques organoleptiques			
	Aspect	Couleur	Odeur
Huile essentielle de <i>Rosmarinus officinalis</i>	Liquide mobile	Jaune pâle	Odeur caractéristique de l'espèce
La norme (AFNOR 2000)	Liquide mobile, limpide	Incolore à jaune pâle ou jaune verdâtre	Caractéristique fraîche plus ou moins camphrée selon l'origine.

L'huile essentielle obtenue par hydrodistillation du matériel végétal de *Rosmarinus officinalis* des trois saisons, est de couleur jaune pâle, elle représente une odeur caractéristique de l'espèce. Les caractéristiques de nos huiles essentielles des trois saisons, sont comparables à ceux cités par **AFNOR 2000**.



**Figure 14** : Huile essentielle de *Rosmarinus officinalis l.spontane*. pour trois saisons, automne, hiver, printemps.

### 3. Evaluation de L'activité antimicrobienne de l'HE de *Rosmarinus officinalis*

Les résultats de l'activité anhibitrice de l'HE de *R. officinalis* sont présentés au

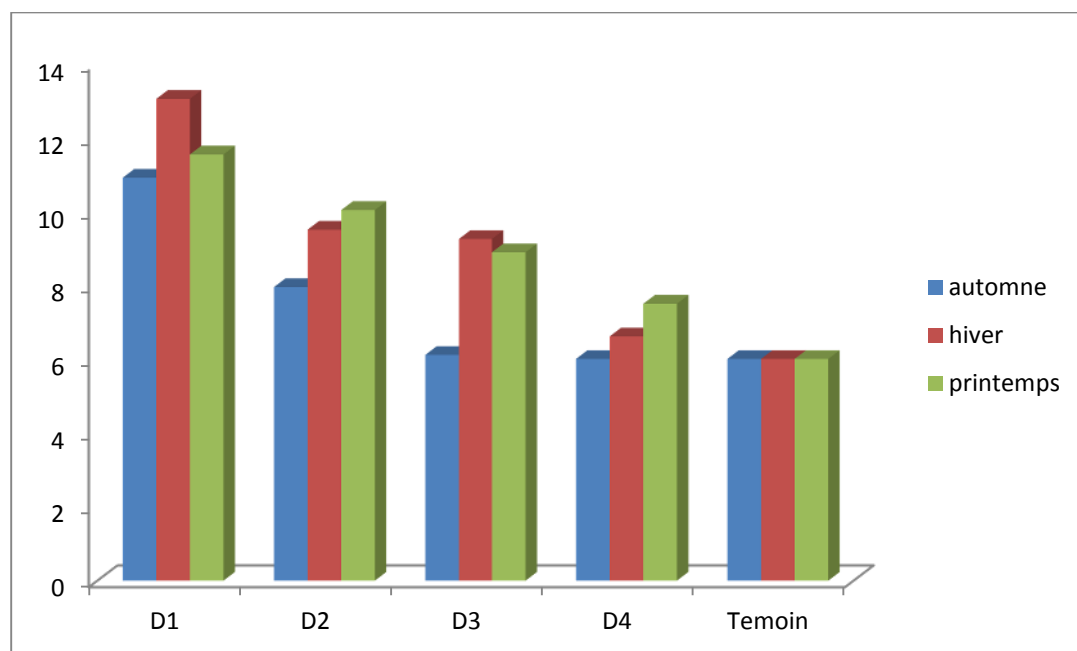
**Tableau 4.**

**Tableau 4:** Sensibilité des bactéries et champignons à l'huile essentielle de *Rosmarinus officinalis l,spontane.*

Les souches		C1	C2	C3	C4
Les concentrations		100%	75%	50%	25%
<b>Bactérie</b> <b>Erwinia amylovora</b>	<b>Huile d'Automne</b>	10,92(mm) (+)	7,97 (mm) (+)	6,1(mm) (+)	6 (mm) (-)
	<b>Huile d'Hiver</b>	13,05(mm) (++)	9,52 (mm) (+)	9,2(mm) (+)	6,61 (mm) (+)
	<b>Huile de printemps</b>	11,55(mm) (+)	10,05(mm) (+)	8,9(mm) (+)	7,52 (mm) (+)
<b>Champignon</b> <b>(fusarium sp)</b>	<b>Huile d'Automne</b>	6,17 (mm) (+)	9 (mm) (+)	12,(mm) (++)	6,05(mm) (+)
	<b>Huile d'Hiver</b>	13,88(mm) (++)	16,66(mm) (++)	10,(mm) (+)	12,5(mm) (++)
	<b>Huile de printemps</b>	9,66 (mm) (+)	13,33(mm) (++)	11 (mm) (+)	7,22 (mm) (+)

Non sensible (-), Sensible (+), Très sensible (+ +), Extrêmement sensible (+++)

### 3.1. Evaluation de l'activité antimicrobienne de l'huile essentielle de romarin vis-à-vis *Erwinia amylovora* .



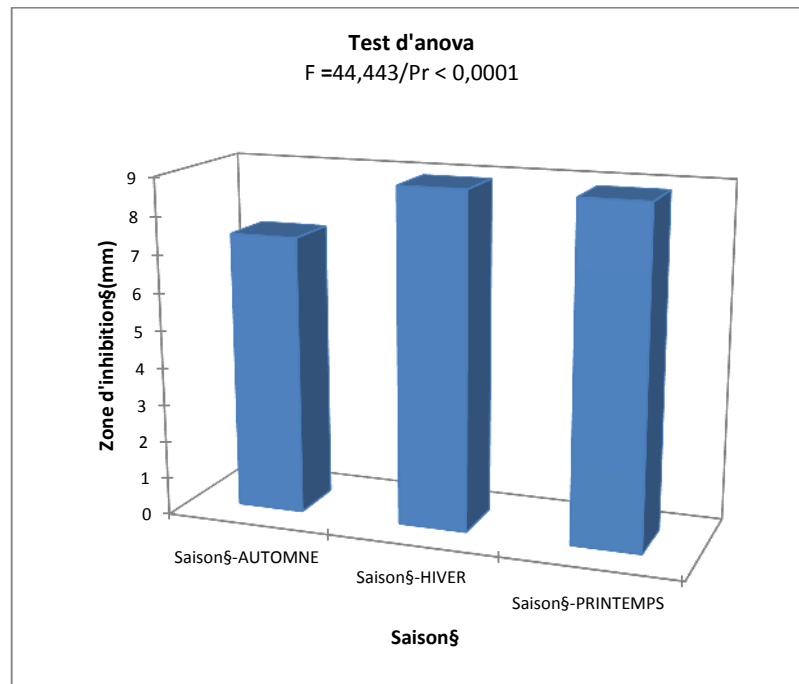
**Figure15:** Histogramme représentant les zone de d'inhibition des Bactérie (*Erwinia amylovova*) pour les trois saisons.

D'après la **figure15**, les résultats montrent que les zones d'inhibition les plus élevées sont obtenues à la concentration C1/ 100%, avec une importante activité enregistrée avec l'échantillon de l'hiver 13,05mm . Pour la concentration D2, l'activité inhibitrice la plus importante est enregistrée avec l'échantillon de printemps (10.05 mm) suivi par celui de l'hiver (9,52mm). Dans le cas de la dose D3 l'activité inhibitrice a diminué et cette fois ci l'échantillon de l'hiver a manifesté la plus

importante activité (9,27mm) suivi par celui de printemps (8,9mm). Enfin la dose D4 a présenté l'activité inhibitrice la plus faible pour les trois saisons automne, hiver et printemps, avec respectivement : 6mm, 6,61mm,7,52mm.

Nous constatons que l'augmentation des diamètres d'inhibition est proportionnelle avec l'augmentation des doses. Plus la dose est importante, plus le diamètre est important.

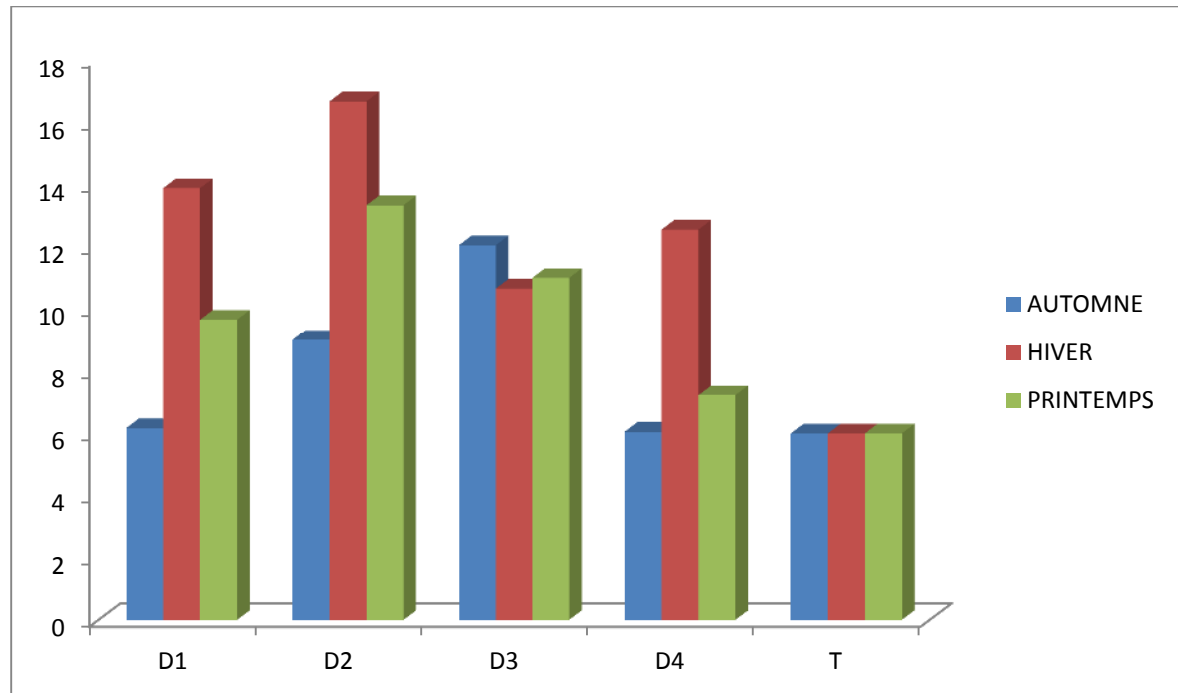
L'analyse statistique des données a révélé une différence hautement significative entre les diamètres des zones d'inhibition des trois huiles essentielles étudiées vis-à-vis *Erwinia amylovora*  $F= 44,443 /p>0.0001$



**Figure 16:** Histogramme de effet comparé par le test d'anova pour bactérie *Erwinia* pour trois huiles de romarin.

### 3-2 Evaluation de l'activité antimicrobienne de l'huile essentielle de romarin vis-à-vis *fusarium sp.*

Les résultats de l'activité antimicrobienne de l'huile essentielle de romarin des trois saisons sont représentés dans la figure ...



**Figure 17:** Histogramme représentant les zones inhibitions de Champignon *fusarium sp.*, pour trois saisons, automne, hiver et printemps.

D'après les résultats, nous avons remarqué que l'activité antifongique est variable selon les concentrations en des huiles essentielles et selon les saisons. La plus grande surface d'inhibition est observée en hiver avec la dose D2 : 75% soit 16,66mm. L'échantillon de l'hiver a présenté l'activité inhibitrice la plus importante pour toutes les doses testées sauf avec la dose D3 (50%) où l'activité la plus importante a été enregistrée avec l'HE d'automne avec :12,05mm. Ensuite, nous avons l'échantillon de printemps qui a enregistré une activité inhibitrice moins importante que celui de l'hiver. L'activité inhibitrice de l'échantillon d'automne est la plus faible.

D'après L'analyse statistique de la variance a révélé une différence significative entre les diamètres des zones d'inhibition des trois huile étudiés vis-à-vis *fusarium sp.*  $F= 4,964 / p > 0.001$  (figure ).

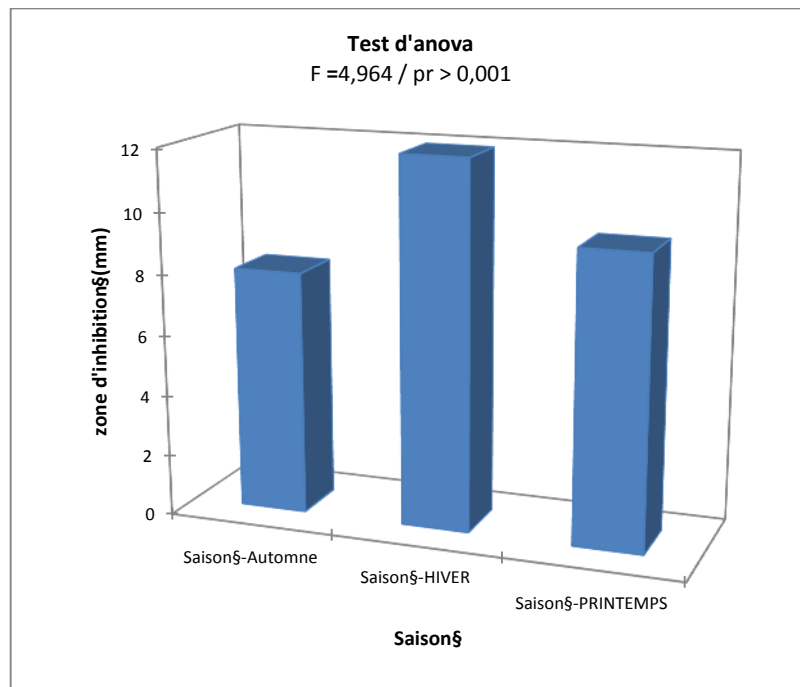


Figure 18 : Effet comparé par le test d’anova pour *Fusarium sp.*

3.2.1. Evaluation la croissance mycélienne de *fusarium sp* vis-à-vis les trois huiles essentielles de romarin.

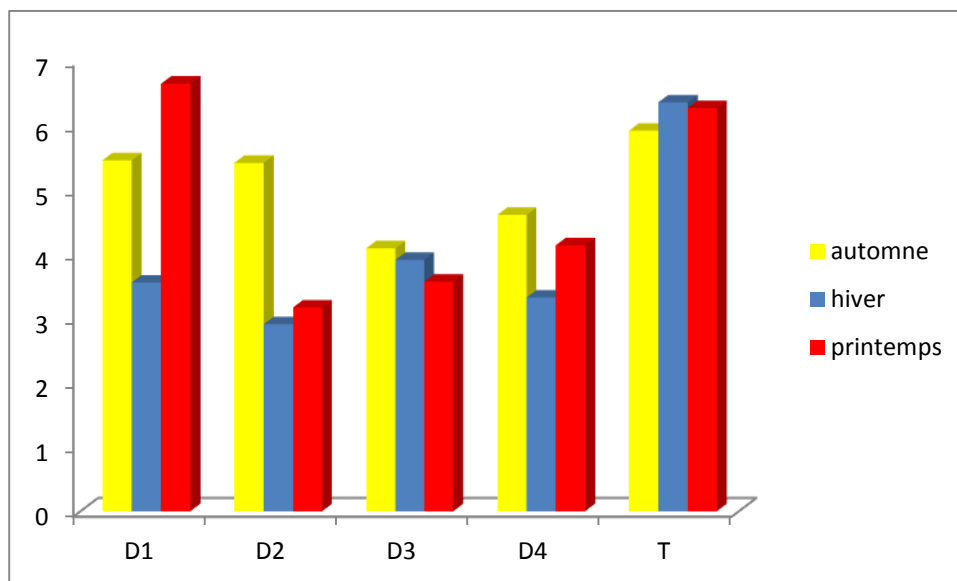
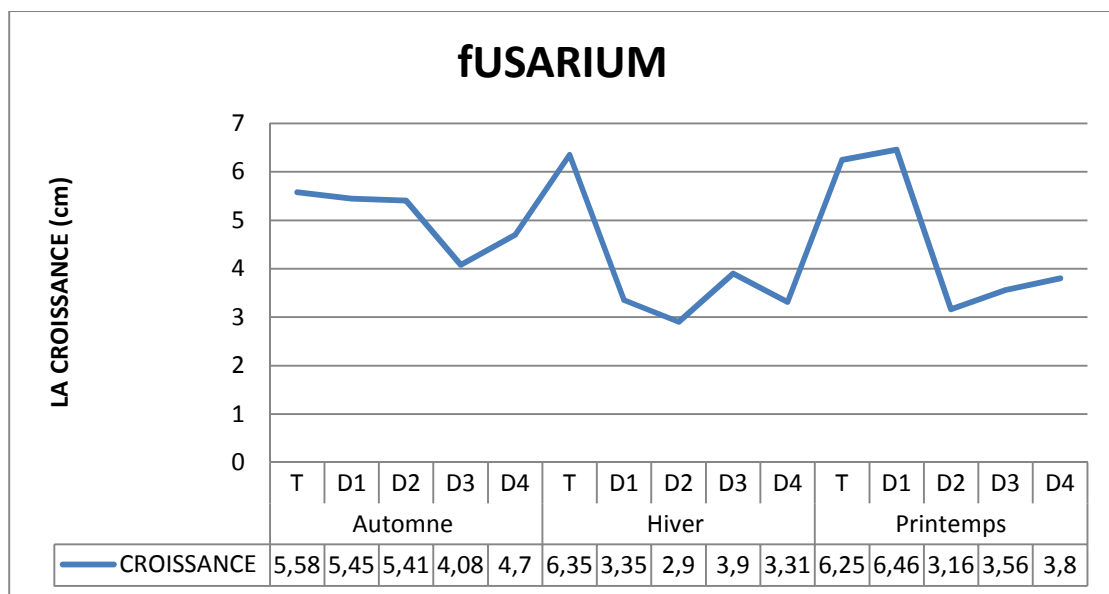


Figure19 :Effet de trois huiles essentielles de *romarin* sur la croissance mycélienne des souches de *Fusarium sp.*

D'après les résultats, nous avons remarqué que la croissance mycéliums variable selon les concentrations en huiles essentielles et selon les saisons. Le plus grand diamètre est observée en printemps avec la dose D1: 100% soit 6,4cm. L'échantillon d'automne a présenté la croissance mycéliums la plus importante pour toutes les doses testées sauf avec la dose D1 (100%) où la croissance mycéliums la plus importante a été enregistrée avec l'HE d'automne avec : 5,4cm (D2). En suite, nous avons l'échantillon de printemps qui a enregistré un croissance mycéliums la plus faible.

Elle révèle que la croissance mycélienne augmente avec la diminution de la dose d'huile de romarin. Pour le *Fusarium sp*,

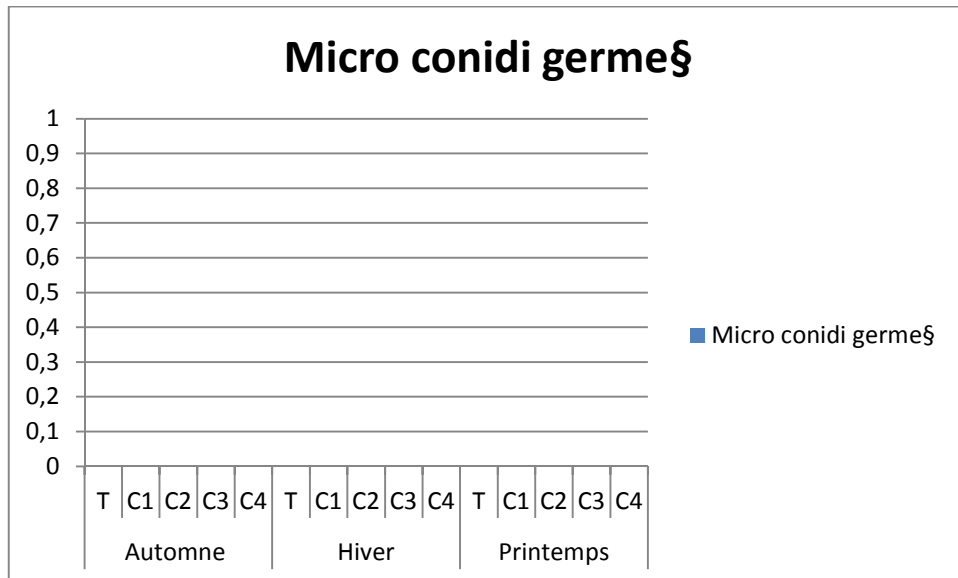


**Figure 20** :Effet de trois huiles essentielles de *romarin* sur la croissance mycélienne des souches de *Fusarium sp*.

### 3.2.2. Evaluation de la germination de *Fusarium sp* vis-à-vis les trois HE de romarin



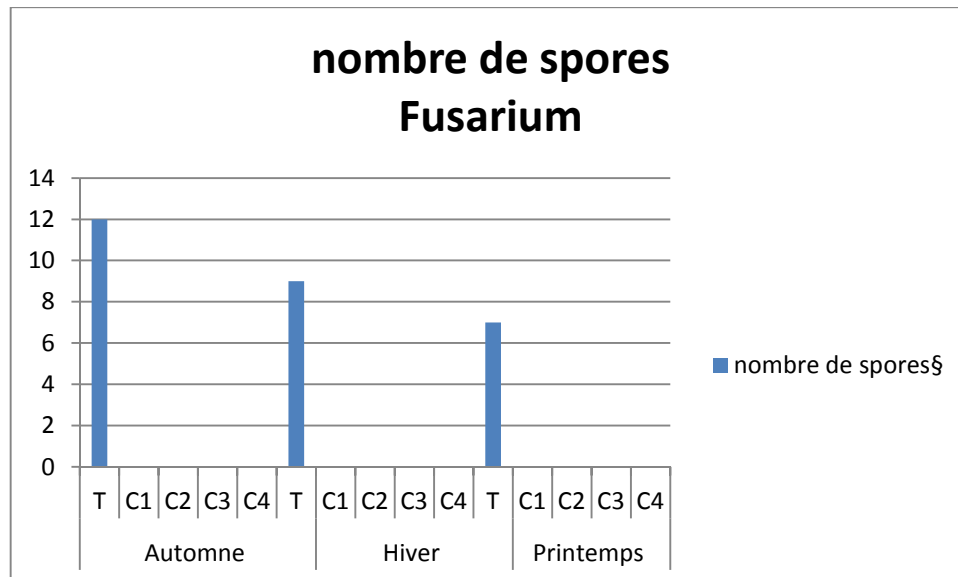
Après l'observation microscopique, nous avons remarqué qu'aucune microconidi n'a été germée.



**Figure 21** : Effet de trois huiles essentielles de romarin sur la germination de champignon *fusarium sp.*

### 3.2.3. Evaluation de la sporulation de *Fusarium* sp vis-à-vis les trois HE de romarin

Après l'observation microscopique, nous n'avons remarqué aucune sporulation.

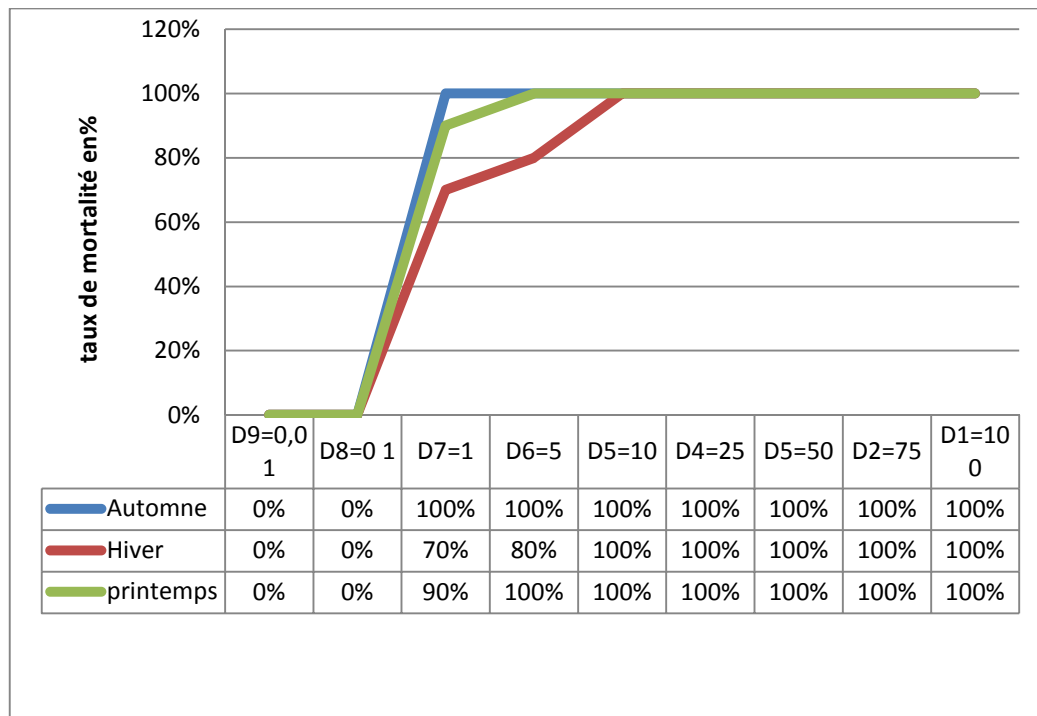


**Figure 22:** Effet de trois huiles essentielles de romarin sur la sporulation de champignon *fusarium sp.*

## 4. Evolution de l'effet biocide des huiles essentielles de romarin sur l'abondance larvaire de la mineuse de tomate (*tuta absoluta*)

### Estimation de mortalité de la mineuse

L'activité insecticide de de l'HE de romarin des trois saisons vis-à-vis lamineuse de la tomate, a été évaluée par l'estimation de taux de mortalité des larves. (Figure )



**Figure 23** : Effet biocide des différentes huiles de romarin.

L'analyse de la variance a révélé une différence significative pour les deux facteurs étudiés, la saison ( $F= 8,556 /p>0.000$ ) et la dose ( $F= 26,429 /p>0.000$ ). (Annexe 6).

D'après les résultats graphiques reportés sur la figure (01), aucune efficacité n'a été marquée par les doses D9 et D8 des huiles de romarin récolté en différentes périodes vis-à-vis les larves de *tuta absoluta*.

Cependant, les doses D7 et D6 ont montré une activité biocide pour les différentes huiles étudiées, la plus importante a été marquée par l'huile de romarin récolté en automne (mortalité de la totalité des larves), et la plus faible a été présentée par l'huile de romarin récolté en hiver (70% et 80 % respectivement).

En outre, les doses D5, D4, D3, D2 et D1 des trois huiles étudiées ont présenté un taux de mortalité maximal (100%)

**Discussion :****1. Effet de l'huile essentielle de *R. officinalis* sur *Erwinia amylovora* :**

La méthode de diffusion des disques nous a permis de mettre en évidence le pouvoir antibactérien d'huile essentielle du *R. officinalis* vis-à-vis la bactérie testée.

Nos résultats sur l'activité antibactérienne de l'HE du romarin concordent avec ceux obtenus par **Lopez P et al 2005**. Dans cette étude, les auteurs ont testé l'huile du romarin provenant de plusieurs régions de l'Est Algérien : Kherrata (Bedjaia), Boutaleb (Sétif), Bibans (Bourdj Bou-Arridj), Agmeroual et N'gaous (Batna), et Boussaâda (M'sila), où les diamètres des zones d'inhibition n'ont pas dépassé les 20 mm. Ces résultats sont comparables à ceux obtenus dans cette étude

**Djeddi et al., 2007**, ont signalé la forte activité antibactérienne de l'HE du *R. officinalis* issu du Park national d'El Hamma (Alger).

La sensibilité d'*E. amylovora* à l'huile essentielle de *R. officinalis* observée dans notre étude a été également constatée par **Ammam S, 2014**. Nos résultats sont très loin à ceux indiqués par ce dernier et qui ont trouvés que l'HE de *R. tournefortii* exerce une forte activité sur *Erwinia amylovora*.

D'après plusieurs travaux, les bactéries à Gram- sont censées d'être plus résistantes que les Gram+, ceci est dû aux différences structurales de leurs membranes externes **Inouye S et al 2001, Lopez P et al 2005, Bozin Bet al 2006**. Chez les bactéries Gram -, la membrane externe constitue une barrière de perméabilité efficace ; riche en lipopolysaccharides dont les charges négatives de surface empêchent la diffusion des molécules hydrophobes **Nikaido H., 2003**, toutefois, quelques composés phénoliques de faible poids moléculaire peuvent adhérer à ces bactéries par fixation aux protéines et aux lipopolysaccharides membranaires à l'aide de leurs groupes fonctionnels et se faufiler jusqu'à la membrane intérieure plus vulnérable **Dorman HJD. and Deans SG., 2000**.

Plusieurs travaux ont mis en évidence l'existence de multiples composés bioactifs dans l'huile essentielle de *R. officinalis* et qui influent à leur tour l'activité antimicrobienne. Cette activité est attribuée à la présence de bornéol, l-Verbenone,  $\beta$ -

linalol, camphor et à d'autres composés phénoliques. **Santoyo S et al 2006**. D'autres travaux, attribuent l'activité antibactérienne du romarin au 1,8 cinéole **Miladi H,et al 2013**,Qui est l'un des composants minoritaires dans notre plante.

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

Ainsi, les effets antimicrobiens des HE ont été expliqués principalement par la présence des terpènes, les hydroxyles des groupements phénoliques sont capables de se liés aux sites actifs des enzymes cibles par des liaisons d'hydrogène. Les alcools terpéniques sont connus par leur fort pouvoir antibactérien, dû à leur solubilité sans l'eau, ce qui leur confère un haut habilité à pénétrer les parois des cellules bactériennes **Ammam S . 2014**.

La variabilité des résultats est due à l'influence de plusieurs facteurs tels que la méthodologie, les micro-organismes testés et les huiles essentielles utilisées.

Le *R. officinalis*, a montré un large spectre d'action d'après plusieurs auteurs **Erdogrul OT, et al 2002, Gachkar L, et al 2007, Jiang Y, et al 2011, Khosravi AR., 2013**. D'autres travaux ont cependant signalé une activité modérée comme ceux **Celiktas OY, et al 2007**. Ou encore ceux de Sardaigne , **Lopez P, et al 2005, Celiktas OY, et al 2004**, Qui ont travaillé respectivement sur l'espèce provenant de Turquie et de Sardaigne.

## **2- Effet d'huile essentiel de *R. officinalis* sur *Fusarium sp* .**

Les résultats de l'activité antifongique « *in vitro* » d'HE de *R.officinalis* obtenus par la méthode de diffusion sur gélose montrant que l'activité antifongique de l'HE de *R. officinalis* est en fonction du champignon cible et de la saison.

L'huile essentielle de romarin a exercé une importante activité inhibitrice vis-à-vis le champignon (*Fusarium sp*), ainsi que sur la croissance de mycélium.

L'étude réalisée par **KOLAI N, et al 2012**, sur l'effet inhibiteur d'huile essentielle d'*Artimesia herba alba* sur deux souches de *Fusarium oxysporum et F.sppar*, a montré que l'activité antifongique est due uniquement aux substances renfermées dans les extraits de l'huile essentiel d'*Artimesia herba alba*.

La difficulté de développer une molécule antifongique est liée, d'une part à l'ultrastructure de la cellule fongique qui présente trois barrières : la paroi cellulaire chitineuse, les ergostérols membranaires et le noyau eucaryote **Chami, 2005**. et d'autre part, les molécules antifongiques elles-mêmes qui peuvent engendrer des résistances **Prasad et Kapoor, 2004**.

L'activité antifongique d'huile essentielle, peut être expliquée par l'effet synergique entre les différents composés d'huile essentielle. En effet, les composés majoritaires sont souvent responsables de l'activité antifongique de cette huile essentielle **Giordani R et al 2008**.

Ils ont supposé que la nature lipophile d'huile essentielle les rend plus observables par les mycéliums fongiques que par la gélose de nature hydrophile **Soylu E.M et al 2005**.

Le mécanisme d'action des composés phénoliques d'huile essentielle sur les champignons est fondé principalement sur l'inhibition des enzymes fongiques contenant le groupement SH dans leur site actif **Celimene C.C et al, 1999**.

Les concentrations d'huile essentielle du *R. officinalis* L appliquées ont empêché, partiellement (100%,75%,50%,25%), la croissance des souches, ce résultat est comparable à celle de **Uribes., et al. 1985**, qui ont énoncé que les fortes concentrations en huile essentielle de certains Citrus provoquent des dommages membranaires sévères et une perte d'homéostasie d'où la mort cellulaire ou l'inhibition totale.

Les modifications morphologiques telles que le diamètre et la couleur de mycélium, qui ont été observés sur différents concentrations étaient confirmées par les travaux de **DeBillerbeck V.G et al 2002**. Sur le mycélium d'*A Niger* sous l'effet des vapeurs d'huile essentielle de *Cymhopogonnordus*. La perte ou le changement de la couleur peut être corrélé avec la perte de la production de mycotoxines.

Les mécanismes d'action des huiles essentielles par lesquels la croissance mycélienne peut être réduite ou totalement inhibée ont été proposés. Ainsi, **Lucini E. et al 2006; El Badawy M. et al 2014.** Ont indiqué que les huiles essentielles agiraient sur l'hyphe du mycélium, ce qui provoque la sortie des composants du cytoplasme, la perte de la rigidité et l'affaiblissement de l'intégrité de la paroi cellulaire de l'hyphe, entraînant son effondrement et la mort du mycélium.

### **3. Effet d'huile essentiel de *R. officinalis* sur la mineuse *Tuta absoluta* de la tomate.**

L'évaluation des propriétés insecticides des huiles essentielles sur le ravageur de la tomate *T.absoluta*, à travers des essais biologiques *in vitro* vise la recherche d'une alternative de lutte respectueuse de l'environnement, à même de constituer une composante dans l'approche d'une lutte intégrée.

Les résultats du test *in vitro*, ont présenté un taux de mortalité élevé par les huiles de romarin récolté en périodes différentes vis-à-vis les larves de *tuta absoluta*. Il ressort de ces résultats qu'il serait préconisé dans le cas de l'utilisation des huiles essentielles de *R. officinalis* dans la lutte contre la mineuse de la tomate, car elles s'avèrent efficace, présentant un effet de biocide important, et qui varie selon les doses appliqués.

Cette efficacité des huiles essentielles semble être due a l'application liquide dont la cible la plus exposée est la cuticule des ravageurs, sur laquelle le produit en s'étalant et s'oxydant au contact de l'air finit par former une pellicule qui peut obturer en même temps les orifices respiratoires, perturber, voir même inhiber les échanges respiratoires, comme elle peut occasionner la destruction structurale et biochimique de la cuticule par déshydratation, comme le précise **Regnault et al., (2002)** en montrant que toutes les huiles essentielles ont des propriétés insecticides de différentes formes, aussi bien une toxicité par contact qui provient de la formation d'un film imperméable isolant l'insecte de l'air et provoquant son asphyxie qu'une toxicité par inhalation par leur richesse en composés volatils.

## Conclusion

---

Après l'extraction, l'huile essentielle obtenue est de couleur jaune clair avec une odeur forte Camphrée et un aspect liquide mobil. Le rendement en huile essentielle obtenu est de l'ordre de 0,27% pour l'automne, 0,78% pour l'hiver et 1,19% pour le printemps.

L'Etude du pouvoir antimicrobien *in vitro* de l'huile essentielle de *Rosmarinus officinalis* L. sur les souches testées, a montré que les zones d'inhibition varient selon les doses et les saisons.

Pour le Fusarium de blé, un diamètre de 16,66mm pour la dose D2 est enregistré en hiver alors qu'avec la même dose nous avons enregistré des diamètres de 13.33mm en printemps et 9mm en automne. Pour l'échantillon de l'hiver et qui a présenté l'activité inhibitrice la plus importante, les diamètres d'inhibition des 4 doses D1, D2, D3, D4 se diffèrent avec respectivement : 13.88mm, 16.66mm, 10mm et 12.5mm.

Les tests antifongiques des huiles essentielles ont montré qu'il ya une absence de tout sorte de sporulations et germination L'échantillon de l'huile essentielle de printemps avec la dose D1, a présenté l'activité inhibitrice du développement de mycélium, la plus importante.

Concernant la bactérie *Erwinia amylovora* , l'échantillon de l'hiver a enregistré la zone inhibition la plus élevée avec la dose D1 soit : 13,05mm. Cette activité a diminué pour le reste des doses testées. L'activité inhibitrice la plus élevée est obtenue ave la dose D1 pour les huiles essentielles des trois saisons étudiés automne, hivers et printemps avec respectivement : 10.92mm, 13.05mm et 11.55mm.

Les résultats de l'activité insecticide ont montré qu'aucune efficacité n'a été marqué par les doses D9 et D8 des huiles de romarin récolté en différentes périodes vis-à-vis les larves de *tuta absoluta*. Les doses D7 et D6 ont montré une activité biocide pour les différentes huiles étudiées, la plus importante a été marquée par l'huile de romarin récolté en automne avec une mortalité de la totalité des larves, et la plus faible a été présentée par l'huile de romarin récolté

De ce fait, nous pouvons dire que les variations climatiques saisonnières influent le rendement et le pouvoir biocide des huiles essentielles.



## Conclusion

---

L'ensemble de ces résultats obtenus ne constitue qu'une première étape dans la recherche de substances d'origine naturelle biologiquement actives.

Les résultats sont intéressants sur le plan agronomique et reflètent la sensibilité des microorganismes et insectes vis-à-vis les huiles essentielles de la plante étudiée.

Des études ultérieures plus approfondies doivent être effectuées afin de cerner l'activité biocide des huiles essentielles, il serait intéressant de :

- Mener une étude détaillée sur la composition qualitative et quantitative de ces huiles par le couplage de la CPG/SM car l'identification de la composition exacte d'une huile essentielle constitue la première étape dans la quête de la compréhension du fonctionnement de ces molécules
- Tester l'HE sur d'autres microorganismes et insectes afin de confirmer son efficacité à différentes concentrations de dilution.
- Etudier l'activité anti-oxydante et les aptitudes technologiques de cette HE.
- Et enfin l'application de ses résultats dans le domaine agro-alimentaire et agronomique.

## Références bibliographiques

---

### Références bibliographiques

- **Alzouma I., 1990.** Les problèmes de la post-récolte en Afrique Sahélienne, *In* : Foua-Bi K, Philogène B. (éds). *La post-récolte en Afrique. Actes du Séminaire International de la 1<sup>er</sup> post-récolte en Afrique*, Abidjan, Côte-d'Ivoire, 29 janv. -fév. 1990). Montmagny: Aupelf-Uref, Pp.22-7.
- **Afnor, 2000.** association française de normalisation, les huiles essentielles monographique relatives x, T.2, volume 2. Tour Europe. Pris. 663P.
- **Angioni A., Barra A., Cereti E., Barile D., Coisson DJ., Arlorio M., 2004.** Chemical composition, plant genetic differences, antimicrobial and antifungal activity.
- **Angioni A., Barra A., Cereti E., Barile D., Coisson DJ., et Arlorio M., 2004.** Chemical composition, plant genetic differences, antimicrobial and antifungal activity investigation of the essential oil of *Rosmarinus officinalis* L. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **52(11)**: Pp.3530–3535.
- **Anonyme., 2015.** (<http://www.condense.aroma.fr>).
- **Anton R., Wichtl M., 1999.** Plantes thérapeutiques (tradition, pratique officinale, science et thérapeutique), 3<sup>ème</sup> édition allemande sous la direction de MAX WICHTL, MARBURG, édition française par ROBERT ANTON, Strasbourg avec la collaboration de MARTINE BERNARD.
- **Athamena.S., 2009.** Etude quantitative des flavonoïdes des graines de *cuminumcyminum* et les feuilles de *rosmarinusofficinalis* et l'évaluation de l'activité biologique.

## Références bibliographiques

---

- **Ayadi S., D. Ben Salah, A. Hedhili, M. Abderrabba, *Biosc. Biotech. Res. Asia*, 2005**, EXTRACTION ET ETUDE DES HUILES ESSENTIELLES DE *RosmarinusOfficinalis cueillie* DANS TROIS REGIONS DIFFERENTES DE LA TUNISIE3(1), 461P.
- **Ben Hamida N., M.M. Abdelkafi, R. Ben Aissa, M. Chaabouni, *J. Essent. Oil. Res*, 2001**, EXTRACTION ET ETUDE DES HUILES ESSENTIELLES DE *RosmarinusOfficinalis cueillie* DANS TROIS REGIONS DIFFERENTES DE LA TUNISIE13, 295P. **Ben Hamida N., M.M. Abdelkafi, R. Ben Aissa, M. Chaabouni, *J. Essent. Oil. Res*, 2001**, EXTRACTION ET ETUDE DES HUILES ESSENTIELLES DE *RosmarinusOfficinalis cueillie* DANS TROIS REGIONS DIFFERENTES DE LA TUNISIE13, 295P.
- **Benjelali .B, Tantaoui .E.A Et EsmailAlaoui.M, 1986**, Méthodes d'étude des propriétés antiseptiques des huiles essentielles par contact direct en milieu gélosé, *Plante médicinales et phytothérapie*, 20, Pp. 155, 167.
- **Berber F., Ouazzani T, ouhami M., Badoc A. & Douira A., 2009** : Antagonisme *in vivo* de deux *Trichoderma* à l'égard de quatre espèces de *Bipolaris* pathogènes sur le sorgho. *Bull. Soc. Pharm. Bordeaux*, 148: Pp. 93-114.
- **BezangerBeauquesne L., Pinkas M., Torck M., Trotin F.,1990**. *Plantes médicinales des régions tempérées*. 2ème édition Maloine. Paris.
- **Bousbia n.,2004**. Extraction et identification de quelques huiles essentielles (nigelle, coriandre, origan, thym, romarin), étude de leurs activités antibactériennes. Thèse de Magistère. Option Sciences Alimentaires, INA. Algérie.
- **Bozin B., Mimica-Dukic N., Simin N., Anackov G., 2006**. Characterization of the volatile composition of essential oil of some lamiaceae species and the antimicrobial and antioxidant activities of the entire oils. *J. Agric. Food Chem.* **54**: Pp.1822-1828.

## Références bibliographiques

---

- **Bruneton J.,1999.** Pharmacognosie : Phytochimie ; Plantes médicinales, 3<sup>ème</sup> éd. Lavoisier Paris : Technique et Documentation et Editions médicales internationales, 1120P.
- **Brunetonj., 1993 :** Pharmacognosie, Plantes médicinales 2<sup>ème</sup> éd. Paris, 464P.
- **Caellet S. & Lacroix M.,2007.** Les huiles essentielles: leurs propriétés antimicrobiennes et leurs applications potentielles en alimentaire. Laboratoire de Recherche en Sciences Appliquées à l'Alimentation (RESALA) de l'INRS - Institut Armand - Frappier, Université de Laval (Québec).
- **Celiktas OY, Kocabas EEH, Bedir E, Sukan FV, Ozek T, Baser KHC., 2007.**Antimicrobial activities of methanol extracts and essential oils of *Rosmarinusofficinalis*, depending on location and seasonal variations. *Food Chemistry*. **100**:Pp.553–559.
- **Celiktas OY, Kocabas EEH, Bedir E, Sukan FV, Ozek T, Baser KHC., 2007.**Antimicrobial activities of methanol extracts and essential oils of *Rosmarinus officinalis*, depending on location and seasonal variations. *Food Chemistry*. **100**: Pp.553–559.
- **Celimene C.C., Micales J.A., Ferge L. And Young R.A., 1999.** Efficacy of pinosylvins against white rot and brown rots fungi. *Holzforschung*, 53: Pp. 491- 497.
- **Chami ., 2005** - Evaluation in vitro de l'action antifongique des huiles essentielles d'origan et de girofle et de leurs composes majoritaires in vivo application dans la prophylaxie et le traitement de la Candidose Vaginale sur des modèles de rat et de souris immunodéprimés. Thèse de doctorat, Université Sidi Mohamed Ben Abdellah. Fès, Maroc. 266P.

## Références bibliographiques

---

- **Chao.S.C, Young.D.G, Oberg.G.J, 2000**, screening for inhibitory activity of essential oils on selected bacteria , fungi and virus .J.Essent oil Res , vol 12(sep/oct 2000) Pp.639-649.
- **De Billerbeck V.G., Roques C., Vaniere P. & Marquer P.,2002**. Activité antibactérienne et antifongique de produits à base d'huile essentielle. Hygiène (Revue officielle de la société française d'hygiène hospitalière). 10. Pp.248-251.
- **DebaF, Xuan TD, Yasuda M, Tawatu S.,2008**.Chemical composition and antioxidant, antibacterial and antifungalactivities of the essential oilsfrom *Bidenspilosa*. Linn VarRadiata Food contrl. ;19: Pp. 346–352.
- **Delaquis, 2002**.Microbial dynamics an dinteractions in the spermosphere .Ann. Rev .Phytopathol ., 42,Pp. 271-309.
- **Demange et Serrano., 2007**. Guide grand public pour aider au choix des produits cosmétiques : les différences entre la cosmétique conventionnelle et la bio, les composants, les substances interdites ou autorisées en bio, l'efficacité et les limites de certains produits.49P.
- **Devet P., Rouxel F. ,1997-** Détection et isolement des champignons du sol, Paris. cedex07, 147 P.
- **Djeddi S., Bouchenah N., Settar I., Skaltsa HD., 2007**. Composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Rosmarinusofficinalis*from Algeria. *Chem. Natural Comp.***43(4)**:Pp.487-490.
- **Djenane D., Sanchez-Escalante A., Beltràn J.A. &Roncalés P .,2002**.Ability of a-tocopherol, taurine and rosemary, in combination with vitamin C, to increase the oxidative stability of beef steaks packaged in modified atmosphere. *Food Chemisfry*, 76, Pp.407-415.

## Références bibliographiques

---

- **Dorantes L., Colmenro R., Hernandez H., Mota L., Jaramillo M.E., Fernandez E. & Solano C., 2000.** Inhibition of growth of some foodborne pathogenic bacteria by *Capsicum annum* extracts. *International Journal Food Microbiology*, **57**, Pp.125-128.
- **Dorman HJD. and Deans SG., 2000.** Antimicrobial agents from plants : antibacterial activity of plant volatile oils. *Journal of Applied Microbiology*. **88(3)**: Pp.308-316.
- **Eckert C. A., Knutson B. L.** Fluid Phase Equil. 1993, 83, 93. Kim, S.; Johnston, K. P. In Supercritical Fluids. Chemical and Engineering Principles and Applications; T. G. Squires and M. E. Paulaitis, Ed.; American Chemical Society: Washington, DC, 1986; Pp. 42.
- **El Badawy M. E. I. and Abdelgaleil S. A. M., 2014:** Composition and antimicrobial activity of essential oils isolated from Egyptian plants against plant pathogenic bacteria and fungi. *Industrial crops and products*; **52**: Pp.776 – 782.
- **EL Haib A., 2011.** Valorisation de terpènes naturels issus de plantes marocaines par transformations catalytiques ; [Mémoire Doctorat] Université Toulouse III –Paul Sabatier.
- **Emberger L., 1960.** Traité botanique fascicule II. Masson. 335P.
- **Erdogrul OT., 2002.** Antibacterial activities of some plant extracts used in Folk medicine. *Pharm. Biol.* **40**: Pp.269-273.
- **Erdogrul OT., 2002.** Antibacterial activities of some plant extracts used in Folk medicine. *Pharm. Biol.* **40**: Pp.269-273.

## Références bibliographiques

---

- **FAO, 1990.** Protein quality evaluation. Report of a Joint FAO/WHO Expert Consultation, Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'Agriculture.Pp.3-4
- **Foua-Bi, K. 1992. Préambule. In: Foua-Bi K, Philogène B, oos. 1990. La post-récolte en Afrique: Actes du Séminaire International de la Post-Récolte en Afrique, Abidjan, Côte d'Ivoire 29 jan -1er fév. Montmagny. Aupelf-Uref, Pp. 152-4.**
- **Gachkar L., Yadegari D., Rezaei MB., Taghizadeh M., Astaneh SA., Rasooli I., 2007.**Chemical and biological characteristics of *Cuminumcyminum*and*Rosmarinusofficinalis*essential oils. *Food Chemistry*. **102:** Pp.898-904.
- **Gachkar L., Yadegari D., Rezaei MB., Taghizadeh M., Astaneh SA., Rasooli I., 2007.**Chemical and biological characteristics of *Cuminumcyminum*and*Rosmarinus officinalis* essential oils. *Food Chemistry*. **102:** Pp.898-904.
- **GAGNON C., 2005** - Le patriarche des optimiseurs : le romarin. Pp. 1-2.
- **GAKURU S. et FOUA-BI K 1996.** Effet d'extraits de plantes sur la bruche du niébé (*Coltosobructiusmaculatus*Fab.) et le charançon du riz (*Sitophilusorizae* L.). Cahiers Agriculture; vol. 5. W 1 :Pp.39-42.
- **Garnier G., BezangerBeauquesne L., Debraux G.,1961.**Ressourcesmédicinales de la florefrançaise. Ed. Vigot Frères .Tome II. Paris.
- **Giordani R., HadeF Y., Kaloustian J. 2008.** Compositions and antifungal activities of essential oils of some Algerian aromatic plants. *Fitoterapia* ,79 : pp199-203.

## Références bibliographiques

---

- **Guinochet M.,1973.**Phytosociologie. Paris. Masson éd. 227 P.
- **Hall, D.W. 1970.** *Handling and Storage of Food Grains, in Tropical and Subtropical Areas*, FAO. Rome, 350 P.
- **Hibar K., Daami-Remadi M., Khiareddine H. & El Mahjoub M., 2005:**Effet inhibiteur in vitro et in vivo du *Trichoderma harzianum* sur *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici*. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* **2**(3) : Pp.163-171.
- **I.T.E.I.P.M.I., 1991-** Généralités sur le romarin (*Rosmarinus officinalis* L.).Fiches techniques élaborées à partir de sources multiples. Mise à jour (Janvier), pp.2-5,
- **Inouye S., Takazawa T. and Yamaguchi H., 2001.** Antimicrobial activity of the essential oils and their major constituents against respiratory tract pathogens by gaseous contact.*Journal of Antibacterial Chemotherapy.* **47**: Pp.565-573.
- investigation of the essential oil of *Rosmarinus officinalis* L. *Journal of Agricultural and Food Chemistry.***52**(11): Pp.3530–3535.
- **Isman M.B.,1994.** Botanical insecticides. *Pesticides Outlook.* 5: 26-30.
- **Isman, M. B. 2005.** Tropical forests as sources of natural insecticides. In: Romeo, J. T. (ed.). *Chemical ecology and phytochemistry of forest ecosystems.* Recent Advances in Phytochemistry, v.39, Pp.145-16.
- **Jaset-Dongmo P.M., Tatsadjieu N.L., TchindaSonwa E., Kuate J.,AmvamZollo P.H. & Menut C. (2008).** Antiradical potentiel and antifungal activities of essential oils of the leaves of *Eucalyptus saligna* and *E.*



## Références bibliographiques

---

- camaldulensis* against *Phaeoramularia angolensis*. *African Journal of Biotechnology*, 7, Pp.4045-4050.
- **Jiang Y., Wua N., Fua YJ., Wang W., Luo , M., Zhaoa CJ., 2011.** Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of Rosemary. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* **32**:Pp.63–68.
  - **Jiang Y., Wua N., Fua YJ., Wang W., Luo , M., Zhaoa CJ., 2011.** Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of Rosemary. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* **32**:Pp.63–68.
  - **Kato, J., Y. Nishimura, R. Imamura, H. Niki, S. Hiraga, H. Suzuki 1990.** New topoisomerase essential for chromosome segregation in E. coli. *Cell* 63: Pp.393-404.
  - **Khosravi AR., Shokri H., Farahnejat Z., Chalangari R., Katalin M., 2013.** Antimycotic efficacy of Iranian medicinal plants towards dermatophytes obtained from patients with dermatophytosis. *Chin. J. Nat. Med.* **11**: Pp.43–48.
  - **Khosravi AR., Shokri H., Farahnejat Z., Chalangari R., Katalin M., 2013.** Antimycotic efficacy of Iranian medicinal plants towards dermatophytes obtained from patients with dermatophytosis. *Chin. J. Nat. Med.* **11**: Pp.43–48.
  - **KIM, S.; ROH, J.Y.; KIM, D.H.; LEE, H.S.; AHN, Y.J., 2003.** Insecticidal activities of aromatic plant extracts and essential oils against *Sitophilus oryzae* and *Callosobruchus chinensis*. *Journal of Stored Products Research*, v.39, Pp.293-303.
  - King, E.O., Ward, M.K. & Raney, D.E., 1954. Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescein. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine* 44, Pp. 301-307.
  - **Koba K., Sanda K., Raynaud C., Nenonene Y.A., Millet J. & Chaumon J.P. 2004.** Activités antimicrobiennes d'huiles essentielles de trois

## Références bibliographiques

---

Cymbopogonsp. Vis-; vis des germes pathogènes d'animaux de compagnie. Annales de Médecine Vétérinaire, 14 :Pp 202-206.

- **Kolai N, Saiah F. Boudia A, 2012.** Effet inhibiteur in vitro de l'huile essentielle d'*Artimesiaherbaalba* sur deux souche de *FusariumOxysporum*, *F.sp. radicis-lycopersici*. INSSN , Pp2170-1318.
- **Kuda T., Lavai A. &Yano T.,2004.**Effect of red pepper *Capsicum annum* var. conides and garlic *Allium sativum* on plasma lipid levels and cecalniicroflora in mice fed beef tallow. *Food Chemistry Toxicology*, 42, Pp.1695-1700.
- **Lograda T., Ramdani M., Chalard P., Figueredo G., 2014.**Characteristics of essential oilsof*Rosmarinusofficinalis*from eastern Algeria. *Global Journal of Research on Medicinal Plants & Indigenous Medicine*. 2: Pp.794-807.
- **Lopez P., Sanchez C., Batlle R., Nerin C., 2005.** Solid and vapor phase antimicrobial activities of six essential oils: Susceptibility of selected food borne bacterial and fungal strains. *J. Agric. Food Chem.* **53**:Pp.6939- 6946.
- **Lucini E. I., Zunino M. P. and Zygodlo J. A., 2006:** effect of monoterpenes on lipidcomposition and sclerotial development of *Sclerotiumcepivorum*Berk. *Journal ofphytopathology*. Vol154, Issue 7-8 :Pp. 441 - 446.
- **Luque de Castro M.D. et al.,1994.**Supercritical fluid extraction of carbamate pesticides from soils and cereals.Pp. 206–212.
- **Mathieu CB., Nathalie S., Denis Pageau M Sc. et Sylvie R., 2012.** Pour en savoirplus sur la Fusariose.7P.
- **Miladi H., Ben Slama R., Mili D., Zouari S., Bakhrouf A., Ammar E., 2013.** Essential oil of *Thymus vulgaris* L. and *Rosmarinusofficinalis*L.: Gas

## Références bibliographiques

---

- chromatography-mass spectrometry analysis, cytotoxicity and antioxidant properties and antibacterial activities against foodborne pathogens. *Natural Science*. **5(6)**: Pp729-739.
- **Mishra A.K. &Dubey N.K., 1994**: Evaluation of some essential oils for their toxicity against fungi causing deterioration of stored food commodities. *Applied and environmental microbiology* **60**:Pp. 1101-1105.
  - **Mohammedi z.,2006**. Etude du pouvoirantimicrobienetantioxydant de quelquesplantes de la région de Tlemcen. Thèse de magister. Option: Produits naturels, activité biologique et synthèse. Faculté des Sciences. Université ABB. Tlemcen. Algérie
  - **Nikaido H.,2003**. Molecular basis of bacterial outer membrane permeability revisited.*Microbiology and Molecular Biology Reviews*. **67(4)**: Pp.593-656.
  - **Nourachani I.,2010**. Caractérisation physico-chimique et biologique de l'huile essentielle des écorces de *Cryptocaryacrassifolia* (LAURACEAE) ; [Mémoire de DEA : Biochimie] Université D'Antananarivo ; Pp. 5-6.
  - **NUTO Y. 1995**. Synergistic action of co-occurringtoxins in the rootbark of *Zanthoxylumzanthoxyloides* (Rutaceae) against the cowpea beetle*Callosobruchusmaculatus* (Coleoptera : Bruchidae). Thesis of Ph.D.S.U.N.Y. Syracuse, New York 107P.
  - **Omidbeygi M., Barzegar M., Hamidi Z. &Naghdbadi H.,2007**. Antifungal activity of tyme, summer savory and clove essential oils against *Aspergillusxavus*in liquid medium and tomato paste. *Food Control*, **18**, Pp.1518-1523.
  - **Ouraini D., Agoumil A., Ismaili-Alaoui M., Alaoui K, Cherrah Y., Amrani M. &Bellabas M.A.,2005**. Etude de l'activité des huiles essentielles

## Références bibliographiques

---

de plantes aromatiques à propriétés antifongiques sur les différentes étapes du développement des dermatophytes. *Phytothérapie*, 4 ,Pp.147-157.

- **Oussou K.R., Coffi K., Nathalie G., Seriyolou, Gerard K., Mireille D., Yao T.N., Gilles F. & Jean-Claude C.H.,2004.** Activités antibactériennes des huiles essentielles de trois plantes aromatiques de Côte-d'Ivoire. *Comptes Rendus de Chimie*, 7,Pp.1081-1086.
- **Pauli A.,2001.** Antimicrobialproperties of essential oil constituents. *International Journal of Aromatherapy*, 11, Pp. 126-133.
- **Perrot E., 1971.** Les plantes médicinales, presses universitaires de France.
- **Philogène, B.J.R, Regnault-Roger, C. et Vincent, C. 2008.**Biopesticides d'origine végétale: bilan et perspectives.,*In Regnault-Roger, c.,Philogène, B.JR., Vincent, C. (éds) Biopesticides d'origine végétale, 2<sup>ème</sup> éd.*, Lavoisier, Paris..Pp.1-24.
- **Ponce G.2003**, mining the essential oils of the anthemideae *African journal of biotechnology*, 3 (12), Pp. 706 – 720.  
Pp.7-12.
- **Prasad etKapoor, 2004-** Multidrug resistance in yeast *Candida*. P 215-248.
- **Quezel P.et Santa S. (1963).** Nouvelle flore d'Algérie et des régions désertiques méridionales Tome II. C.N.R.Sc. Paris.Pp.781-793.
- **Ravi Kiran, S., Bhavani, K., Sita Devi, P., Rajeswara Rao, B.R.,JanardhanReddy, K.,2006.** Composition and larvicidal activity ofleaves

## Références bibliographiques

---

- and stem essential oils of *Chloroxylonswietenia* DC against *Aedes aegypti* and *Anopheles stephensi*. *Bioresour. Technol.* 97, Pp.2481–1892.
- **Regnault-Roger C., Philogene B.J.R Et Vincent C., 2002.** Biopesticides d'origine végétale. Edition Tec et Doc. 337P.
  - **REGNAULT-ROGER C., PHILOGENE B.J.R ET VINCENT C., 2002.** Biopesticides d'origine végétale. Edition Tec et Doc. 337P.
  - **Regnault-Roger, C., Philogène, B.J.R et Vincent, C. 2008.** Biopesticides d'origine végétale, 2<sup>ème</sup> édition, Lavoisier, Paris. édition, 550P.
  - **Rollan M.C., Mónaco C.I. & Nico A.,1999 :**Efecto de la temperatura sobre la interacción *in vitro* entre especies de *Trichoderma* y *Sclerotinia sclerotiorum*, *S. minor* y *S. rolfsii*. Investigación Agropecuaria, Productividad y Protección Vegetal.
  - **S. Ayadi, C. Jerribi, M. Abderrabba.,2011.** Extraction et étude des huiles essentielles de *Rosmarinus officinalis* cueillie dans trois régions différentes de la Tunisie. *Journal de la Société Algérienne de Chimie* 21(1): Pp.25-33.
  - **Santoyo S., Lioria R., Jaime L., Ibanez E., Senorans FJ. and Reglero G.,2006.**Supercritical fluid extraction of antioxidant and antimicrobial compounds from *Laurus nobilis*L. Chemical and functional characterization. *European Food Res. Technol.*224: Pp.75–81.
  - **Sartorelli, P., Marquioreto, A.D., Amaral-Baroli, A., Lima, M.E., Moreno, P.R., 2007.** Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oils from two species of Eucalyptus. *Phyther. Res.* 21, 1953, Pp. 231–233.
  - **Schwartz, S.H. ,1992.** Huiles végétales : teneurs en matières insaponifiables Science, Nutrition, Prévention et santé. Edité par la Fondation pour le libre choix, 12, 8.Rivas da Silva Lopes PM, Barros de Azevedo MM, Costa DC, Alviano CS, AlvianoDs (2012) Biological activities of  $\alpha$ -pinene and  $\beta$ -pinene enantiomers, Institute of microbiology Paulo de Góes,

## Références bibliographiques

---

Federal University of Rio de Janeiro-IMPG-UFRJ, CCS, Ilha do Fundão, Rio de Janeiro, RJ 21941-590, Brazil.

- **Shayya, E., Kostjukovski, M., Eilberg, J. & Sukprakarn, C. 1997.** Plant oils as fumigants and contact insecticides for the control of stored-product insects. *Journal of Stored Products Research*, 33: Pp. 7– 15.
- **Soylu E.M., Yigitba H., Tok F.M., Soylu S., Kurt S., Baysal Ö. And Kaya A.D., 2005.** Chemical composition and antifungal activity of the essential oil of *Artemisia annua* L. against foliar and soil-borne fungal pathogens. *Journal of Plant Diseases and Protection*, 112(32):Pp.229-239.
- **Sy A.A., 1976.** Contribution à l'étude de *Pyriculariaoryzae* Cav. Recherche *in vitro* d'antagonistes dans une perspective de lutte biologique. Thèse Doct. Ingénieur INP Toulouse : 236P.
- **Tapondjou, L. A., Adler, C., Bouda, H. and Fontem, D. A., 2002.** Efficacy of powder and essential oil from *Chenopodium ambrosioides* leaves as post-harvest grain protectants against six stored-product beetles. *J. Stored Prod. Res.* **38**, Pp. 395–402.
- **Teixeira-Duarte M.C., Mara-Figueira G. & Sartoratto A., 2005.** Anticandida activity of Brazilian medicinal plants. *Journal of Ethnopharmacology*, **97**, Pp.305-311.
- **Thiam, B. et Ducommun, G. 1993.** Protection naturelle des végétaux en Afrique. ENDA, Tiersmonde, Dakar. 213P.

## Références bibliographiques

---

- **TIERTO-NIBER B., HELLENIUS J. and VARIS A.-L. 1992.** Toxicity of plant ex tracts to three storage beetles (Co/eoptera). J. Appl. Ent. 113, Pp.202-208.
- **Uribes., Ramirez T., Pena A. 1985.** Effects of B. pinene on yeast membrane functions. Journal of Bacteriology, Pp.1195-1200.
- **Valisolalao J.,1989.** Huile Essentielle , Inventaire Et Etudes Des Plante Aromatiques et medicinales Des Etats De L'ocean indien ; projet FED/COI /AIRDOI .
- **Valnet J., 1984.** Aromathérapie, traitement des maladies par les essences des plantes.10ème Ed. Maloine, S.A.Editeurs.
- **Vincent, c., Panneton, B., Fleurat-Lessard, F. 2000.** La lutte physique en phytoprotection. INRA, Paris. 347P.
- **Weidner, H. et Rack, G. 1984.** Table de détermination des principaux ravageurs des denrées entreposées dans les pays chauds. GTZ, Eschborn.
- **Wheathey, P. E. 1973.** Post harvest deterioration: the maize storage problem in less developed countries of Africa. Chem. et Industry, 1049P.
- **Zaika,I.I.,1988.**Spices and Herbs ;thire antimicrobial activity and its determination.journal of Food Safety 9: Pp.97-117.
- **Zhiri A., 2006.** Les huiles essentielles un pouvoir antimicrobien avéré. Nutra News.

**Annexe 1 : « Le matériel utilisé lors de l'expérimentation »**

**1-L'appareillage :**

- Balance de précision.
- Une hotte ·
- Une étuve.
- Four pasteur.
- Une balance électrique.
- Un réfrigérateur.
- Plaque chauffante.
- Centrifugeuse.
- Autoclave.
- Agitateur de tubes : vortex.
- Un microscope optique.
- Microscope à épi fluorescence.
- Hydro distillateur.
- Agitateur Ping Pong.
- Clevenger

**2- Matériel et Verrerie :**

- Papier aluminium.
- Tubes à essai en verre.
- Seringues stériles.
- Disque en papier.
- Flacons.
- Béchers.
- Pipette pasteur.
- Pince de laboratoire.
- Anse stérile.
- Fioles.
- Portoir pour tubes.
- Ampoule à décanter.
- Etiquettes.
- Spatule.



## LES ANNEXES

---

- Erlenmeyer de 1000 ml et de 500 ml.
- Pipettes graduées.
- Les fioles.
- Des tubes à essai.
- Papier Wattman stérile.
- Des boîtes de Pétri.
- Un scalpel.
- Un compteur manuel.
- Une gaze.
- Couvercle.
- Coton.
- Lame de microscopie.
- Un bec Bunsen.

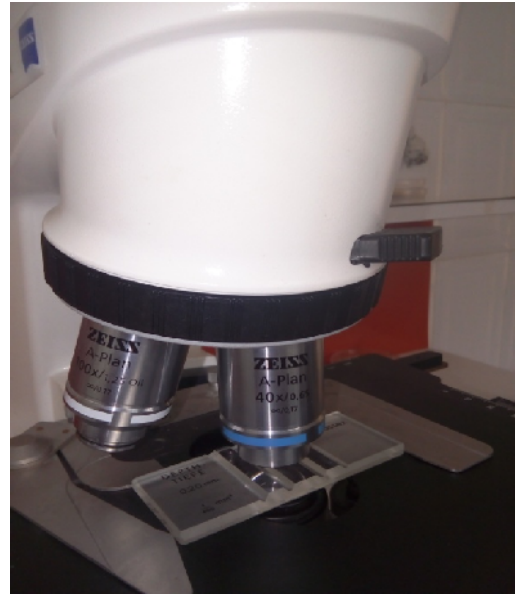
### **3-Réactifs et préparations :**

- Alcool (éthanol à 70°).
- Eau physiologique stérile (0.85
- polysorbate 80 c32H60 o26.

Annexe 2 : « Les appareils utilisé



Cellule de Malassez



Autoclave



Four pasteur

## LES ANNEXES

---



**Etuve de mycologie de Température 24<sup>0</sup> à 25<sup>0</sup>**



**Etuve bactérienne de température 26<sup>0</sup> à 27<sup>0</sup>**

## LES ANNEXES

---



**La hotte**



**Four pasteur**



**Agitateur Ping Ponge**



**Agitateur vortex des tubes.**



## LES ANNEXES



**Microscope à épi fluorescence.**



**Lope optika**

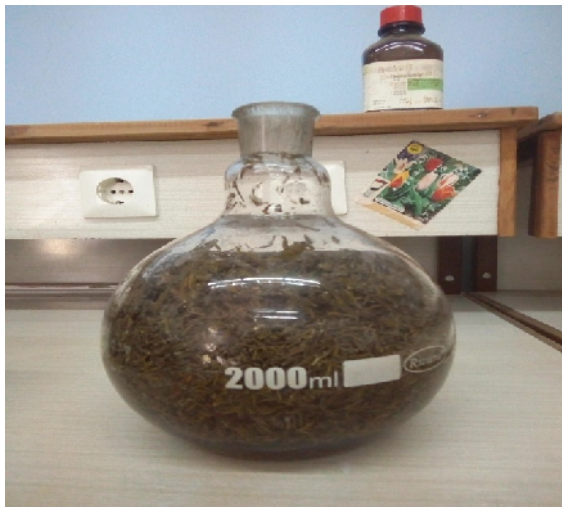


**Clevenger**



**Huile avec hydrolat**

## LES ANNEXES



Ballon de 2L



Chauffe ballon



Balance précise





## LES ANNEXES

---



Micropipettes de 10-100ul et 0,5-10ul



Micropipette de 100-1000ul

## LES ANNEXES

---



Les concentrations des huiles



les cuvettes



Annexe 3 : Figure de l'expérimentation

a- Saison d'automne :



Romarin spontané de la saison automne de la région *Tissimssilt*.



Plante de romarin



Les rameaux de romarin



b- Saison d'hiver :



Romarin spontané de la région de tissimssilt



Romarin *Rosmarinus officinalis* L. de la region de tissimssilt.



c- Saison de printemps :



Romarin *rosmarinus officinalis L.* de la region de tissimssilt.



Plante de romarin



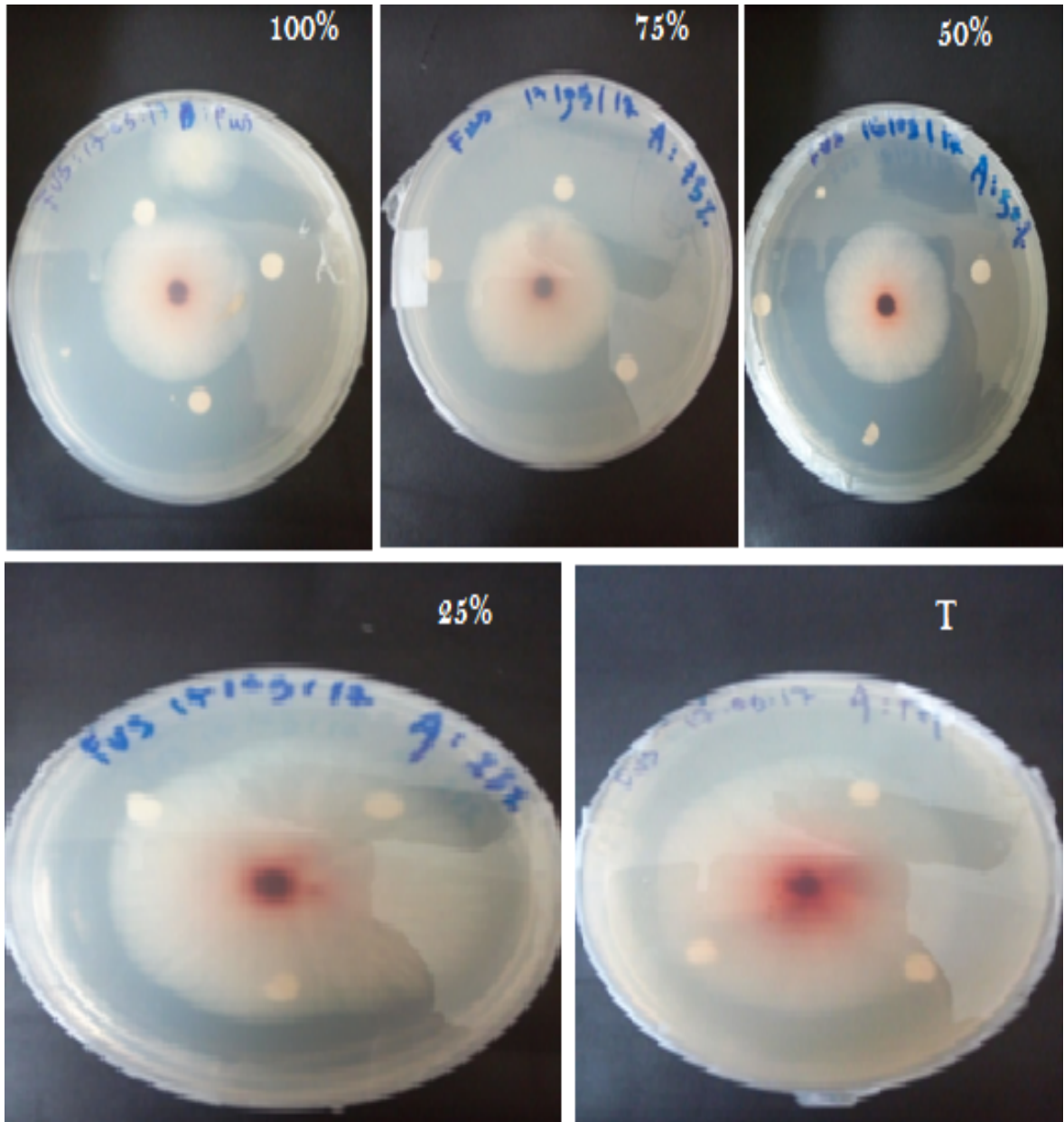
Grain de romarin

## LES ANNEXES

---

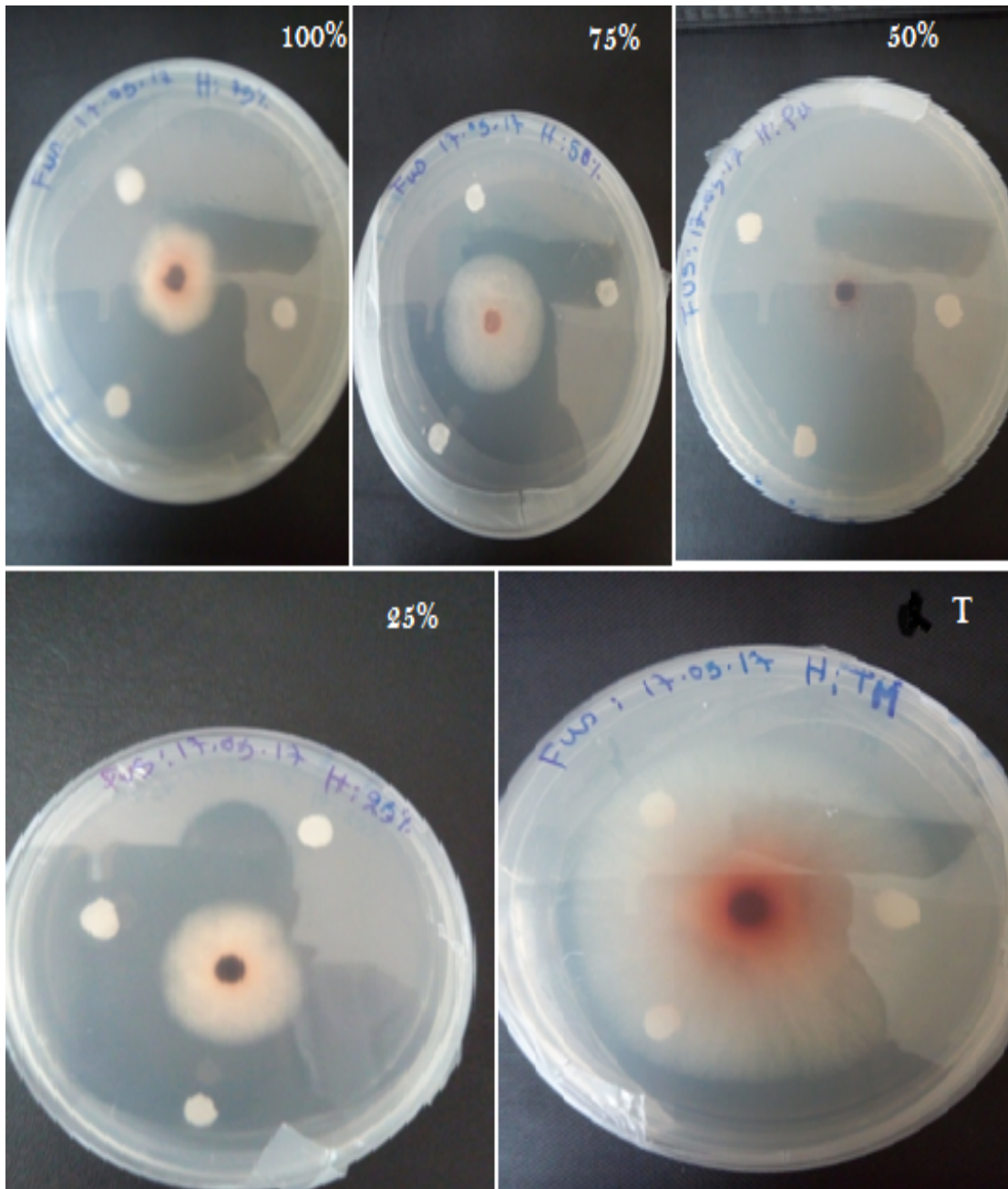
a- Fongicide : zone inhibition de *fusarium sp* pour trois saison.

1- saison automne :



LES ANNEXES

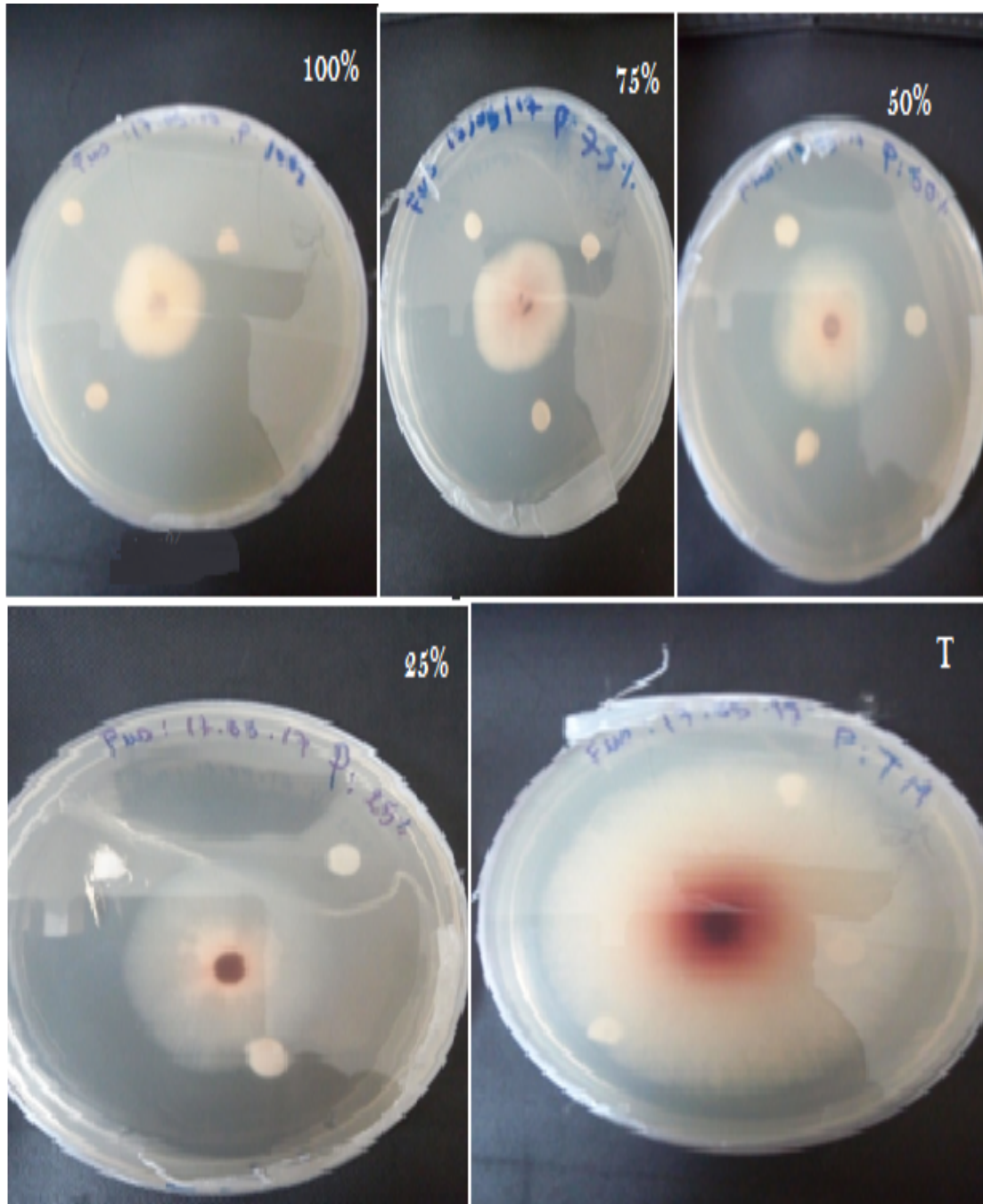
2- saison hiver





## LES ANNEXES

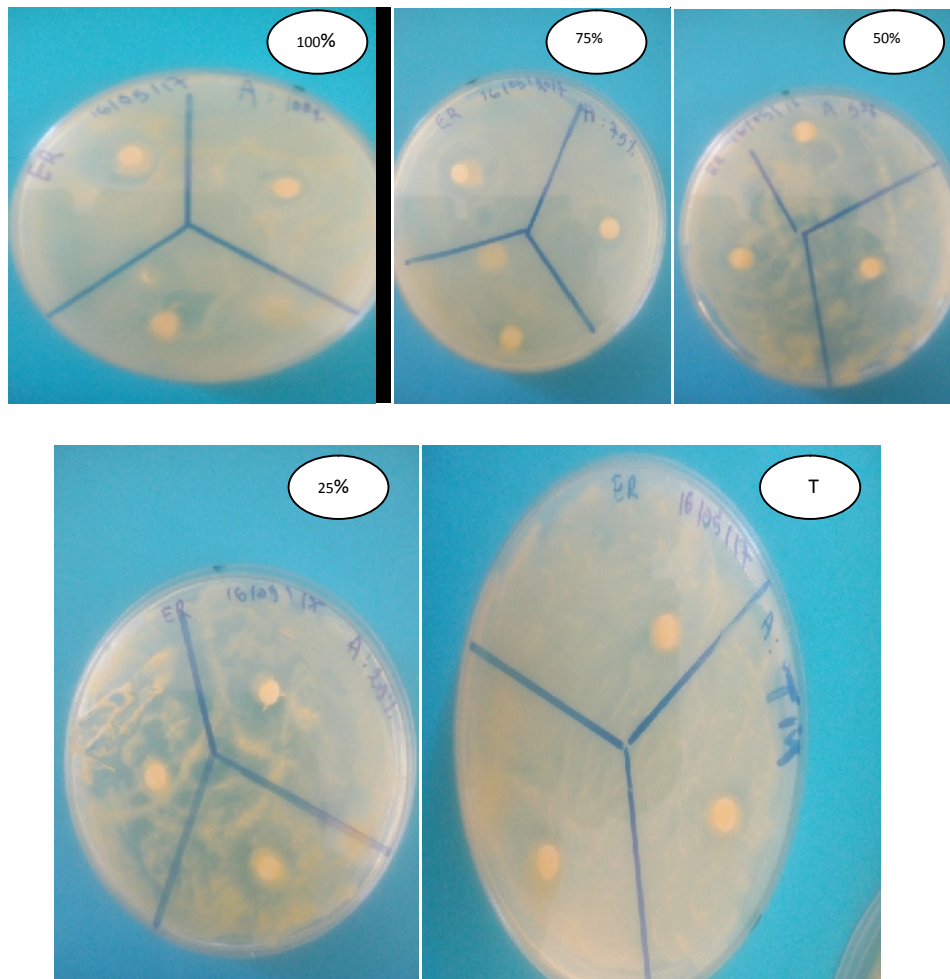
### 3- saison printemps :



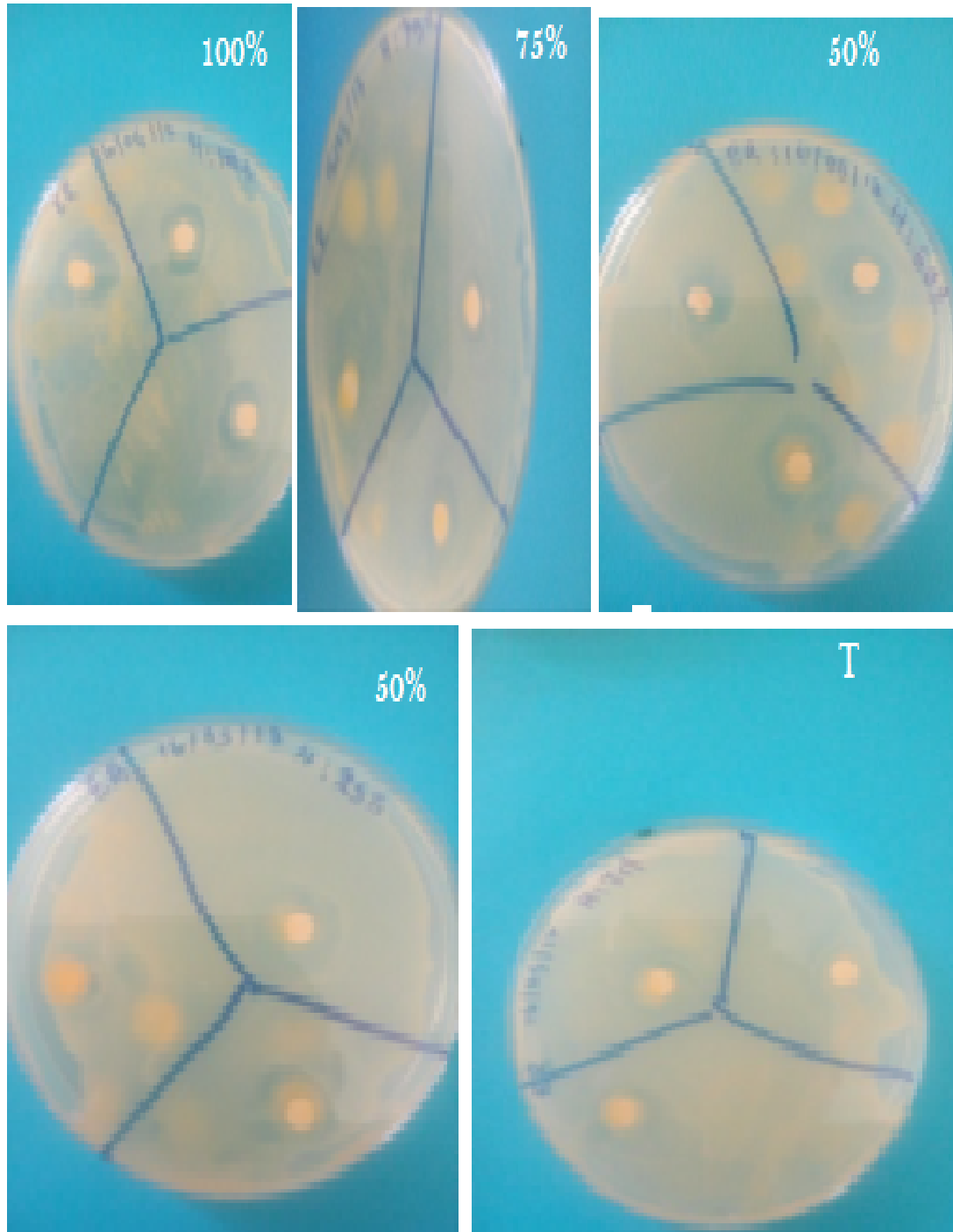
## LES ANNEXES

b- bactéricide : zone inhibition de *Erwinia amylovora* pour trois saisons.

### 1- Saison d'automne



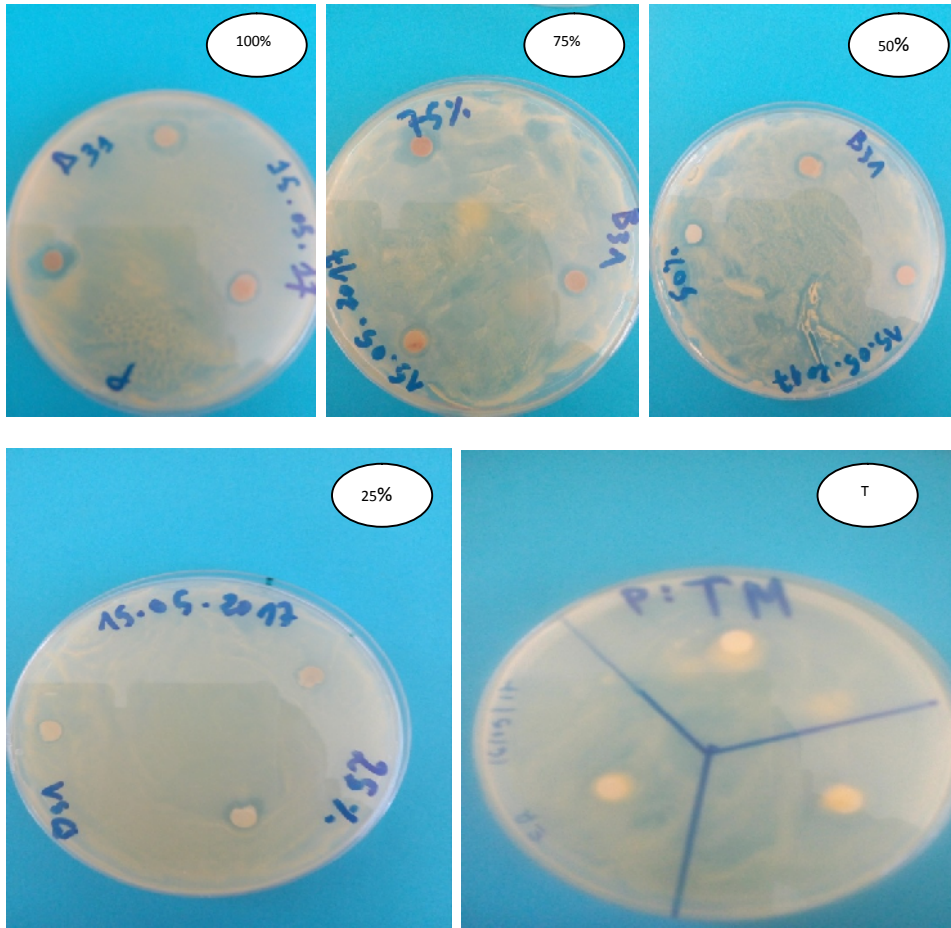
2- Saison d'hiver





# LES ANNEXES

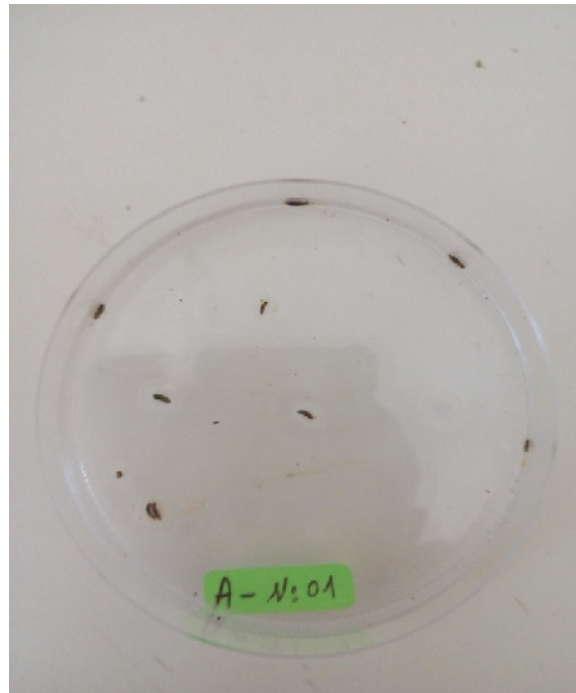
## 3 – Saison printemps



## LES ANNEXES

---

Effet des doses sur la mortalité de l'insecte *Tuta absoluta* dans les trois saisons.



## LES ANNEXES

### Annexe 04 : Analyse statistiques

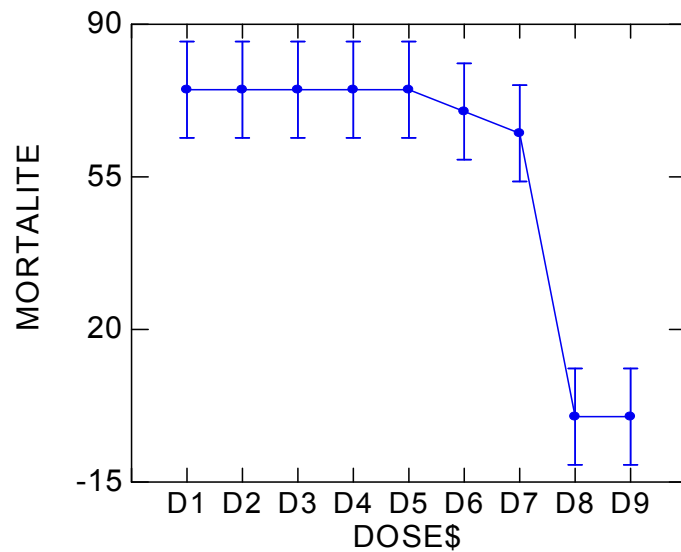
**Tableau 5:** Analyse de la variance de l'activité antimicrobienne vis-à-vis *Erwinia amylovora*.

Source	DDL	Somme des carrés	Moyenne des carrés	F	Pr > F
Modèle	6	213,330	35,555	44,443	< 0,0001
Erreur	38	30,401	0,800		
Total corrigé	44	243,731			

**Tableau 6:** analyse de la variance de l'activité antimicrobienne vis-à-vis *fusarium sp.*

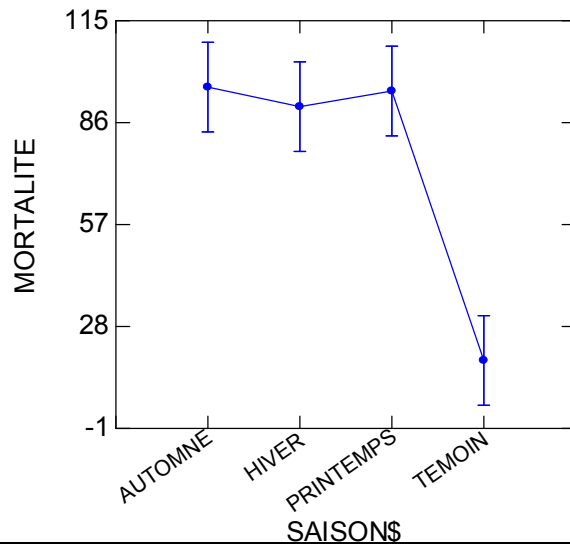
Source	DDL	Somme des carrés	Moyenne des carrés	F	Pr > F
Modèle	6	370,372	61,729	4,964	0,001
Erreur	38	472,503	12,434		
Total corrigé	44	842,875			

La mortalité de *tota absoluta* de la tomate à différentes doses en HE



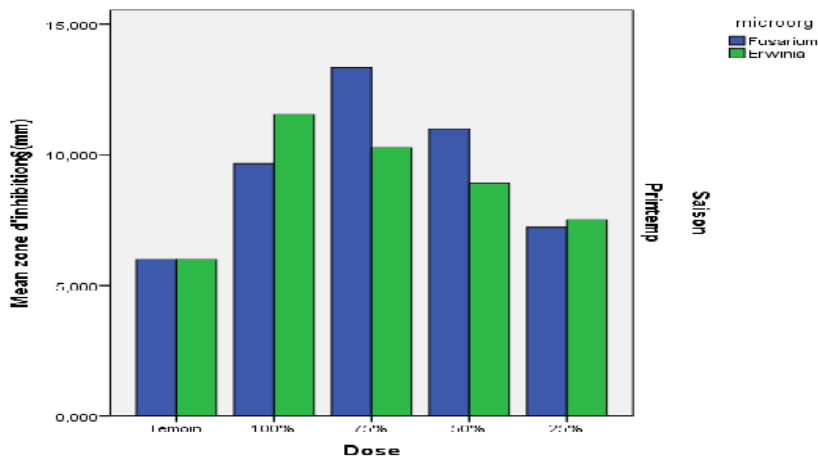
## LES ANNEXES

% de la mortalité *Tuta absoluta* pour trois huiles de romarin saison



**Tableau 7** : analyse de la variance de l'activité insecticide vis-à-vis *Tuta absoluta*.

Source Squares	Sum-of-	df	Mean-Square	F-ratio	P
SAISON\$	38688.889	3	12896.296	26.429	0.000
DOSE\$	33400.000	8	4175.000	8.556	0.000
Error	11711.111	24	487.963		



## LES ANNEXES

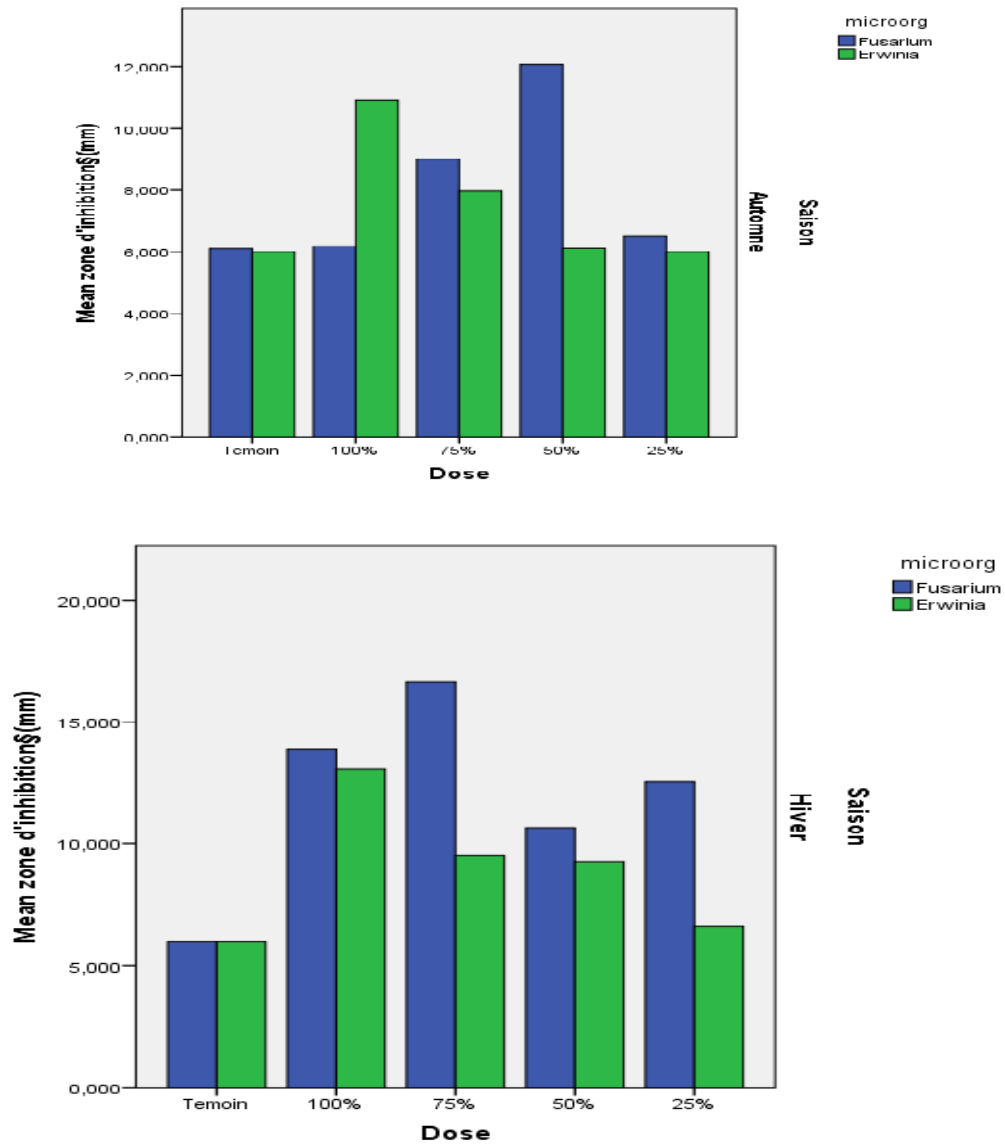


Figure : Zone d'inhibition pour les trois saisons.

## LES ANNEXES

**Tableau 6** : analyse de la variance de l'activité antimicrobienne vis-à-vis *fusarium sp.*

Microorg				Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig. <sup>b</sup>	95% Confidence Interval for Difference <sup>b</sup>	
							Lower Bound	Upper Bound
Fusarium	Temoin	Automne	Hiver	,100	2,007	,960	-3,915	4,115
			Printemp	,100	2,007	,960	-3,915	4,115
		Hiver	Automne	-,100	2,007	,960	-4,115	3,915
			Printemp	6,217E-15	2,007	1,000	-4,015	4,015
		Printemp	Automne	-,100	2,007	,960	-4,115	3,915
			Hiver	-6,217E-15	2,007	1,000	-4,015	4,015
	100%	Automne	Hiver	-7,711 <sup>*</sup>	2,007	,000	-11,726	-3,696
			Printemp	-3,489	2,007	,087	-7,504	,526
		Hiver	Automne	7,711 <sup>*</sup>	2,007	,000	3,696	11,726
			Printemp	4,222 <sup>*</sup>	2,007	,040	,207	8,237
		Printemp	Automne	3,489	2,007	,087	-,526	7,504
			Hiver	-4,222 <sup>*</sup>	2,007	,040	-8,237	-,207
	75%	Automne	Hiver	-7,668 <sup>*</sup>	2,007	,000	-11,683	-3,653
			Printemp	-4,334 <sup>*</sup>	2,007	,035	-8,349	-,319
		Hiver	Automne	7,668 <sup>*</sup>	2,007	,000	3,653	11,683
			Printemp	3,333	2,007	,102	-,682	7,348
		Printemp	Automne	4,334 <sup>*</sup>	2,007	,035	,319	8,349
			Hiver	-3,333	2,007	,102	-7,348	,682
	50%	Automne	Hiver	1,390	2,007	,491	-2,625	5,405
			Printemp	1,058	2,007	,600	-2,957	5,073
		Hiver	Automne	-1,390	2,007	,491	-5,405	2,625
			Printemp	-,332	2,007	,869	-4,347	3,683
		Printemp	Automne	-1,058	2,007	,600	-5,073	2,957
			Hiver	,332	2,007	,869	-3,683	4,347
25%	Automne	Hiver	-6,055 <sup>*</sup>	2,007	,004	-10,070	-2,040	
		Printemp	-,722	2,007	,720	-4,737	3,293	
	Hiver	Automne	6,055 <sup>*</sup>	2,007	,004	2,040	10,070	
		Printemp	5,333 <sup>*</sup>	2,007	,010	1,318	9,348	
	Printemp	Automne	,722	2,007	,720	-3,293	4,737	
		Hiver	-5,333 <sup>*</sup>	2,007	,010	-9,348	-1,318	
Erwinia	Temoin	Automne	Hiver	-2,220E-16	2,007	1,000	-4,015	4,015
			Printemp	-8,882E-16	2,007	1,000	-4,015	4,015
		Hiver	Automne	2,220E-16	2,007	1,000	-4,015	4,015
			Printemp	-6,661E-16	2,007	1,000	-4,015	4,015
		Printemp	Automne	8,882E-16	2,007	1,000	-4,015	4,015
			Hiver	6,661E-16	2,007	1,000	-4,015	4,015
	100%	Automne	Hiver	-2,139	2,007	,291	-6,154	1,876
			Printemp	-,639	2,007	,751	-4,654	3,376
		Hiver	Automne	2,139	2,007	,291	-1,876	6,154
			Printemp	1,500	2,007	,458	-2,515	5,515
		Printemp	Automne	,639	2,007	,751	-3,376	4,654
			Hiver	-1,500	2,007	,458	-5,515	2,515
	75%	Automne	Hiver	-1,555	2,007	,441	-5,570	2,460
			Printemp	-2,306	2,007	,255	-6,321	1,709
		Hiver	Automne	1,555	2,007	,441	-2,460	5,570
			Printemp	-,750	2,007	,710	-4,765	3,265
		Printemp	Automne	2,306	2,007	,255	-1,709	6,321
			Hiver	,750	2,007	,710	-3,265	4,765
	50%	Automne	Hiver	-3,167	2,007	,120	-7,182	,848
			Printemp	-2,806	2,007	,167	-6,821	1,209
		Hiver	Automne	3,167	2,007	,120	-,848	7,182
			Printemp	,361	2,007	,858	-3,654	4,376
		Printemp	Automne	2,806	2,007	,167	-1,209	6,821
			Hiver	-,361	2,007	,858	-4,376	3,654
25%	Automne	Hiver	-,611	2,007	,762	-4,626	3,404	
		Printemp	-1,527	2,007	,450	-5,542	2,488	
	Hiver	Automne	,611	2,007	,762	-3,404	4,626	
		Printemp	-,916	2,007	,650	-4,931	3,099	
	Printemp	Automne	1,527	2,007	,450	-2,488	5,542	
		Hiver	,916	2,007	,650	-3,099	4,931	