



République Algérienne Démocratique et Populaire



Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

Université Abdelhamid Ibn Badis Mostaganem

Faculté des sciences de la nature et de la vie

Département des sciences agronomiques

Mémoire de fin d'étude

En vue de l'obtention du diplôme de master en Agronomie

Spécialité : Protection des végétaux

THÈME

Optimisation des facteurs influençant l'extraction des substances bioactives *d'Origanum vulgare*L. et ses applications comme biopesticide.

Présenté par :

Soutenu le :04/07/2023

CHAIB Kheira et BENARBIA Hanane

Membres de Jury :

Présidente SAIAH Farida

Maitre des conférences B-Univ-Mostaganem

Examinatrice BADAOUI Mahdjouba Ikram

Maitre des conférences B-Univ-Mostaganem

Encadreur BENOURAD Fouzia

Maitre des conférences A-Univ-Mostaganem

ANNÉE UNIVERSITAIRE : 2022 /2023



REMERCIEMENT

Nous tenons d'abord à remercier le tout puissant, notre DIEU.

*Nous adressons nos plus sincères remerciements à notre Encadreur Mme **BENOURAD Fouzia** qui a bien voulu diriger ce travail et qui n'a cessé de nous orienter. Nous nous permettons de lui exprimer nos sincères remerciements pour sa disponibilité, ses précieux conseils qu'elle nous a prodigué et pour son aide durant toute la période d'élaboration de ce travail. Profondément Merci.*

Un grand remerciement aux honorables membres du jury :

*Mme **BADAoui Mahdjouba ikram**, d'avoir accepté d'être l'examinatrice de ce Mémoire et Mme **SAIAH Farida.**, d'avoir accepté de présider ce jury.*

Nous remercions nos familles pour leurs soutiens, leurs grandes affections et les grands efforts pour nous aider à réaliser ce travail.

Dédicace

2023



Je dide mon travaille

*A celui qui ne sera égalé par personne et à personne qui prendra sa place, à celui qui m'a enseigné que la vie est un combat et que ses armes sont le savoir et la connaissance, à celui qui a travaillé dur et a souffert pour me procurer le confort et le bonheur, à celui dont je porte le nom avec fierté, à l'homme le plus grand de l'univers, **mon cher père Mohammed.***

*A celle qui m'a élevé avec soin, à celle qui enduré toutes les choses, à celle qui a été mon soutien dans les moments difficiles et m'a donné la force et la détermination, à celle qui m'a suivi pas à pas dans mon travail, à celle dont la prière était le secret de ma réussite, à celle avec qui je me sentais à chaque fois que je me rappelais son sourire, **ma chère mère Masaouda.***

*A mes soutiens et compagnons de route, à ceux sur qui j'ai compté dans ma vie, mes frères : **Abdelmadjid – Otheman – Abdelhadi – Soufiane – Ishak - Lahcen.***

*A l'esprit de mes grands-pères **Ahmed – Abdelkader,** à mes grands-mères **Fatima – Zaineb.***

*A mes oncles et mes cousins, chacun en son nom et tout la famille **CHAIB.***

*Acelles avec qui j'ai partagé mes plus beaux souvenirs, mes amies : **Oumelkheir O – Rafiq D – Chahira B – Amel Z – Safaa B.***

*A ma copine qui m'a partagé ce travail **Hanane B.***

A tous ceux qui m'ont appris une lettre, je n'oublierai jamais vos efforts.

Kheira





Dédicace

A mon exemple éternel mon soutien moral et source de joie et de bonheur, celui qui s'est toujours sacrifié mon cher Papa.

A la lumière de mes jours, la source de mes efforts, la flamme de mon cœur, ma vie et mon bonheur ma chère Maman.

À mes chères sœurs : Djamila et Wanassa

A toute ma famille Ben arbia

A mes chères amies : Rafiqa, Assma, chahira, Amel et Safaa

À mon binôme Kheira qui a partagé avec moi les bons et les durs moments.

Hanane.....



Résumé

La présente étude a pour objectif de proposer des solutions alternatives basées sur l'utilisation des produits naturels « biopesticides », afin de lutter contre trois maladies cryptogamiques et bactériennes. Pour répondre à cet objectif, nous avons évalué l'activité antifongique et antibactérienne des extraits aqueux et les huiles essentielles d'*Origanum vulgare* sur *Alternaria alternata*, *Fusarium oxysporum*, *Botrytis cinerea* et la bactérie *Clavibacter michiganensis*. L'extraction des principes actifs est effectuée par deux méthodes différentes, la première est l'extraction par eau-sub-critique et la deuxième est une hydrodistillation. Pour l'extraction par eau sub-critique, l'augmentation de la durée d'extraction influe négativement sur le résultat, l'efficacité diminue au fur et à mesure que la durée d'extraction augmente. L'efficacité de ces extraits aqueux est dosée dépendante. En revanche, l'huile essentielle d'origan exerce un pouvoir antifongicide très puissant, dont l'inhibition totale est atteinte à une dose très faible (20 µl/ml) ceci pour l'ensemble des souches étudiées.

Mot clés : huiles essentielles, *Origanum vulgare*, *Alternaria alternata*, *Fusarium oxysporum*, *Botrytis cinerea*, *Clavibacter michiganen*, eau sub-critique, hydrodistillation.

Summary

The present study aims to propose alternative solutions based on the use of natural products "biopesticides", in order to fight against three cryptogamic and "bacterial" diseases. To meet this objective, we evaluated the antifungal and antibacterial activity of aqueous extracts and essential oils of *Origanum vulgare* on *Alternaria alternata*, *Fusarium oxysporum*, *Botrytis cinerea* and the bacterium *Clavibacter michiganensis*. The extraction of the active ingredients is carried out by two different methods, the first sub-critical water extraction and the second is hydro distillation. For subcritical water extraction, increasing the extraction time increases. The efficiency decreases as the extraction time increases. The efficacy of these aqueous extracts is dose dependent. On the other hand, essential of oregano exerts a very powerful antifungal power, the total inhibition of which is reached at a very low dose (20 µl/lm) for all the strains studied.

Keywords: essential oil, *Origanum vulgare*, *Alternaria alternata*, *Fusarium oxysporum*, *Botrytis cinerea*, *Clavibacter michiganensis*, subcritical water, hydrodistillation.

الملخص

تهدف الدراسة الحالية الى اقتراح حلول بديلة تعتمد على استخدام المنتجات الطبيعية "المبيدات الحيوية" من اجل مكافحة ثلاثة أمراض فطرية وبكتيرية. لتحقيق هذا الهدف قمنا بتقييم النشاط المضاد للفطريات والبكتيريا للمستخلصات المائية والزيوت الأساسية من *Origanum vulgare* ضد *Alternaria alternata* و *Fusarium oxysporum* و *Botrytis cinerea* والبكتيريا *Clavibacter michiganensis*. ويتم استخلاص المكونات النشطة بطريقتين مختلفتين الأول eau subcritique والثانية hydrodistillation. بالنسبة ل eau subcritique فان زيادة وقت الاستخراج يؤثر سلبا على النتائج، وتقل الكفاءة مع زيادة وقت الاستخراج، فعالية هذه المستخلصات المائية تعتمد على الجرعة. من ناحية أخرى فان الزيوت الأساسية ل *Origanum vulgare* لها قوة تثبيط عالية جدا للفطريات، والتي يتم الوصول إلى تثبيط الكامل عند جرعة منخفضة جدا (20 ميكرو لتر / ميليلتر) لجميع سلالات المدروسة.

الكلمات المفتاحية: المستخلصات المائية، *Origanum vulgare*, *Alternaria alternata*, *Fusarium oxysporum* الزيوت الأساسية، *Botrytis cinerea*, *Clavibacter michiganensis*, eau subcritique, hydrodistillation.

Liste des figures et des planches

Figure 01	Chronologie des évènements important dans le développement des biopesticides microbiens	22
Figure 02	Insecticide poudre au pyréthre	25
Figure 03	Extrait de l'écorce de l'arbre <i>Quessia amara</i>	25
Figure 04	représentation schématique de différentes étapes de la macération	35
Figure 05	Appareillage utilisé pour l'hydro distillation	36
Figure 06	Appareillage utilisé pour l'extracteur soxhlet	37
Figure 07	Diagramme d'extraction au co2 supercritique	39
Figure 08	représentation schématique de l'extraction assistée par micro-ondes	40
Figure 09	<i>Vitis Vinifera</i> utilisée	42
Figure 10	Extraction par entrainement à la vapeur	43
Figure 11	Fruit d'une tomate avec des symptômes montrant qu'il agit d'une contamination mixte	44
Figure 12	Les différentes étapes de l'isolement de la bactérie (A : désinfection de l'anse par flambage ; B : Prélèvement d'un explant ; C :ensemencement dans le bouillon nutritif) .	45
Figure 13	Les différentes étapes de la Coloration de Gram (a: fixation de l'échantillon à la chaleur, b : Les colorants (violet, lugol, alcool, fuchsine), c,d :l'ajout des colorants	46
Figure 14	préparation des boites contenant le milieu de culture additionné aux deux doses d'huiles essentielles HE1 et HE2.	47
Figure 15	préparation des boites contenant le milieu de culture additionné aux différentes doses d'extraits	48
Figure 16	Préparation de la dilution de la culture bactérienne	48
Figure 17	Les étapes de Test <i>in-vivo</i> de l'efficacité boifongicide des extraits et l'huile essentielle de l'origan appliqués préventivement sur feuilles détachées.	49
Figure 18	aspect microscopique de la souche bactérienne isolée <i>Clavibacter michiganensis</i> (grossissement x40).	51
Figure 19	aspects macroscopique (a) et microscopique (b) d' <i>Alternaria alternata</i> au microscope G x 100	52
Figure 20	(a) aspects macroscopique (b) et microscopique de <i>fusarium oxysporum</i> .	52

Figure 21	(a) ; colonie <i>Botrytis cinerea</i> en boîte Pétri ; (b) : Observation microscopique de <i>Botrytis cinerea</i> G x 100.	53
Figure 22	Effet d'huiles essentielle sur la croissance mycélienne	53
Figure 23	Effet d'huiles essentielle sur <i>Alternaria alternata</i>	54
Figure 24	Effet d'huiles essentielles sur <i>Fusarium oxysporum</i>	54
Figure 25	Effet d'huiles essentielles sur <i>Botrytis cinerea</i>	54
Figure 26	Effet des extraits aqueux sur la croissance mycélienne	55
Figure 27	Effet des extraits aqueux sur la croissance mycélienne de la souche <i>Alternaria alternata</i> .	55
Figure 28	Taux d'inhibition de la croissance mycélienne de <i>Fusarium oxysporum</i> sous l'effet des différentes concentrations des extraits aqueux d' <i>Origanum vulgare</i> .	56
Figure 29	l'effet de l'extrait aqueux sur la croissance mycélienne de <i>Fusarium oxysporum</i> .	56
Figure 30	Taux d'inhibition de la croissance mycélienne de <i>Botrytis cinerea</i> sous l'effet des différentes concentrations de l'extrait aqueux	57
Figure 31	: l'effet de l'extrait aqueux sur la croissance mycélienne de <i>Botrytis cinerea</i> .	57
Figure 32	Effet des extraits aqueux et l'huiles essentielles d'origan sur <i>Clavibacter michiganensis</i> a différentes concentrations.	58
Figure 33	Effet des extraits aqueux et l'huiles essentielles d'origan sur <i>Clavibacter michiganensis</i> a différentes concentrations.	58
Figure 34	Les symptômes de <i>Botrytis cinerea</i> sur les feuilles de la vigne	59

Liste des tableaux

Tableau N°1	Exemples de biopesticides commercialisés	28 - 29
--------------------	--	----------------

Liste des abréviations

HE : huiles essentielle

PDA: Potato dextrose agar

GN: gélose nutritive

Ex (8) : extrait aqueux durées 8 min

Ex(18) : extrait aqueux durées 18 min

Ex (28) : extrait aqueux durées 28 min

FAO : Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et agriculteur

Table des Matières

Remerciements

Dédicace

Résumé

Liste des figures

Liste des tableaux

Liste des abréviations

Introduction 10

Chapitre I Toxicité des pesticides de synthèse

I-1-Historique des pesticides 13

I-2-Définition des pesticides 14

I-3-composition des pesticides 14

I-4-Classification des pesticides 15

I.4.1 Classification selon l'usage 15

I.4.2. Classification selon leur cible 15

I.5. Classification selon mode d'action des pesticides 16

I.5.1. Mode d'action des herbicides 16

I.5.2. Mode d'action des insecticides 16

I.5.3. Mode d'action des fongicides 17

I.6. Effet toxique des pesticides 17

I.6.1. Effets sur la santé humaine 17

I.6.2. Effet sur l'environnement 18

Chapitre II Les biopesticides

II.1. Histoire des biopesticides 21

II.2. Définition des biopesticides 22

II.3. Classification des biopesticides 23

II.3.2 Les biopesticides d'origine végétale 24

II.3.2.1 Les biopesticides d'origine végétale à caractère insecticides.....	25
II.3.2.1.1 Sélectivité	25
II.3.2.1.2 Spécificité.....	26
II.3.2.1.3 Biodégradabilité.....	26
II.3.2.1.4 Résistance.....	26
II.3.2.1.5 Biodisponibilité.....	26
II.3.3 Les biopesticides d'origine animale	27
II.4. Homologation des biopesticides	29
II.4.1 Données et information exigées pour l'homologation des biopesticides	29
II.5. Les Avantages et Inconvénients des biopesticides	31
II.5.1 Les Avantages	31
II.5.2 Les Inconvénient	32
Chapitre III Les Techniques d'extraction	
III.1. Définition d'extraction	34
III.2. Les différentes techniques d'extraction	34
III.2.1 Infusion	34
3.2.2 Décoction	34
3.2. 3 Macération	34
III.2.4 Extractions par Hydro distillation	35
3.2.5 L'entraînement à la vapeur d'eau	36
III.2.6 Extractions à chaud en continu (Soxhlet).....	36
III.2.7 Extractions par eau sub-critique.....	37
III.2.8 Extractions au CO2 supercritique	38
III.2.9 Extractions assistée par micro-ondes	39
Partie expérimentale	
I.1. Objectif de l'étude.....	41
I.2. Matériel Végétal.....	41
I.2.1 Description de l'espèce <i>Origanum vulgare</i>	41
I.3. Techniques d'Extraction.....	42

I.3.1	Extraction de l'huile essentielle.....	42
I.3.2	Préparation des extraits aqueux :	42
I.4.	Isolement des agents phytopathogènes.....	43
I.5.	Purification des souches	43
I.6.	Identification des isolats	43
I.7.	Isolement de souche bactérienne	44
I.8.	Identification de souche bactérienne	45
I.9.	Evaluation de l'activité antifongique d'huiles essentielles (HE) <i>in vitro</i>	46
I.10.	Evaluation de l'activité antifongique des extraits aqueux <i>in vitro</i>	46
I.11.	Evaluation de l'activité antibactérienne d'huiles essentielles et des extrais aqueux	47
I.12.	Test <i>in-vivo</i>	48
Résultats		
II.	Aspect macroscopique et microscopique des souches isolées.....	51
II.1.1	La Souche bactérienne <i>Clavibacter michiganensis</i>	51
II.1.2	Identification des isolats fongiques	51
II.2.	Activité antifongique des huiles essentielles et des extraits aqueux.....	53
II.2.1	Effet d'huiles essentielle sur la croissance mycélienne.....	53
II.2.2.	Effet des extraits aqueux sur la croissance mycélienne.....	54
II.4.	Activité antibactérienne	57
II.4.1.	Effet des extraits aqueux et l'huiles essentielles d'origan sur <i>Clavibacter michiganensis</i>	57
II.5.	Test <i>in-vivo</i>	59
Discussion		60
Conclusion.....		62

_Toc139632921

Référence bibliographiques

Annexes

Introduction

Introduction

Après la Seconde Guerre mondiale, l'introduction des pesticides a joué un rôle crucial dans le développement de l'agriculture en augmentant les rendements et en régulant la production agricole. Ces produits chimiques ont également contribué à la prévention ou à l'élimination de plusieurs maladies parasitaires dangereuses (Bourbia, 2013).

Actuellement les pesticides et leurs effets sur la santé humaine et l'environnement sont devenue un sujet de préoccupation majeur. Au cours des deux dernières décennies, la révolution industrielle et le développement technologique dans le domaine de l'agriculture a considérablement compliqué les problèmes de l'environnement (Andra et *al.*, 2017).

Récemment, le monde adopte des mesures visant à promouvoir l'agriculture biologique dans le but de préserver la santé humaine et de maintenir l'équilibre biologique et environnemental. Ces actions sont prises en réponse aux dangers associés à l'utilisation excessive de pesticides et d'engrais chimiques, qui ont entraîné la mort de nombreux organismes bénéfiques indispensables à l'équilibre biologique et à la fertilité des sols. Du point de vue de la santé humaine, l'utilisation de pesticides chimiques nocifs a eu des répercussions majeures. Elle a favorisé l'apparition de nombreuses maladies chroniques et mortelles, notamment divers types de cancer, qui se sont récemment répandus à travers le monde (Hashem, 2015).

La recherche de nouveaux outils de lutte contre les ravageurs est motivée par un autre facteur important : l'augmentation de la résistance des populations de ravageurs aux pesticides actuellement utilisés. Il devient nécessaire de trouver des substituts à ces composés, en privilégiant des substances plus sûres. Ainsi, des alternatives aux pesticides de synthèse sont développées sous la forme de produits naturels, connus sous le nom de biopesticide (Almalah, 2015).

Les biopesticides sont des produits de matières naturelles dont la plupart sont d'origine végétale, microbienne ou animale. Ces biopesticides sont conçus pour offrir des méthodes de lutte plus durables et respectueuses de l'environnement (Almalah, 2015).

Aujourd'hui, les biopesticides représentent 5% du marché mondial des pesticides utilisés en protection des cultures avec un taux de croissance annuelle (CAGR : Compound Annual Growth Rate) de 8,64% (Olson, 2015).

Ce travail s'inscrit dans le cadre de remplacement des produits phytosanitaires de synthèses par des biopesticides phytochimiques cent pour cent naturelles.

L'expérimentation contient deux grandes parties, la première est une évaluation *invitro* de l'efficacité antimicrobienne des extraits et les huiles essentielles de *Origanum vulgare* vis-à-vis sur quatre agents phytopathogènes ; *Fusarium oxysporum*, *Alternaria alternata*, *Botrytis cinerea* et la bactérie *Clavibacter michiganensis*. La deuxième partie est une étude *invivo* du pouvoir boifongicide des extraits et les huiles essentielles de l'Origan sur folioles détachées.

Chapitre 1
Toxicité des pesticides de synthèse

I-1-Historique des pesticides

Depuis longtemps les agriculteurs protègent leurs cultures contre les organismes nuisibles pour assurer la sécurité alimentaire. Au début s'est faite une lutte d'une nature physique, malgré cela, la lutte chimique reste aussi très ancienne, citons le soufre utilisé en Grèce antique (10000 ans avant J.C). Ainsi l'arsenic (insecticide) utilisé depuis le début de notre ère, L'aconit (renonculacées) utilisé au Moyen Age (Gatignol et Etienne,2010).

La fin de XVI^e siècle est distinguée par l'utilisation de certains pesticides naturels, comme la roténone (insecticides) et la nicotine au XVII^e siècle (Calvet et Barriuso et al.2005). La deuxième moitié de XVIII^e est caractérisée par l'utilisation d'insecticides minéraux à base de cuivre d'arsenic, ainsi la lutte contre le mildiou est devenue possible grâce à la bouillie bordelaise (mélange de sulfate de cuivre et de chaux) (Anonyme, 2009).

L'eau céleste (sulfate de cuivre et d'ammoniaque) permettant la lutte contre des maladies cryptogamiques (Cavet et al, 2005).

Au cours de XIX^e siècle la protection des plantes est devenue importante, vu la croissance démographique continue et la nécessité de nourrir cette population, ainsi l'apparition des graves épidémies : le mildiou de la pomme de terre, l'oïdium de la vigne et le blackrot,etc.

Jusqu' aux années 1950, les insecticides les plus utilisés c'était des composés organochlorés, très efficaces, citons le DDD (1,1,1 trichloro,2-2bis (4, chlorophenyl ethane) synthétisé en 1874 et employé en 1939 ; hexachlorocyclohexane (HCH) synthétisé en 1825, lindane, dieldrine, aldrine et l'endrine qui sont aujourd'hui interdites à cause de leurs impacts sur l'environnement et les êtres vivants (Anonyme, 2009 ; Calvet, Barriuso et al. 2005). Les herbicides employés comme le dinitro-ortho-cresol introduit en 1932 et l'herbicide sélectif à base de l'auxine (Zimmmerman Hitchcock) en 1942. Les fongicides se distinguent par des composés à base minérale, le soufre, le cuivre. Ainsi, la bouillie de bordelaise qui a été modifiée par l'ajout d'oxyde de cuivre et l'oxychlorure de cuivre. La découverte et la synthèse de dithiocarbamate a eu lieu en 1934 et utilisé en 1950(Calvet, Barriuso et al., 2005).

I-2-Définition des pesticides

De tout temps, l'homme s'est trouvé dans l'obligation de défendre ses cultures contre les parasites, les ravageurs et les plantes concurrentes. La lutte physique a d'abord été utilisée à travers le désherbage ou le ramassage des insectes. Quelques produits étaient utilisés, mais c'est vraiment à partir de la seconde guerre mondiale qu'avec l'essor considérable de la chimie organique, la lutte chimique a pris l'importance qu'on lui connaît aujourd'hui par l'introduction des pesticides (Vigouroux-Villard, 2006 ; Charbonnel, 2003).

Le mot « **pesticide** » provient de l'association du mot anglais « pest », lequel provient du latin « pestis » (fléau, calamité), signifie animal, insecte, plante ou nuisible (virus, bactérie, champignon, ver, mollusque, insecte, rongeur, oiseau et mammifère) susceptibles d'être nuisible à l'homme et à son environnement et du suffixe « -cide » (latin -cida, du verbe latin caedo, caedere) qui signifie tuer (Cotonat, 1996 ; Couteux et Salaiün, 2009).

Les pesticides englobent les substances utilisées comme régulateurs de la croissance végétale, défolians, excitateurs, agents d'ébourgeonnement ou inhibiteurs de germination ainsi que les substances appliquées aux cultures avant ou après la récolte pour protéger le produit contre toute détérioration pendant l'entreposage et le transport (Gaouar, 2017).

Couramment appelés produits phytosanitaires, les pesticides sont donc un des moyens pour l'agriculteur de lutter contre les ravageurs et ennemis de ses cultures. Il est cependant à noter qu'une protection n'est jamais totale, elle vise plutôt à limiter les pertes (Testud et al, 2007).

I-3-composition des pesticides

Sauf cas exceptionnel, les substances actives ne sont pas utilisées à l'état pure mais elles sont « formulées », c'est-à-dire qu'elles sont présentées sous diverses formes qui permettent un emploi aisé et le plus sûr possible pour l'agriculteur tout en garantissant une bonne efficacité. Le produit commercial est donc un mélange de plusieurs composants : Il contient la substance active associée à divers co-formulants. Ces « co-formulants » ou « adjuvants » entrent dans la composition de la formulation et sont classés selon leur fonction : agent anti moussant, antigel, liant, tampon, répulsif, conservateur, agent odorant, Les formulations sont soit liquides (ex : solution dans l'eau (SL) ou concentré émulsionnable (EC), suspension concentrée (SC), solides (exemple : en poudre mouillable (WP) ou en granulés dispersibles (WS). (Tanor, 2008)

I-4-Classification des pesticides

Les différents pesticides qui se trouvent actuellement sur le marché sont caractérisés par une variation de structure chimique, de groupes fonctionnels et d'activité. Ce qui rend leur classification complexe (El Mrabet, Charelet et *al.*, 2008). Généralement, ils sont classés selon trois systèmes de classification (Calvet et *al.*, 2005).

I.4.1 Classification selon l'usage

Selon leur domaine d'utilisation, les pesticides sont séparés en deux grands groupes (Idrissi et *al.*, 2010).

I.4.1.1 Les pesticides à usage agricole ou produits phytopharmaceutiques

Ils sont utilisés, dans le but de la protection des végétaux, des bâtiments d'élevages et les salles de stockage des produits végétaux contre les maladies et les ravageurs. Aussi, ils permettent également de maintenir le sol dans un état sain. (Calvet et *al.*, 2005).

I.4.1.2 Les pesticides à usage non agricole ou les biocides

Ils sont servir :

- Au désherbage des voies de circulation routières et ferrées, les aires d'aéroport et les aires industrielle.
- A la protection des bâtiments d'habitation et l'assurance d'hygiène humaine et vétérinaire contre les vecteurs des maladies.

I.4.2. Classification selon leur cible

Selon les organismes vivants visés, les pesticides sont séparés en plusieurs catégories dont les plus utilisé sont :

I.4.2.1 Les fongicides

Un fongicide peut être défini comme un produit phytosanitaire (pesticide) dont la fonction est de contrôler, de repousser ou de détruire les champignons, potentiellement développer sur les cultures. Les fongicides aident à lutter contre les maladies cryptogamiques comme l'oïdium et le mildiou et d'autres moisissures (El bakouri, 2006).

I.4.2.2 Les insecticides

Les insecticides chimiques sont le produit de la synthèse chimique qui a la propriété de pour tuer les insectes, à court terme. Les insecticides organiques synthétiques sont des molécules Carbonates formés et distincts des pesticides inorganiques ou minéraux (Moulouel, 2008).

I.4.2.3 Les herbicides

Sont les pesticides le plus utilisés dans le monde. Ils permettent l'élimination des mauvaises herbes ou les plantes adventices des cultures en ralentissant leurs croissances. On distingue les herbicides systémiques et les herbicides de contact. Leur mode d'action sur la plante peut se manifester par l'une de ces manières : Des perturbateurs de la régulation de l'hormone " auxin " et de la photosynthèse ; Des inhibiteurs de la division cellulaire, de la synthèse des lipides, de cellulose et d'acides aminés (El Mrabet et *al.*, 2008).

En plus de ces trois principales classes (Ramade ,2005).

- Les Acaricides** : toxiques pour les acariens hématophages ou phytophage (araignées rouge).
- Les Némantocides** : contre les vers du groupe des nématodes.
- Les Rodenticides** : contre les rongeurs.
- Les Molluscicides** : contre les limaces et escargots.
- Les Corvicides et Corvifuges** : contre les corbeaux et les autres oiseaux ravageurs de culture.
- Les Algicides** : contre les algues.

I.5. Classification selon mode d'action des pesticides

I.5.1.Mode d'action des herbicides : le mode d'action est la manière générale dont un herbicide affecte une plante au niveau tissulaire ou cellulaire. Les herbicides ayant le même mode d'action auront le même schéma de translocation (mouvement) et produiront des symptômes de blessure similaires (Kumar Das et Mondal, 2014).

Les herbicides peuvent agir dans le sol au niveau des racines ou directement sur feuilles, ils possèdent différents sites d'action sur la plante (Batsch., 2011) :

- ✓ Perturbateurs de la photosynthèse ;
- ✓ Perturbateurs de la croissance : inhibition de la division cellulaire, perturbation l'élongation, inhibiteurs de la synthèse de la cellulose ;
- ✓ Inhibiteurs de la synthèse des lipides, des acides aminés et des pigments.

I.5.2. Mode d'action des insecticides : le mécanisme d'action des insecticides se fait soit directement sur les parasites cibles par digestion ou inhalation, soit indirectement dans ce cas le pesticide pénètre et diffuse dans la plante (effet systémique) (Manirakiza et al., 2003).

Les insecticides se caractérisent par deux modes d'action (Saidi-Adimi, 2018) :

- ✓ Action sur le système nerveux
- ✓ Action sur le système respiratoire.

I.5.3. Mode d'action des fongicides : peuvent agir différemment sur les plantes soit en inhibant le système respiratoire ou la division cellulaire, soit en perturbant la biosynthèse des stérols, des acides aminés, des protéines ou le métabolisme des glucides (Agnandji, 2018). Leur mode d'action, peut être observé sur un seul site appelé fongicide unisite, ou sur plusieurs cibles pour les fongicides multi-sites (Batsch, 2011).

I.6. Effet toxique des pesticides

Les pesticides sont des produits généralement toxiques pour les organismes vivants. Ils se dégradent difficilement alors qu'ils deviennent à long terme des agents toxiques après accumulation dans les organismes vivants. Cette toxicité liée à leur structure moléculaire, ne se limite pas en effet aux seules espèces que l'on souhaite éliminer. Beaucoup de pesticides ne sont pas mutagènes mais deviennent actifs après leurs transformations métaboliques (Aizel, 2004, Claver et *al.*, 2006, Calderon-segura et *al.*, 2007, Pimentel et Burgess, 2014, Matthews, 2016).

I.6.1. Effets sur la santé humaine

L'homme peut également être exposé aux pesticides, soit directement lors de l'utilisation, soit indirectement, par la présence de résidus dans les différents milieux (air, eau et sol) et dans l'alimentation (Dugeny, 2010).

L'exposition se produit, soit par inhalation, soit par contact cutané ou suit à l'ingestion d'aliments contaminés (Mari, 2018).

Les effets aigus d'une contamination, surviennent en cas d'empoisonnements accidentés ou volontaire faisant suite à une exposition à de fortes doses. Les signes de contamination témoignant la transmission de ces molécules sont bien connus, et présentent en générale des brûlures chimiques oculaires, des lésions cutanées, des manifestations digestives et respiratoires, des effets neurologiques voire des troubles hépatiques.

Les effets chroniques des pesticides en lien avec des expositions répétées prolongées à de faibles quantités de pesticides sont moins bien connus, du fait du décalage entre l'exposition et la découverte d'une anomalie qui rend délicat l'établissement de la causalité (Errami, 2012). Cependant, plusieurs études de recherches ont permis d'établir une relation entre exposition professionnelle aux pesticides et certaines maladies chez l'adulte telles que des problèmes de fertilité, de multiples cancer, des malformations prénatales ou encore des maladies neurologiques (maladie de Parkinson, autisme, etc.).

I.6.2. Effet sur l'environnement

Les produits phytosanitaires contribuent à la protection, la croissance des plantes et l'augmentation des production nationale et internationale est notable, mais cette contribution a été accompagné par des effets secondaires nocifs concernant la composition chimique de eaux de sole et de l'aire (les trois éléments essentiels de l'environnement) (Louchahi,2015). Les impacts de la pollution causé par l'utilisation irraisonnée des pesticides sont énormes, suivant les principaux impactes causé sur les éléments principaux de l'environnement :

I.6.2.1Pollution de sol

La contamination des sols par les polluants est souvent raisonnée par rapport à une cible. Mais il est important de ne pas oublier que les sols sont en soi une ressource difficilement renouvelable et la présence des polluants pesticides peut affecter leur utilisation dans une perspective de développement durable.

La manifestation du caractère polluant des pesticides est étroitement liée à leur devenir dans le sol. Outre, la toxicité propre du polluant, qui dépend de sa concentration et de la nature de la cible considérée, sa rétention par le sol et sa persistance sont les deux facteurs fondamentaux conditionnant le caractère polluant et/ou sa manifestation. La rétention d'une molécule organique par le sol est le résultat global d'un ensemble de phénomène, impliquant des interactions avec les constituants organiques et minéraux des sols. De même, la persistance est la résultante d'un ensemble de processus de dissipation, physico- chimique et biologique, qui font diminuer la concentration du polluant et du milieu (Hateb et *al.*, 2012).

I.6.2.2 Pollution de l'air

Il y a un grand nombre de pesticides présent dans l'atmosphère, Ils s'y trouvent à cause de leur épandage (de 30 à 75% des produits épandus sont transférés), le taux de transfert dépende plusieurs facteurs tels : les caractéristiques du produit (solubilité, volatilité, capacité à se dégrader), le type de sol, les pratiques agricoles, le type de pulvérisation, les conditions climatiques, (Berrah, 2011). Car les travaux de géochimistes et écologues américains ont confirmé que des pesticides peuvent polluer grandes surfaces en se déplaçant dans l'atmosphère, avant de retomber avec les intempéries ou sous forme de dépôts secs. Les eaux de pluie sont chargées de pesticides car le transfert des polluants de l'atmosphère à la pluie se fait au niveau du nuage (Berrah, 2011).

I.6.2.3 Pollution de l'eau

Une des conséquences environnementales majeures de l'agriculture intensive actuelle est la dégradation de la qualité des eaux.

Les pesticides et leurs résidus se retrouvent dans les eaux de surfaces (cours d'eau et étendus d'eau) ainsi que dans les eaux souterraines et marines (MEEM, 2015 ; Gilliom et *al.*, 2006).

La contamination par les pesticides est le plus souvent un phénomène irrégulier. Il est à noter que des pics de concentration sont fréquemment observés dans les quelques heures qui suivent les épisodes pluvieux et que la contamination des eaux de surface est d'autant plus élevée que la surface des bassins versant est faible (Schulz, 2004). Par ailleurs, dans certaines régions, une part significative de la contamination des eaux peut parfois provenir du dépôt de substances transportées par voie aérienne ou beaucoup plus fréquemment découler d'usages autres qu'agricoles, qu'il s'agisse du désherbage des infrastructures de transport ou industrielles, des parcs et jardins ou bien d'utilisation domestiques (Gerecke et *al.*, 2002).

Chapitre 2

Les biopesticides

II.1. Histoire des biopesticides

Depuis des milliers d'années, l'homme a utilisé divers produits phytosanitaires pour lutter contre les insectes et les mauvaises herbes qui endommagent ou détruisent les cultures vivrières. Avant l'invention des insecticides de synthèse au XXe siècle, la principale source de pesticides était d'origine naturelle. La première génération de pesticides était probablement dérivée de matériaux inorganiques (soufre, cuivre, mercure, arsenic etc.). Dès l'Antiquité, les Sumériens ont pour la première fois utilisée des composés de soufre pour tuer les insectes et les acariens. Le document le plus ancien sur l'utilisation de pesticides à base de plantes a été trouvé en Inde (Ignacimuthu, 2012).

Le premier pesticide biologique introduit en Europe était un Rodenticide à base de *Salmonella enterica* (Ratin) a été utilisé en Suède et dans d'autres pays européens en 1904. La découverte que les microbes causent des maladies, attribuée à Agostino Bassi, en 1835(**Figure 1**), a conduit à l'idée d'utiliser des microbes pour lutter contre les insectes nuisibles. Proposée pour la première fois par Louis Pasteur, c'est en Russie dans les années 1890 que les premiers efforts ont été faits pour utiliser des champignons contre un hanneton du blé. Un biopesticide commercialisé, basé sur la bactérie insecticide *B. thuringiensis*, a été vendu en France en 1938 (Nollet et Singh Rathore, 2015).

Les biopesticides suscitent un regain d'intérêt à mesure que la pression sur les méthodes de lutte chimique augmente. De nombreux pesticides chimiques synthétiques standards ont été retirés par les organismes de réglementation et les nouveaux produits synthétiques sont moins nombreux à apparaître sur le marché. (Nollet et Singh Rathore,2015).

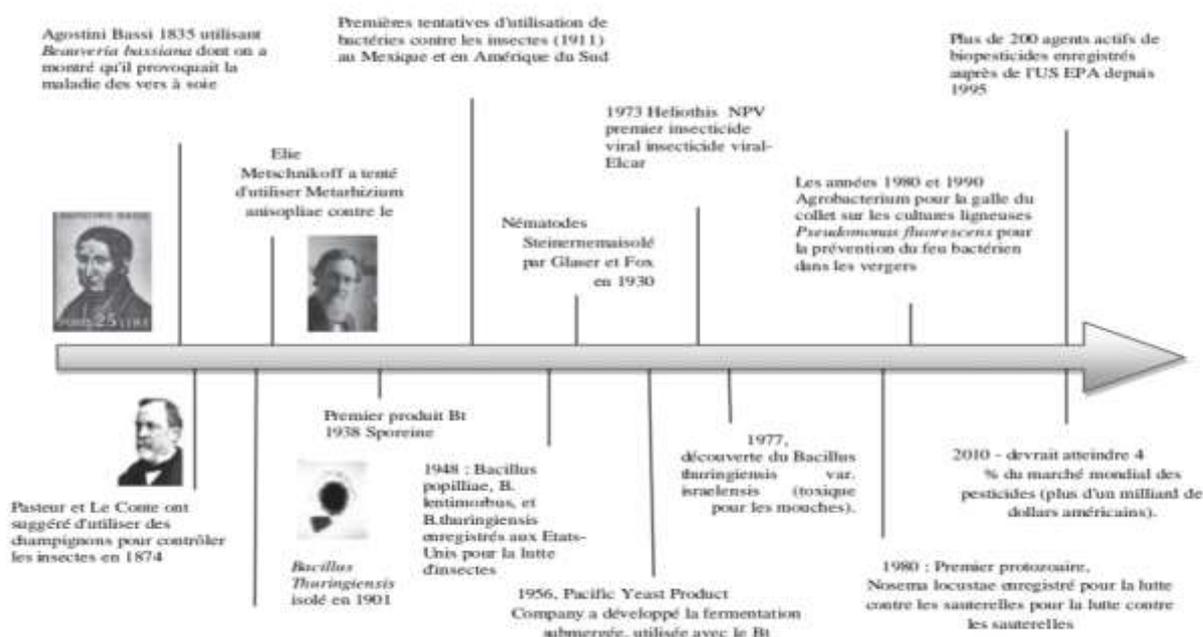


Figure 1 : Chronologie des évènements important dans le développement des biopesticides microbiens (Nollet et Singh Rathore, 2015).

II.2. Définition des biopesticides

Les biopesticides représentent généralement tout produit de protection des plantes qui n'est pas issu de la chimie (Regnault-Roger, 2005).

Le terme biopesticides définit les composés qui sont utilisés pour gérer les ravageurs agricoles au moyen d'effets biologiques spécifiques plutôt que comme des pesticides chimiques dont les effets non intentionnels sont à craindre. Les biopesticides se réfèrent à des produits contenant des agents de lutte biologique tels que les organismes naturels ou des substances dérivées de matériaux naturels, (animaux, plantes, bactéries ou certains minéraux), y compris leurs gènes ou métabolites, pour lutter contre les organismes nuisibles (Sporleder et Lacey, 2013).

D'après Charles (2008). Les biopesticides ont des modes d'action spécialisés et uniques qui les rendent plus vulnérables à bien des facteurs biologiques et environnementaux. Leur rémanence est limitée, de sorte qu'il faut parfois répéter les traitements pour obtenir l'efficacité recherché.

II.3. Classification des biopesticides

Les biopesticides peuvent être classés en trois grandes catégories, selon leur nature : les biopesticides microbiens, les biopesticides végétaux et les biopesticides animaux (Chandler et *al.*, 2011).

II.3.1. Biopesticides d'origine microbienne

II.3.1.1 Bactéries: Les biopesticides à base de *Bacillus thuringiensis* sont les plus commercialisés. Ils ont une action insecticide. *Bacillus thuringiensis* est une bactérie à Gram+ qui produit, durant sa phase stationnaire de croissance, des protéines cristallines. Ces protéines sont libérées dans l'environnement et sont actives, une fois ingérées par les ravageurs, contre les lépidoptères, les diptères et les larves de coléoptères (Rosas-Garcia, 2009). Des espèces bactériennes du genre *Bacillus* utilisant des mécanismes d'action autres que celui employé par *B. thuringiensis* peuvent également protéger les plantes. Il y a, parmi ces espèces, des souches de *Bacillus licheniformis*, *Bacillus amyloliquefaciens* ou *Bacillus subtilis*. *Bacillus amyloliquefaciens* et *B. subtilis* sont capables de coloniser les racines des plantes et de produire des molécules de nature lipopeptidique qui peuvent soit activer les défenses des plantes, soit avoir un effet antibactérien ou antifongique direct (Pérez-Garcia et *al.*, 2011).

II.3.1.2 Virus : Les Baculoviridae sont des virus à double brins d'ADN circulaire, ayant un génome compris entre 100 et 180 kb, protégés par une paroi protéique (Chen et *al.*, 2002). Ils infectent les arthropodes insectes ou larves. Ils représentent un faible risque sanitaire car aucun virus similaire n'a, à l'heure actuelle, été répertorié dans l'infection des vertébrés ou des plantes. Cette propriété les rend particulièrement intéressants pour une utilisation en qualité de bio-insecticide, d'autant plus qu'ils peuvent tuer leur hôte en quelques jours (Washburn et *al.*, 2003). Ces virus sont classés en fonction de la morphologie particulière de leur corps d'inclusion. Ainsi, on retrouve les Granulovirus, comme *Cydia pomonella granulosis*, inclus dans des granules de forme ovale ou ovoïde et les nucleopolyhedrovirus, comme *Helicoverpa zea* (HzSNPV) et *Spodoptera exigua nucleopolyhedrosis* qui sont inclus dans des polyèdres de forme arrondie, cubique ou hexagonale (Chen et *al.*, 2002).

II.3.1.3 Champignons : Différents biopesticides fongiques peuvent être utilisés pour lutter contre les maladies des plantes (causées par des champignons, des bactéries et autres nématodes), ainsi que certains insectes nuisibles et les mauvaises herbes. Les champignons sont un groupe diversifié d'organismes et peuvent être trouvés dans presque chaque type d'environnement sur Terre. La plupart ont des cycles de vie complexes, et certains sont des parasites aux eucaryotes, y compris les plantes et les insectes, ceux-ci se sont donc révélés

utiles comme biopesticides microbiens. Les bio-fongicides sont tellement diversifiés dans la nature, que leurs moyens d'affecter le ravageur cible sont tout aussi variés. Les modes d'action les plus communs sont l'exclusion compétitive (lutte pour la nourriture et l'espace), le mycoparasitisme, et la production de métabolites. Ces processus peuvent entraîner la stimulation des défenses et la croissance de la plante hôte (Wood, 1951). Plusieurs souches du champignon filamenteux du genre *Trichoderma* spp. Sont utilisées pour la protection biologique des plantes. Elles ont généralement une activité antifongique contre plusieurs pathogènes du sol ou contre des pathogènes foliaires (Dodd et al., 2003). *Trichoderma atroviride* est notamment utilisée pour la protection biologique de la vigne (Longa et al., 2009).

II.3.2 Les biopesticides d'origine végétale

Les plantes produisent des substances actives ayant des propriétés insecticides, aseptiques ou encore régulatrices de la croissance des plantes et des insectes. Le plus souvent, ces substances actives sont des métabolites secondaires qui, à l'origine, protègent les végétaux des herbivores (Jovana et al., 2014).

D'autres extraits de plantes ont des activités insecticides ; ainsi, *Tanacetum* (*Chrysanthemum cinerariaefolium*), plus communément appelé pyrèthre (**figure 2**) est une plante herbacée vivace cultivée pour ses fleurs dont une poudre insecticide est extraite. Ses principes actifs, appelés pyréthrine, attaquent le système nerveux de tous les insectes. Cependant, ces molécules naturelles sont rapidement dégradées par la lumière. Il y a sur le marché des pyréthroïdes de synthèse qui sont beaucoup plus stables que leurs homologues naturels. *Quassia amara* (**figure 3**) est un arbre d'Amérique dont est extraite la quassine, un insecticide qui a montré une faible toxicité pour l'Homme, les animaux domestiques et les insectes utiles. (Deravel et al., 2013).

Les plantes à pesticides intégrés (*Plant Incorporated-Protectants*, PIPs) sont des organismes modifiés par génie génétique, capables de produire et d'utiliser des substances pesticides afin de se protéger contre des insectes, des virus ou des champignons. Les PIPs les plus connues sont des plants de pommes de terre, maïs et coton ayant la particularité de produire la protéine Cry de *B. thuringiensis*. Pour l'agence américaine de protection de l'environnement United States, Environmental sont une catégorie de biopesticides. Les premières PIPs ont été cultivées aux États-Unis d'Amérique en 1995/1996. Les surfaces agricoles mondiales cultivées en PIPs sont passées de 11,4 millions d'hectares en 2000 à plus de 80 millions en 2005. Certains pays de l'Union européenne émettent des réticences quant à leur utilisation. En effet,

pour des raisons qualifiées d'éthique, morale et des réserves sur leur sûreté biologique, seuls 5 des 27 pays membres de l'Union européenne ont adopté leur utilisation. Ainsi, le maïs Bt (*Bacillus thuringiensis*) est couramment cultivé en Espagne, Portugal, Roumanie, Pologne et Slovaquie, alors que la lignée de maïs Bt MON810 est formellement interdite dans certains pays comme la France, l'Autriche, l'Allemagne, la Grèce, le Luxembourg et la Hongrie (Deravel et al., 2013).



Figure 2 : Insecticide poudre au pyrèthre (Rogers E et al., 2013)



Figure 3 : Extrait de l'écorce de l'arbre *Quassia amara* (Tropilab® Inc. 2015).

II.3.2.1 Les biopesticides d'origine végétale à caractère insecticides

II.3.2.1.1 Sélectivité

Les végétaux et les insectes ont suivi une coévolution parallèle mais étroitement interdépendante. Les insectes pollinisateurs favorisent la reproduction des plantes supérieures l'existence d'insectes phytophages est de toute évidence subordonnée à la présence d'espèces végétales qui constituent leur source de nourriture, même si dans certains cas, des dérivés nutritionnels ont pu être observés au cours de phénomènes d'adaptation (Streblor, 1989). Des études montrent l'existence de médiateurs chimiques impliqués dans la communication entre les organismes, des composés semi-chimiques tels que les phéromones et les molécules allélochimiques (Whittaker, 1970). Les travaux sur cette communication chimique laissent clairement apparaître que les composés sémi-chimiques sont impliqués dans des relations duales : récepteur – émetteur.

II.3.2.1.2 Spécificité

Les études de spécificité sur l'efficacité des parties aromatiques des plantes montrent qu'il existe une grande variabilité dans la sensibilité des espèces à une même huile essentielle (Shaaya et *al.*, 1991) ou à un même composé (Regnault Roger, 1999). De la même manière, nous avons observé qu'une même molécule allélochimique n'exerce pas nécessairement la même activité à différents stades du cycle de reproduction de l'insecte, c'est-à-dire que la sensibilité de l'insecte peut évoluer en fonction de ses fonctions physiologiques (Regnault Roger, 2005a). Ainsi, la sélectivité et la spécificité permettent aux molécules chimiques interstitielles végétales d'agir à des moments précis sur les espèces cibles.

II.3.2.1.3 Biodégradabilité

Autrefois appelés composés secondaires des plantes, les molécules allélochimiques végétale appartiennent au métabolisme secondaire des polyphénols, terpènes, alcaloïdes ou glucides cyanogénétiques. Ces composés se biodégradent facilement par voie enzymatique. La demi-vie des composés végétaux est particulièrement courte, allant de quelques heures à quelques jours (Isman, 2005 ; Kleeberg, 2006). A ce jour, aucun phénomène de bioamplification n'a été décrit en relation avec celui-ci.

II.3.2.1.4 Résistance

Les molécules allélochimiques végétales, en multipliant le nombre de composés utilisés en lutte phytosanitaire et ainsi, en modifiant les structures chimiques, contribuent à la diversification des cibles moléculaires et biochimiques chez les insectes. Cependant, comme les antibiotiques, un insecticide phytochimique peut générer des cas de résistance si ce composé est utilisé de façon systématique, répétée et indiscriminée. Il faut donc limiter la fréquence de diffusion et surtout changer les formulations en associant plusieurs composés de mode d'action différents ou, mieux encore, mettent en œuvre une approche intégrée qui comprend différentes méthodes de contrôle. (Regnault-Roger, 2008).

II.3.2.1.5 Biodisponibilité

Les molécules allélochimiques biosynthétisées par les végétaux sont sujettes aux facteurs environnementaux, physiologiques et génétiques qui influencent leur biodisponibilité au sein d'une espèce donnée. Toutefois, leur ubiquité dans l'ensemble du règne végétal devrait permettre de limiter cet inconvénient. Il faut cependant être attentif à ce que les développements industriels et commerciaux de nouveaux biopesticides d'origine végétal ne se réalisent

pas au détriment de la biodiversité. Pour pallier une absence éventuelle de disponibilité, un débat a été ouvert pour savoir si les formulations à base d'extraits végétaux pouvaient être enrichies de substances de synthèse ou d'hémi synthèse en tout point identiques aux molécules (Hintz, 2001 ; Descoins et *al.*, 2003).

II.3.3 Les biopesticides d'origine animale

Sont des ennemis naturels comme les prédateurs ou les parasites, ou des molécules dérivées d'animaux, souvent d'invertébrés comme les venins d'araignées, d'abeilles, de scorpions ; des hormones d'insectes, des phéromones ; etc. (Leng et *al.*, 2011 ; Deravel et *al.*, 2014). Dans la plupart des cas, les acariens, les coccinelles, les nématodes entomopathogènes, les parasitoïdes, les hétéroptères, les coléoptères, les carabidés présents dans différents agroécosystèmes sont les plus utilisés dans la lutte biologique contre les ravageurs (Sahayaraj, 2014 ; Lengai et Muthomi, 2018).

Les sémiocimiques sont des messages chimiques produits par un organisme induisant une réponse comportementale chez des organismes de même espèce ou d'espèce différente. Les substances les plus couramment utilisées sont des phéromones sexuelles d'insectes qui sont employées dans des pièges de surveillance, des systèmes de leurre et de piège mortel ou pour la perturbation de l'accouplement d'un ravageur ciblé (Deravel et *al.*, 2014 ; Lengai et Muthomi, 2018).

Les nématodes entomopathogènes sont aussi comptés comme biopesticides d'origine animale dans le contrôle des ravageurs des cultures. Dans ce groupe, ceux qui sont les plus utilisés et les plus étudiés dans la lutte des ravageurs appartiennent aux genres *Steinernematidae* Filipjev et *Heterorhabditidae* Poinar qui regroupent des espèces libérant des bactéries symbiotiques appartenant respectivement aux genres *Xenorhabdus* Thomas & Poinar et *Photorhabdus* Emend. Ces dernières s'emploient essentiellement pour lutter contre les insectes nuisibles aux végétaux présents dans les jardins, les pépinières, les plantations d'agrumes et les cultures de canneberges ou de champignons (Griffin et *al.*, 2005 ; Tabib et Kallel, 2016).

Les biopesticides d'origine animale ont un mode d'action varié passant par la prédation au parasitage ou par injection des substances toxiques causant la mort de l'insecte ravageur ou par des signaux chimiques créant la confusion chez ceux-ci ou stimulant un changement de comportement. Par exemple, la diffusion continue de phéromone de la tordeuse de la vigne désoriente les mâles et les femelles afin de brouiller le signal émis par la femelle et empêcher

l'accouplement (Leng et *al.*, 2011 ; Deravel et *al.*, 2014 ; Senthil-Nathan, 2015 ; Lengai & Muthomi, 2018 ; Hoffmann et Thiery, 2020).

Des exemples de quelques biopesticides commercialisés, appartenant aux trois différentes catégories, sont présentés dans **le tableau 1**.

Tableau N°1 : Exemples de biopesticides commercialisés (Deravel J et *al.*, 2013).

	Catégorie	Type	Organisme	Produit commercial	Cible	Culture	
Biopesticides d'origine microbienne	Bactérie	Fongicide	Bacillus subtilis QST713	Serenade®	<i>Botrytis spp.</i>	Légumes , fruits	
			Bacillus subtilis	HiStick®	<i>Fusarium, Rhizoctonia, Aspergillus</i>	Soja, arachide	
			Bacillus licheniformis SB 3086	EcoGuard®	<i>Sclerotinia spp., anthracnose</i>	Gazon	
			Bacillus amylo-liquefaciens	Taegro®	<i>Rhizoctonia</i>	Arbustes	
			Pseudomonas chlororaphis MA342	Cerall®	<i>Tilletia caries, Fusarium nivale, Septoria nodorum</i>	Blé	
		Insecticide		Bacillus thuringiensis	Rona Eco®	Chenille, larves de lépidoptères	Pelouse et jardin
				Bacillus thuringiensis	Biobit®DF	Pidoptères	Vignes, arbres fruitiers.
	Champignon	Nématicide		Paecilomyces lilacinus	BioAct® WG	<i>Meloidgyne.spp., Rodopholus.similis, Heterodera spp.</i>	Culture maraichère, bananier
		Fongicide		Trichoderma atroviride	Esquive® WG	<i>Eutipa lata</i>	Vignes
	Virus	Larvicide		Helicoverpa zea HzSNPV	Gemstar®	<i>Heliothis et Helicoverpa larvæ</i>	Maïs, coton, blé
Insecticide			Cydia pomonella granulosus virus	Carpovirusine®	<i>Carpocapse (Cydia pomonella)</i>	Pommier, poiriers	
Biop estif-		Insecticide	Acariens	Bioline®	Insectes, ravageurs	Cultures sous abris	

	Insectes	Insecticide	Coccinelle	Adalineb®	Pucerons	Cultures sous abris
	Nématodes	Anti limace	Nématodes entomopathogènes	Bioslug®	<i>Derocecas reticulatum</i> , <i>Arion dist</i>	Légumes, fraises, plantes ornementales
Biopesticides Végétaux	Extrait végétale	Insecticide	Brassica napus	VegOil®	Pucerons et acariens	Maraichage, arbres fruitiers,
		Insecticide	Azadirachta indica	TotalCare®	± 400 espèces d'insectes ravageurs	Toutes cultures
		Insecticide	Quassia amara	Quassam®	<i>Hoplocampa testudinea</i>	Pommier

II.4. Homologation des biopesticides :

II.4.1 Données et information exigées pour l'homologation des biopesticides

II.4.1.1 Identité du produit

Il est nécessaire de fournir les détails du produit, y compris le nom du produit, les ingrédients actifs et leurs concentrations, la formulation du produit. Pour l'identification d'un produit biopesticide le demandeur doit fournir les informations suivantes :

a. La matière active :

- Propriétés physiques et chimiques,
- Nom systématique et souche pour les micro-organismes,
- Nom vulgaire,
- Populations naturelles de l'organisme,
- Procédé de fabrication,
- Procédures d'examen et critères utilisés pour l'identification (morphologie, biochimie et/ ou sérologie),
- Composition des matières indésirables, description de leur nature et de leur identité et teneurs,
- Méthodes d'analyse.

b. Le produit fini :

- Propriétés physiques et chimiques,

- Quantité de matière active,
- Nom et type de la formulation,
- Nature et quantité des diluants,
- Objet et identité des matières non actives,
- Stabilité du produit et effet de la température et des conditions de stockage sur l'activité biologique,
- Méthodes d'analyse. (FAO.,1999)

II.4.1.2 Propriétés biologiques de la matière active

Les propriétés biologiques de la matière active d'un biopesticide sont liées à son mode d'action et à son interaction avec les organismes cibles. Et pour cette étape le demandeur doit fournir des informations sur certaines propriétés :

- Populations naturelles et mode de distribution du principe actif dans différentes conditions climatiques,
- Cible du ravageur et pouvoir pathogène de l'agent considéré sur ce ravageur (ou antagonisme),
- Dose infectieuse, transmissibilité et mode d'action,
- Parenté de l'agent à un agent pathogène d'un végétal ou d'une espèce vertébrée,
- Types de cultures ou de locaux à protéger,
- Mode, dose et fréquence des applications.

II.4.1.3 Données toxicologiques

Les données toxicologiques sont des informations sur les effets nocifs potentiels d'une substance sur la santé humaine ou l'environnement.

a.- Données toxicologiques primaires :

- Principe actif :
- Pouvoir pathogène/toxicité aiguë par voie orale,
- Toxicité percutanée aiguë,
- Pouvoir pathogène/toxicité aiguë par voie pulmonaire,
- Etude sur l'infection/irritation des yeux,
- Cas signalés d'allergies ou d'hypersensibilité.

- Produit fini :
- Pouvoir pathogène/ toxicité aiguë par voie orale,
- Toxicité percutanée aiguë,
- Pouvoir pathogène/ toxicité aiguë par voie pulmonaire.

b.- Données toxicologiques supplémentaires (en cas d'indications sur la production de toxines ou de signes d'infection ou de longue persistance du biopesticide) :

- Pouvoir pathogène/ toxicité subchronique (en cas de persistance inhabituelle),
- Effet sur la reproduction,
- Immunodéficience (pour les virus),
- Infectivité/pouvoir pathogène sur les primates. (FAO.,1999).

II.4.1.4 Données sur les résidus

- Toxicité pour les poissons,
- Etudes concernant les végétaux non cibles,
- Etude concernant les insectes non cibles,
- Pouvoir pathogène et toxicité par voie orale d'une dose unique pour les oiseaux,
- Pouvoir pathogène par voie respiratoire sur les oiseaux,
- Identité et moyens de mesure des toxines (pour les agents microbiens qui en sécrètent). (FAO., 1999).

II.5. Les Avantages et Inconvénients des biopesticides

II.5.1 Les Avantages :

Les biopesticides sont biodégradables et respectueux de l'environnement (Manchandred, 2019).

D'après Manchandred, (2019) les biopesticides ont de faibles résidus, et des performances et des effets élevés et moins de toxicité. Fravel (2005) a mentionné que les biopesticides sont moins nocifs pour les organismes non ciblés de la microflore endogène qui exerce une action bénéfique sur les plantes.

Pour les biopesticides bactériens ces derniers s'auto-perpétuent. Ils sont donc efficaces même pendant les saisons de croissance des cultures suivantes. (Rajamani et Negi, 2021).

Les virus ne sont pas nocifs pour les humains et les autres organismes non ciblés (Rajamani et Negi, 2021). Après l'utilisation des biopesticides, il n'y a aucun délai avant récolte n'est nécessaire (Rajamani et Negi, 2021).

Les biopesticides sont considéré comme régulateur de croissance : il agit sur les insectes comme une hormone juvénile : l'azadirachtine, la principale substance active, ingérée par la larve, empêche la mue. L'insecte reste au stade larvaire et meurt. (Natarajan et al.,2003).

II.5.2 Les Inconvénient :

Le coût des biopesticides est relativement élevé par rapport aux pesticides chimique, la production locale, selon les conditions de chaque région, peut contribuer à sa réduction coûts, ce qui le rend moins cher que les pesticides (Hashem, 2015).

Leur efficacité est lente, car ils n'éliminent pas les ravageurs aussi rapidement que les pesticides chimiques, mais ils prennent du temps, il est donc préférable d'utiliser ces pesticides à un stade précoce de l'apparition de la maladie, voire avant son apparition du tout comme une méthode préventive pour la culture, car ils sont de peu d'avantages en cas d'épidémies de ravageurs ou les maladies sont épidémiques (Hashem, 2015).

Les biopesticides sont très sensibles aux facteurs environnementaux comme les rayons ultraviolets, les températures extrêmes, humidité, etc. (Rajamani et Negi, 2021).

Chapitre 3
Les Techniques d'extraction

III.1. Définition d'extraction :

L'extraction est une étape nécessaire et présente dans de nombreux procédés de fabrication dans les différents domaines industriels relevant de la pharmacie, de la cosmétique, la parfumerie et de l'agroalimentaire. (CHEMAT ,2011).

Selon Herodez (2003), L'extraction est une opération qui consiste à séparer certains composés d'un organisme végétal selon diverses techniques.

III.2. Les différentes techniques d'extraction

III.2.1 Infusion

L'infusion est une méthode d'extraction des principes actifs ou des arômes d'un végétal par dissolution dans un liquide initialement bouillant que l'on laisse refroidir. Le solvant n'est pas nécessairement de l'eau, il peut être également une huile ou un alcool. Le terme désigne aussi les boissons préparées par cette méthode, comme les tisanes.

Dans ce cas, pour désinfecter l'eau et la plante, l'eau est généralement bouillie, puis rapidement versée sur la plante plus ou moins séchée ou fragmentée selon les cas. Mais certaines molécules seront mieux extraites et préservées à une température plus basse, utilisée en laboratoire pour analyser les composés hydrosolubles de la plante. (Marília Locatelli et *al* 2014).

Une infusion est préparée en versant de l'eau bouillante sur une quantité précise de matière végétale, en laissant reposer la mixture pendant 10-15 minutes (Sofowora, 2010).

3.2.2 Décoction

Les plantes sont versées dans l'eau froide et portées à ébullition un temps plus ou moins long, par exemple deux ou trois minutes pour les feuilles, les tiges et les fruits ; cinq minutes ou plus pour les écorces et les racines (Pierre et Lis, 2007).

3.2. 3 Macération

La macération est une infusion dans un solvant à froid. Elle est préparée en plaçant la matière végétale avec la totalité du solvant d'extraction dans un récipient fermé et en laissant reposer pendant une durée de temps. Puis, le contenu est alors filtré avant de presser le marc. Les extraits liquides ainsi obtenus sont mélangés. La préparation est clarifiée par précipitation

Ou filtration (Sofowora, 2010).

La macération peut avoir des désavantages tels que la fermentation ou la contamination bactérienne, surtout si l'eau est utilisée comme solvant. Ces problèmes peuvent causer une dégradation rapide des molécules actives, pour éviter ou minimiser ces inconvénients, il est recommandé de macérer dans un récipient couvert, à l'abri de la lumière et dans certains cas, de maintenir le mélange au réfrigérateur. (Ben Amor, 2008)

Le liquide de macération peut être de l'eau, de l'alcool ou du vinaigre. Dans le cas de la macération à l'eau, les plantes doivent être versées dans le liquide froid ou tiède pendant quelques heures. (Pierre et Lis, 2007).

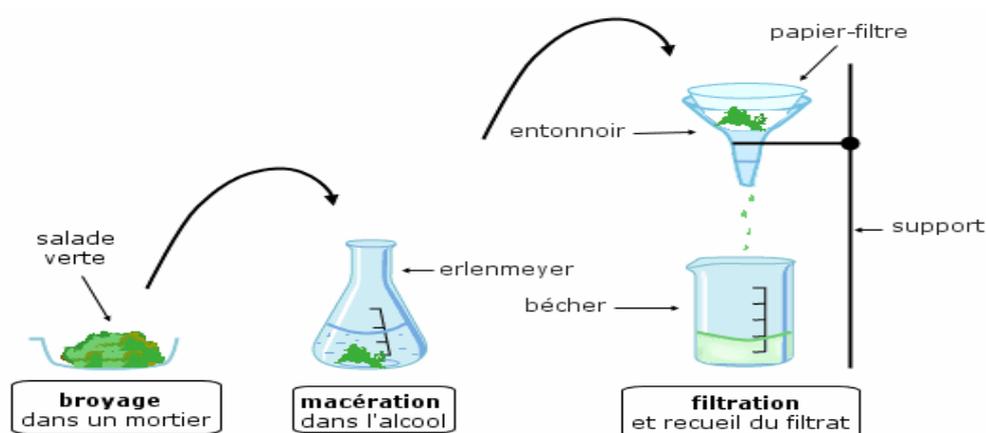


Figure 4 : représentation schématique de différentes étapes de la macération (Tahouo, 2017).

III.2.4 Extractions par Hydro distillation

L'hydrodistillation consiste à plonger la matière première dans de l'eau bouillante à pression atmosphérique. Les eaux aromatiques peuvent être cohobées ou non après la décantation. Cependant, ce procédé présente des inconvénients en raison de l'effet négatif de la vapeur d'eau ou de l'eau bouillante sur certains organes végétaux, notamment les fleurs qui sont trop fragiles. (Farhat, 2010).

L'hydrodistillation possède des limites. Le chauffage prolongé et puissant engendre une détérioration de certains végétaux et la dégradation de certaines molécules aromatiques. L'eau, l'acidité et la température peuvent induire l'hydrolyse des esters mais aussi des réarrangements, des isomérisations, des racémisations et/ou des oxydations. On comprend mieux

les variations importantes de composition que fait ressortir l'analyse de la bibliographie sur les huiles essentielles (HE). (Bruneton, 1999).



Figure 5 : Appareillage utilisé pour l'hydro distillation (original,2023).

3.2.5 L'entraînement à la vapeur d'eau :

A la différence de l'hydro distillation, cette technique ne met pas en contact direct l'eau et la matière végétale à traiter. L'entraînement à la vapeur d'eau consiste à récupérer l'huile essentielle des végétaux, en faisant passer à travers ces derniers un courant de vapeur d'eau, qui traverse la matière végétale située au-dessus d'une grille. Durant le passage de la vapeur à travers le matériel, les cellules éclatent et libèrent l'huile essentielle qui est vaporisée sous l'action de la chaleur pour former un mélange « vapeur d'eau + huile essentielle ». Le mélange est ensuite véhiculé vers le condenseur pour être liquifié, avant d'être séparée en une phase aqueuse et une phase organique : l'huile essentielle. L'absence de contact direct entre l'eau et la matière végétale évite certains phénomènes d'hydrolyse ou de dégradation pouvant nuire à la qualité de l'huile. (Guenther, 1972).

III.2.6 Extractions à chaud en continu (Soxhlet)

L'Extracteur soxhlet est un appareil de laboratoire, inventé en 1879 par Franz Von Soxhlet. Il a été initialement conçu pour l'extraction d'un lipide à partir d'un matériau solide. Typiquement, une extraction Soxhlet est utilisée lorsque le composé désiré a une solubilité limitée dans un solvant (Soxhlet et *al*, 1879).

Il permet d'avoir des opérations non surveillées et fonctionnement non géré tout en recyclant efficacement une petite quantité de solvant pour dissoudre une plus grande quantité de matériel. L'extraction Soxhlet implique un contact solide-liquide pour l'élimination d'un ou plusieurs composés d'un solide par dissolution dans une phase liquide au reflux. Dans un dispositif Soxhlet classique, la matrice solide est placée dans une cavité qui se remplit progressivement de la phase liquide d'extraction par condensation des vapeurs d'un ballon de distillation. Lorsque le liquide atteint un niveau prédéfini, un siphon ramène le contenu de la cavité dans le ballon de distillation, transportant ainsi les analytes extraits dans le liquide en vrac (Hesham H et *al* ; 2016).



Figure 6 : Appareillage utilisé pour l'extracteur Soxhlet (original, 2023).

III.2.7 Extractions par eau sub-critique

Le point critique de l'eau est $P_c = 221$ bar et $T_c = 374^\circ\text{C}$. L'eau à l'état sub-critique est une eau surchauffée ou encore une eau chaude pressurisée, généralement à une température inférieure à 250°C et une pression inférieure à 100 bar. Ainsi, dans ces conditions, l'eau est liquide mais certaines de ses propriétés physico-chimiques sont modifiées. En effet, à l'état sub-critique, les molécules d'eau sont plus "libres" les unes par rapport aux autres et sont donc plus "disponibles" pour réagir avec d'autres substances. Il est donc plus facile de solubiliser certaines molécules dans l'eau à l'état sub-critique que dans l'eau en conditions standards. Les premiers intérêts pour l'eau sub-critique comme solvant présentant des qualités environnementales, datent des années 70 avec les crises pétrolières de cette époque. (Brunner et al, 2009).

Généralement, l'extraction des produits naturels par eau sub-critique a été utilisée à l'échelle laboratoire. Actuellement, des développements de pilotes à plus grande échelle sont réalisés. (Chemat, 2011).

Naturellement, l'eau apparaît comme le solvant le plus vert, elle présente des avantages certains puisque qu'elle est non toxique, non inflammable et inoffensive pour la santé. L'intérêt principal de l'utilisation de l'eau sub-critique réside dans les variations importantes de ses propriétés physico-chimiques (F. Mancini, 2006).

III.2.8 Extractions au CO₂ supercritique

L'originalité de cette technique d'extraction réside dans le type de solvant employé ; le CO₂ supercritique. Au-delà du point critique ($P = 73,8$ bars et $T = 31,1^\circ\text{C}$), le CO₂ possède des propriétés intermédiaires entre celles des liquides et celles des gaz ce qui lui confère un bon pouvoir d'extraction. Cette technique présente énormément d'avantages. Toute d'abord le CO₂ supercritique est un solvant idéal puisqu'il est naturel, inerte chimiquement, inflammable, non toxique, sélectif, aisément disponible et peu coûteux. De plus, il s'élimine facilement de l'extrait sans laisser de résidus. Outre ces avantages, le principal point fort est la qualité irréprochable de l'extrait puisqu'aucun réarrangement ne s'opère lors du processus. Son unique point faible est le coût très élevé de son installation (Pellerin, 1991).

En ajustant les conditions de température et de pression, il est possible d'obtenir des extraits sélectifs en composés odorants, similaires aux huiles essentielles, sans molécules non volatiles. Selon Richard (1992), la température et la pression optimale pour extraire uniquement les principes volatils sont de 50°C et 60 bars.

Cette méthode est considérée comme la plus prometteuse car elle permet d'obtenir des extraits volatils de haute qualité qui préservent l'essence originelle de plante. (Wenqiang et al, 2007).

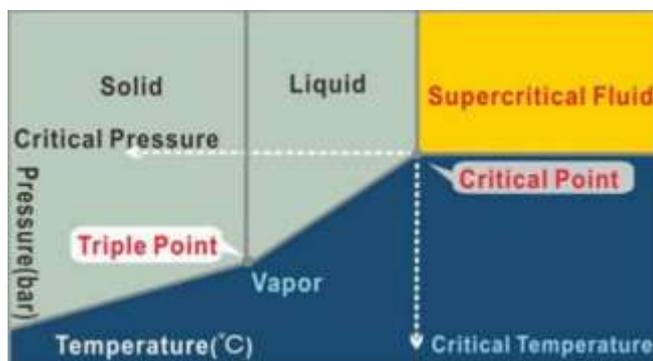


Figure 7 : Diagramme d'extraction au co2 supercritique (Bourgou et al 2018).

III.2.9 Extractions assistée par micro-ondes

C'est une technique récente développée dans le but d'extraire des produits naturels comparables aux les huile essentielles (HEs) et aux extraits aromatiques. Dans cette méthode, la plante est chauffée par un rayonnement micro-ondes dans une enceinte dont la pression est réduite de façon séquentielle : les molécules volatiles sont entraînées dans le mélange azéotrope formé avec la vapeur d'eau propre à la plante traitée. Ce chauffage, en vaporisant l'eau contenue dans les glandes oléifères, crée à l'intérieur de ces dernières une pression qui brise les parois végétales et libère ainsi le contenu en huile (Marrouf, 2009).

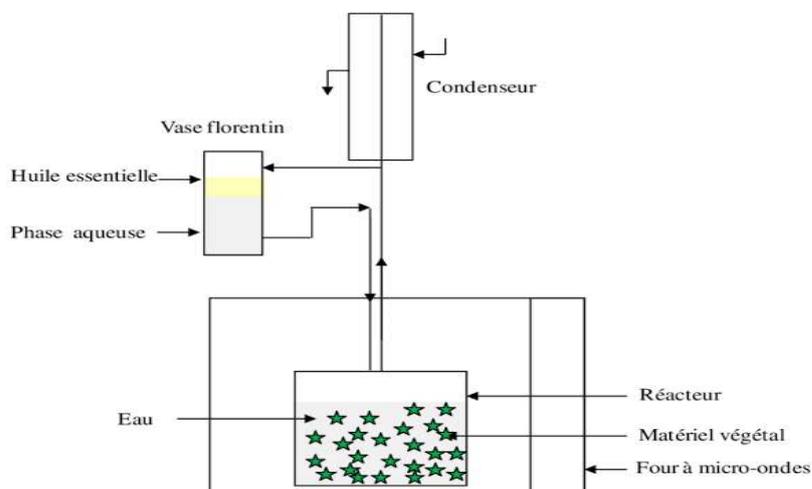


Figure 8 : représentation schématique de l'extraction assistée par micro-ondes (Duval, 2012)

Partie expérimentale

I.1. Objectif de l'étude

L'objectif de ce travail est l'évaluation du pouvoir biopesticides des huiles essentielles et des extraits aqueux d'*Origanum vulgare*. *In vitro* contre quelques agents phytopathogènes ; *Alternaria alternata*, *Fusarium oxysporum* et *Botrytis cinerea*. Et une bactérie phytopathogène *Clavibacter michiganensis*.

Les différentes analyses en rapport avec l'objectif de cette étude ont été effectuées au niveau du laboratoire pédagogique de biochimie et de microbiologie de la faculté des sciences de la nature et de la vie l'université de Abdelhamid Ibn Badis Mostaganem (ex-ITA).

I.2. Matériel Végétal

L'espèce végétale que nous avons utilisée dans cette étude est l'*Origanum vulgare* communément appelé « zaatar ». Récolté de la région d'Oued El Kheir Mostaganem.

La plante hôte utilisée pour effectuer des tests *in vivo* est *Vitis Vinifera* collecté directement du site l'université de Abdelhamid Ibn Badis Mostaganem (ex-ITA).



Figure 9 :feuilles de *Vitis Vinifera* utilisée

I.2.1 Description de l'espèce *Origanum vulgare*

L'origan est une herbacée vivace de 30 à 60 cm de hauteur, au feuillage et aux fleurs très odorants quand on les froisse. Elle est ainsi reconnaissable à son odeur et à sa saveur phénolée, épicée et chaude (Teuscher et *al.*, 2004). Les tiges dressées, souvent rougeâtres et velues, portent les feuilles ovales opposées et espacées. Celles-ci possèdent des glandes sécrétrices sessiles non apparentes. Les fleurs blanches ou rose sont groupées en inflorescences. Chaque fleur est située à l'aisselle d'une bractée ovale, et dépassant le calice. La corolle, plus

grande que le calice, est quant à elle bilabée à tube saillant à la base et gamopétale. Le fruit est constitué d'akènes. La floraison se prolonge de Mai à Octobre (Teuscher et *al.*, 2004 ; Figueredo, 2007).

I.3. Techniques d'Extraction

I.3.1 Extraction de l'huile essentielle

Le processus d'hydro distillation implique l'utilisation d'une cocotte-minute en inox de 15 L de capacité, 25 cm de diamètre et 22 cm de hauteur. Cette cocotte peut contenir 500 g de matériel végétal et deux litres d'eau, placée sur une plaque chauffante. Le dispositif est relié à un condenseur, constitué d'un serpentín plongé dans un bac de refroidissement où circule de l'eau fraîche. Après 120 minutes, les vapeurs chargées d'huile essentielle traversent le tube (condenseur) et se condensent avant de chuter dans une ampoule à décanter. Après décantation, deux phases distinctes sont obtenues : l'huile essentielle et l'eau florale.



Figure 10 : Extraction par entraînement à la vapeur (original. 2023).

I.3.2 Préparation des extraits aqueux :

Pour la préparation des extraits aqueux, nous avons choisi l'extraction par eau sub-critique. Il s'agit d'une technique d'extraction écologique, dont on augmente la température et la pression au-dessous du point critique. Dans trois flacons, Cinq gramme l'Origan sont additionnée à 50 ml d'eau distillée stérile. En suite, on augmente la pression et la température à 120°C pendant 8 min, 18 min et 28 min. Le mélange est filtré juste après cette étape et les extraits sont conservés à l'obscurité et à 4°C.

I.4. Isolement des agents phytopathogènes

L'isolement du champignon *Alternaria alternata*, *Botrytis cinerea* a été effectué à partir d'un fruit de tomate malade acheté du marché local. Des fragments entourant la lésion et la pourriture ont été prélevés soigneusement et réduits en petit morceaux, ces derniers ont désinfecté par l'eau de Javel 2%, ensuite rincés avant d'être ensemencés dans des boîtes de Pétri contenant le milieu de culture PDA (Potato dextrose agar), puis incubés à 25°C pendant 6 jours.



Figure 11 : Fruit d'une tomate avec des symptômes montrant qu'il agit d'une contamination mixte (original. 2023).

I.5. Purification des souches

Avant de procéder à l'identification, les souches sont d'abord purifiées et isolées en utilisant une série de transferts aseptiques dans un milieu stérile frais, afin de maintenir la culture pure (Botton et al., 1990). Cette étape facilite l'identification des champignons. Une fois que les colonies sont bien différenciées, le transfert des champignons est effectué en prélevant un fragment du mycélium situé sur le bord de la colonie à l'aide d'une anse de platine stérile, puis en le déposant au centre d'une nouvelle boîte de Pétri contenant le même milieu de culture. Les cultures sont ensuite incubées dans les mêmes conditions que précédemment (Bourgeois et Leveau, 1980).

I.6. Identification des isolats

Identification macroscopique : Pour identifier le champignon à l'œil nu, il est crucial d'examiner l'aspect des colonies, qui constitue un critère essentiel d'identification. La couleur des colonies est également un élément clé pour cette identification.

Identification microscopique : il est nécessaire de réaliser un examen microscopique après avoir étalé la colonie entre une lame et une lamelle. L'observation du thalle et des spores est essentielle pour parvenir à l'identification.

I.7. Isolement de souche bactérienne

L'isolement d'une bactérie est réalisé à partir d'un tubercule de pomme de terre pourrie. Avant de procéder au prélèvement d'un explant, l'épiderme de l'échantillon est bien nettoyé puis désinfecté par une solution d'eau de Javel diluée à 2%. En suite un petit morceau est prélevé de l'intérieur du tubercule et transféré directement dans un tube contenant 5 ml de bouillon nutritif. Le procédé est répété deux fois et les deux tubes sont incubés à 37°C. A prés 24h d'incubation, des aliquotes de quelques microlitres sont prélevées et ensemencer directement dans des boites de Pétri contenant la gélose nutritive (GN). Les boites sont incubées 37°C.

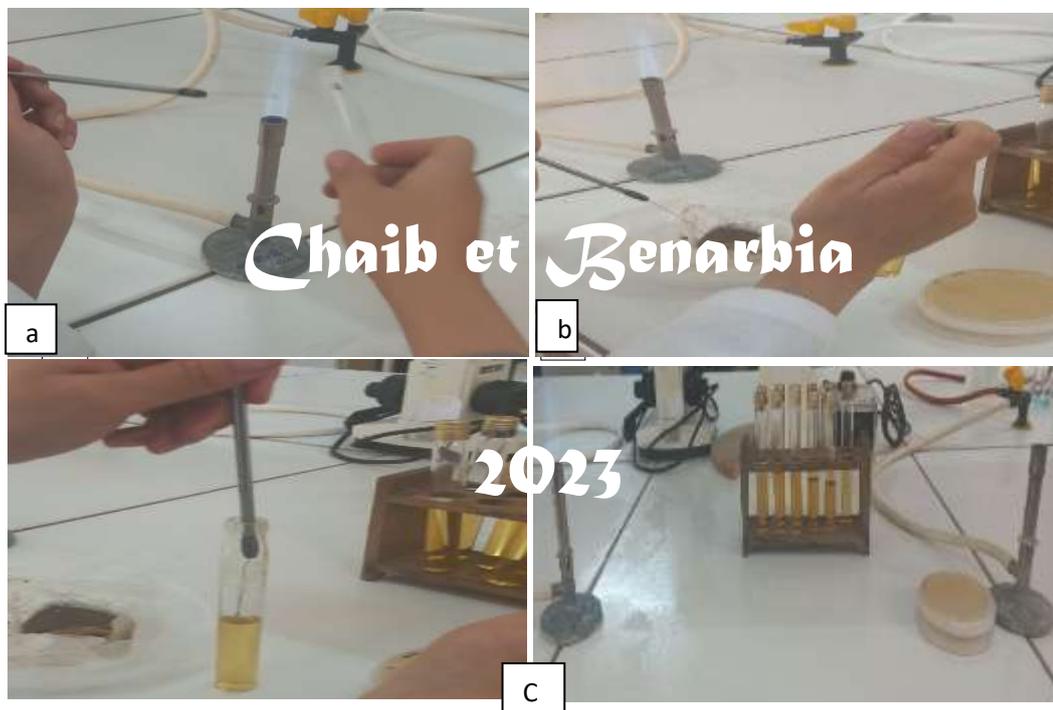


Figure 12 :Les différentes étapes de l'isolement de la bactérie(a : désinfection de l'anse par flambage ; b : Prélèvement d'un explant ; c : ensemencement dans le bouillon nutritif).

I.8. Identification de souche bactérienne

L'identification de la bactérie isolée est basée sur la détermination des caractères morphologique et quelques tests biochimiques.

Aspects macroscopiques : l'analyse macroscopique comprend les caractéristiques suivantes : la forme des colonies (rondes, irrégulières, etc.), la taille des colonies mesurée par leur diamètre, la couleur de la colonie, l'élévation de la colonie (convexe, plate), l'opacité de la colonie (opaque ou transparente) et la surface de la colonie (lisse, sèche, etc.).

Aspects microscopique : l'identification microscopique est basée essentiellement sur l'aspect des bactéries bacilles, cocci ou coccobacilles et bien évidemment la coloration de Gram. Premièrement on commence par la réalisation d'un frottis qu'on fixe sur la lame par flambage au-dessus d'une flamme bleue d'un bec Bensen. Pour la coloration on commence par l'application de quelques gouttes de violet de Gentiane sur le frottis et laisser réagir pendant deux minutes, suivi par un rinçage avec de l'eau. Puis recouvrir la lame d'une solution de lugol et laisser agir pendant deux minutes aussi. On procède à l'élimination de l'excès de lugol puis un rinçage à l'eau pour la deuxième fois. La quatrième étape est une étape de décoloration en faisant couler de l'alcool sur la lame jusqu'à ce que la couleur violette disparaisse complètement (5 à 10 secondes) et puis rincer à l'eau. Enfin, on ajout quelques gouttes de fuchsine, après deux minutes, suivi d'un rinçage la lame est prête pour une observation microscopique, dont les bactéries Gram-positives apparaissent en violet foncé et les Gram-négatives en rose.

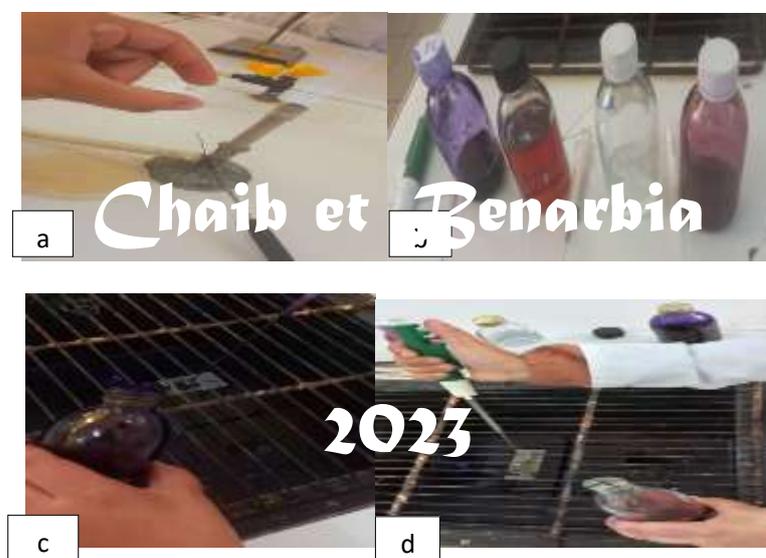


Figure 13 : les différentes étapes de la Coloration de Gram (a : fixation de l'échantillon à la chaleur, b : Les colorants (violet, lugol, alcool, fuchsine), c, d : l'ajout des colorants).

I.9. Evaluation de l'activité antifongique d'huiles essentielles (HE) *in vitro*

Pour les huiles essentielles, nous avons deux produits ; HE1 extrait par la technique d'entraînement à la vapeur d'eau la fin du mois d'avril et le deuxième HE2 est un produit fourni par notre directrice de Mémoire Dr BENOURAD, le produit est extrait et conservé à l'obscurité et à une température de 4°C depuis Mai 2013.

Pour préparer deux concentrations en huiles essentielles ; 1µl/ml et 2 µl/ml nous additionnons aux flacons contenant 200 ml de PDA stérile des volumes de 20 µl et 40µl respectivement, en suite il faut bien pour assurer une répartition homogène de l'huile essentielle dans le milieu de culture. Dix millilitres de chaque flacon sont transférés dans des boîtes Pétri, à l'aide d'un pipete pasteur stérile, un fragment 0,5 cm de diamètre d'une culture fongique âgée de 10 est déposé au centre de chaque boîte. Les boîtes de Pétri sont ensuite fermées hermétiquement par le parafilm et incubées à 25°C pendant 7 jours. Trois répétitions sont réalisées de la même manière.



Figure 14 : préparation des boîtes contenant le milieu de culture additionné aux deux doses d'huiles essentielles HE1 et HE2.

I.10. Evaluation de l'activité antifongique des extraits aqueux *in vitro*

Pour les extraits aqueux le mélange se fait extemporanément, dont on mélange 1ml et 0,5 ml de chaque extrait avec 9 ml et 9.5 ml de milieu de culture PDA, pour préparer deux doses pour chaque extrait ; 10% (v : v) et 5%(v : v) respectivement, l'homogénéisation est assurée par un mouvement en infini. Après solidification, chaque boîte est inoculée avec un disque de 0,5 cm prélevé d'une culture âgée de plus de 10 jours. Trois répétitions sont effectuées pour chaque concentration. Les boîtes sont incubées à 25°C.



Figure 15 : préparation des boîtes contenant le milieu de culture additionné aux différentes doses d'extraits

I.11. Evaluation de l'activité antibactérienne d'huiles essentielles et des extraits aqueux :

A partir de la suspension mère de la culture bactérienne, on réalise une série de dilution décimales de 10^{-1} jusqu'à 10^{-4} afin de diminuer la charge microbienne de la suspension. Des boîtes Pétri sont préparées auparavant de la même manière décrit au-dessus dans le test antifongique. Un microlitre de la suspension diluée à 10^{-4} estensemencé par la technique d'étalement totale de la surface des boîtes Pétri. Trois répétitions sont réalisées pour chaque dose de l'extrait, les boîtes sont incubées pendant 24h à 37°C .



Figure 16 : Préparation des dilutions de la culture bactérienne

I.12. Test *in-vivo* :

Ce test est réalisé sur les folioles détachées de la vigne (*Vitis Vinifera*) déposées face intérieure sur du papier absorbant humidifié dans des boîtes de Pétri. Ceci pour chaque concentration des extraits aqueux et la plus faible concentration en huiles essentielles appliquée dans la partie *in vitro* de ce travail. Un très faible volume de chaque extrait est appliqué par pulvérisation sur les feuilles de vigne 24h avant l'inoculation des explants de *Botrytis cinerea* au milieu de chaque feuille. Le suivi de l'apparition ou l'absence des lésions est assuré pendant cinq jours.



Figure 17 : Les étapes de Test *in-vivo* de l'efficacité antifongique des extraits et l'huile essentielle de l'origan appliqués préventivement sur feuilles détachées

Résultats et discussion

Résultats

II. Aspect macroscopique et microscopique des souches isolées

II.1.1 La Souche bactérienne *Clavibactermichiganensis*

- **Identification macroscopique**

Au bout de 48 heures d'incubation, des colonies bactériennes apparaissent sur la gélose nutritive. Leurs formes sont circulaires, d'un aspect plat, de couleur blanche crémeuse et de taille variable.

- **Identification microscopique**

L'examen microscopique montre des bactéries cocci de très faible taille et de couleur violette(**figure18**), ce qui confirme qu'il s'agit d'une bactérie gram positive.

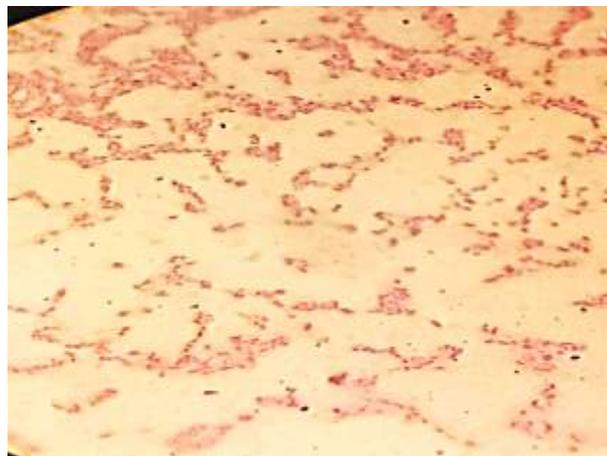


Figure 18 :aspect microscopique de la souche bactérienne isolée *Clavibactermichiganensis* (grossissement x40).

II.1.2 Identification des isolats fongiques

- **Identification macroscopique et microscopique**

Alternaria alternata

Après trois jours d'incubation le mycélien développé est de couleur verdâtre qui vire rapidement en vert foncée, Sous l'aspect microscopique à un grossissement x 100 es hyphes sont septés. (**Figure 19**).

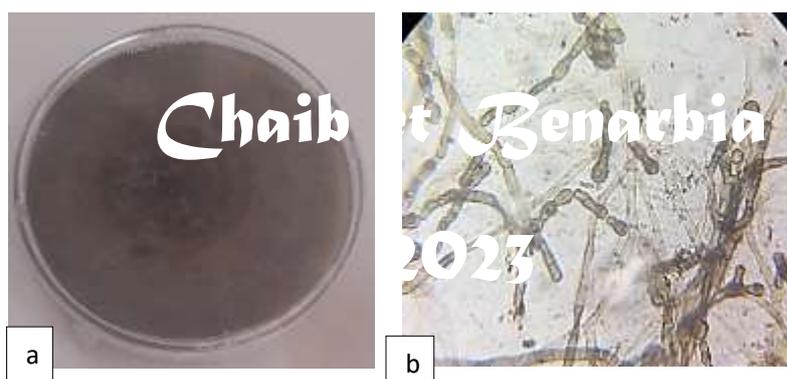


Figure 19 : aspects macroscopique (a) et microscopique (b) d'*Alternaria alternata* au microscope

G x 40.

***Fusarium oxysporum* :**

L'isolat développé sur milieu PDA présente un mycélium de couleur blanc. L'observation microscopique montre des micro et macrospores (**figure 20**).

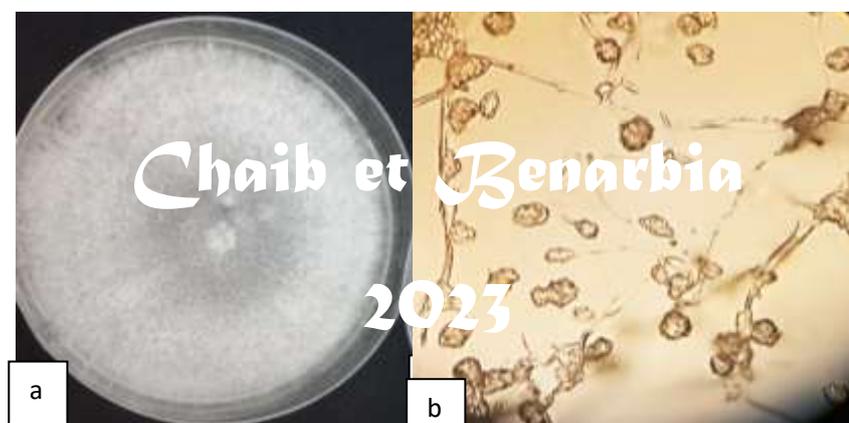


Figure 20 :(a) aspects macroscopique (b) et microscopique de *Fusarium oxysporum*.

***Botrytis cinerea* :**

Les colonies apparues sont de couleur brunâtre, après une semaine d'incubation des sclérotes ont été produits sur la bordure des boîtes de Pétri. L'aspect microscopique montre des conidiophores dressés grisâtres avec des ramifications à leur sommet (**figure 21**).

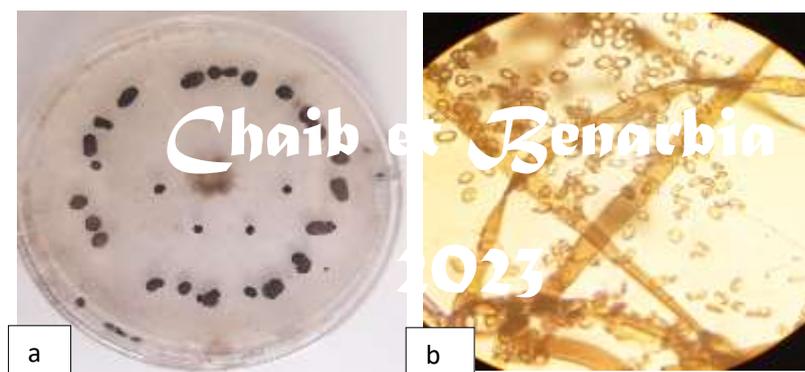


Figure 21 : (a) ; colonie *Botrytis cinerea* en boîte Pétri ; (b) : Observation microscopique de *Botrytis cinerea* G x 100.

II.2. Activité antifongique des huiles essentielles et des extraits aqueux

II.2.1 Effet d'huiles essentielle sur la croissance mycélienne

D'après les résultats obtenus, une efficacité totale est enregistrée pour l'ensemble des souches étudiées ; *Alternaria alternata*, *Fusarium oxysporum*, *Botrytis cinerea*. Ceci pour les deux doses de l'huile essentielle appliquées (**figure 22**).

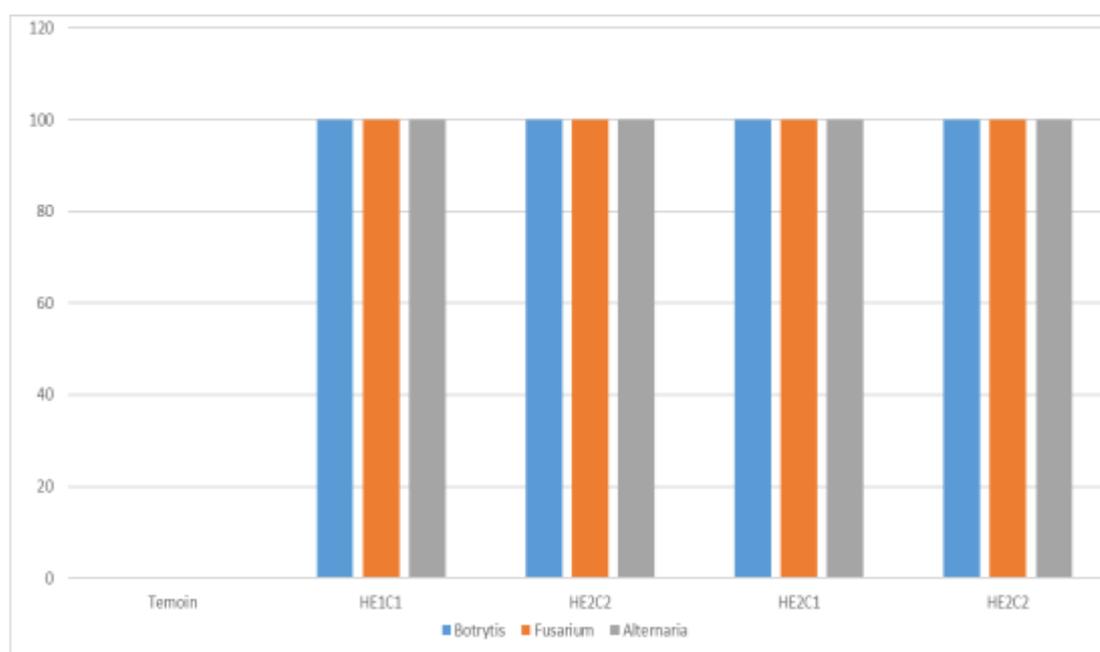


Figure 22 : taux des inhibition d'huiles essentielles sur la croissance mycélienne des trois souches fongiques.



Figure 23 : Effet d'huiles essentielles sur *Alternaria alternata*



Figure 24 : Effet d'huiles essentielles sur *Fusarium oxysporum*



Figure 25 : Effet d'huiles essentielles sur *Botrytis cinerea*

II.2.2. Effet des extraits aqueux sur la croissance mycélienne

- La (figure 26) illustre les valeurs de la vitesse de croissance mycélienne de l'isolat *Alternaria alternata* sous l'effet des différentes doses des extraits. Les résultats obtenus présentent une faible activité inhibitrice de la croissance mycélienne en comparaison avec le témoin.

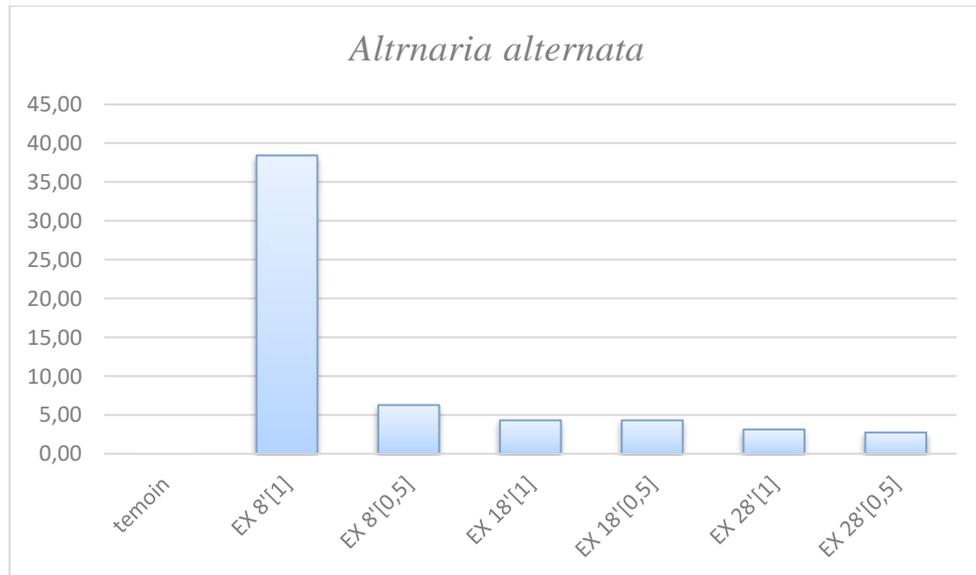


Figure 26 : Effet des extraits aqueux sur la croissance mycélienne

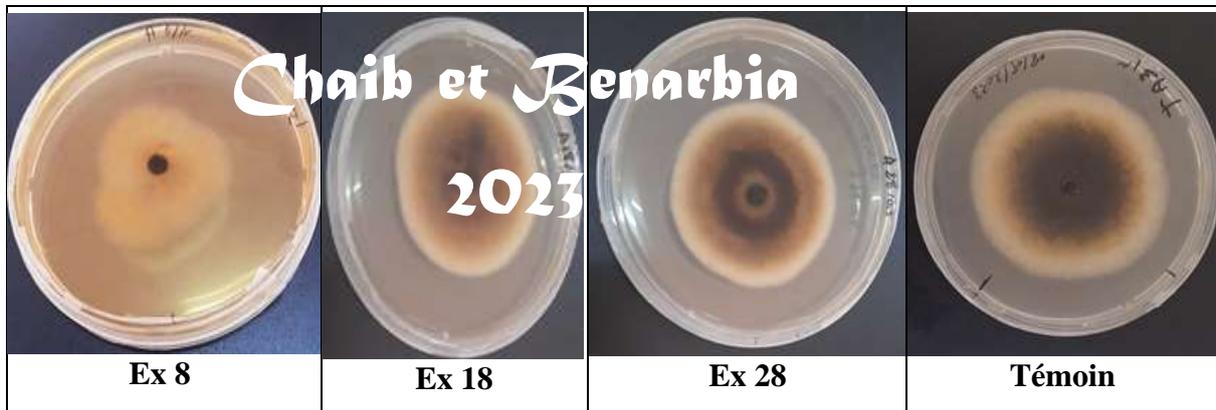


Figure 27 : Effet des extraits aqueux sur la croissance mycélienne de la souche *Alternaria alternata*.

Les résultats de l'évaluation de taux d'inhibition de la croissance mycélienne de la souche *Fusarium oxysporum* sont représentés par la (figure 28). L'analyse de ces dernières montres que l'extrait Ex28 n'a aucune efficacité.

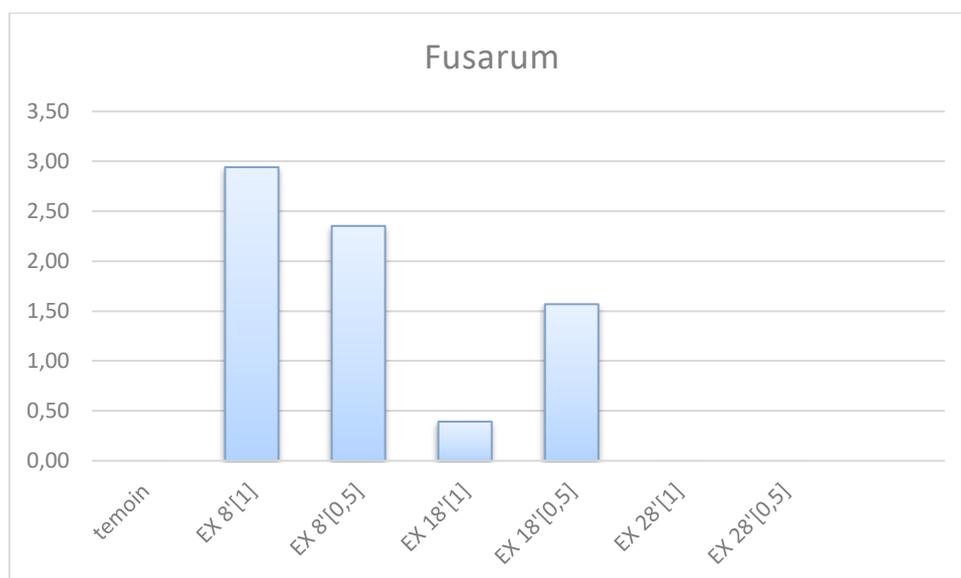


Figure 28 : Taux d'inhibition de la croissance mycélienne de *Fusarium oxysporum* sous l'effet des différentes concentrations des extraits aqueux d'*Origanum vulgare*.

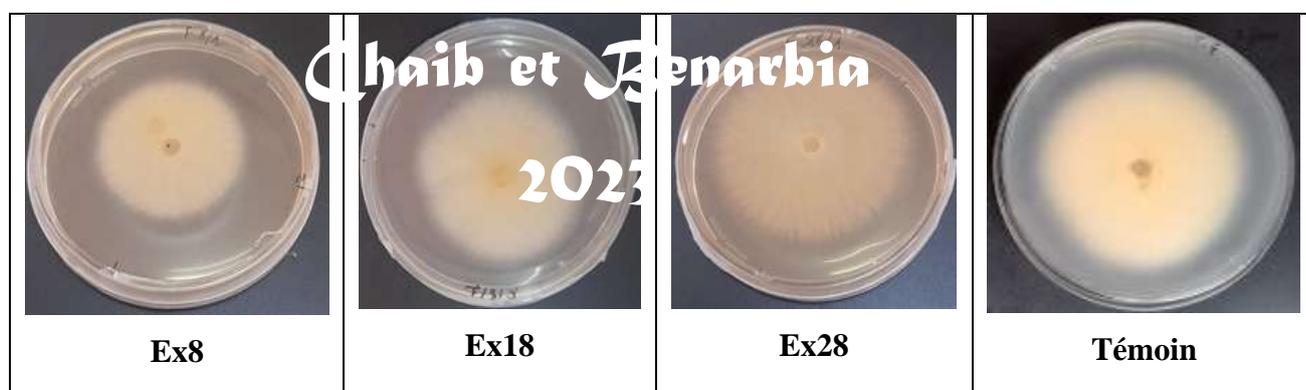


Figure 29 : l'effet de l'extrait aqueux sur la croissance mycélienne de *Fusarium oxysporum*.

La figure 30 montre l'effet des différentes concentrations des extraits sur l'isolat de *Botrytis cinerea*. Nous avons remarqué que le taux d'inhibition devient plus important lorsque la concentration diminue.

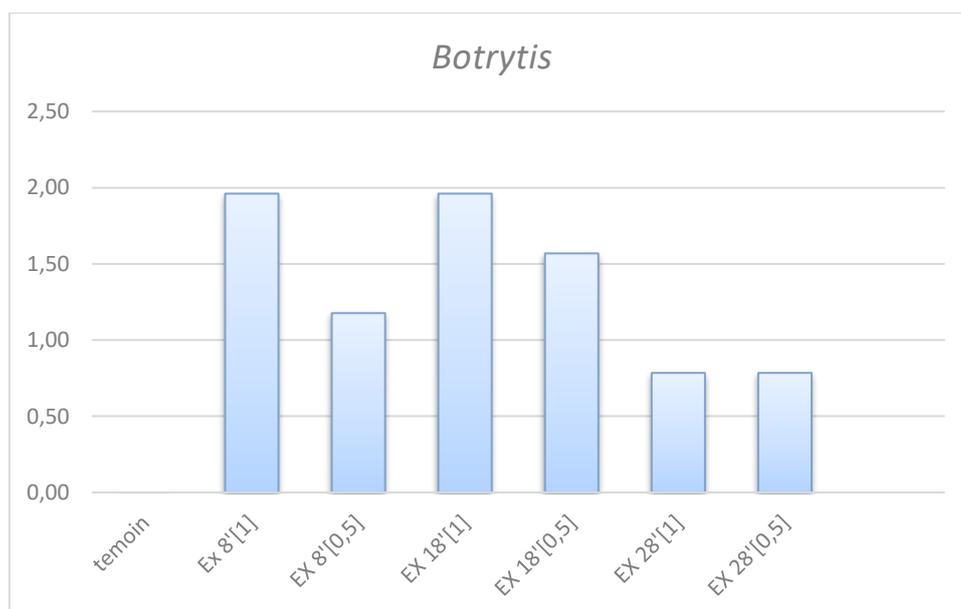


Figure 30 : Taux d'inhibition de la croissance mycélienne de *Botrytis cinerea* sous l'effet des différentes concentrations de l'extrait aqueux



Figure 31 : l'effet de l'extrait aqueux sur la croissance mycélienne de *Botrytis cinerea*.

II.4. Activité antibactérienne :

II.4.1. Effet des extraits aqueux et l'huiles essentielles d'origan sur *Clavibacter michiganensis*

L'analyse de résultats de cette activité montre que les huiles essentielles et l'extrait aqueux provoque une inhibition totale de la croissance (**figure**). Sauf l'extrait Ex8' [0,5] une croissance importante de la bactérie est observée, dont le nombre de colonies est indénombrable (> 300 colonie).

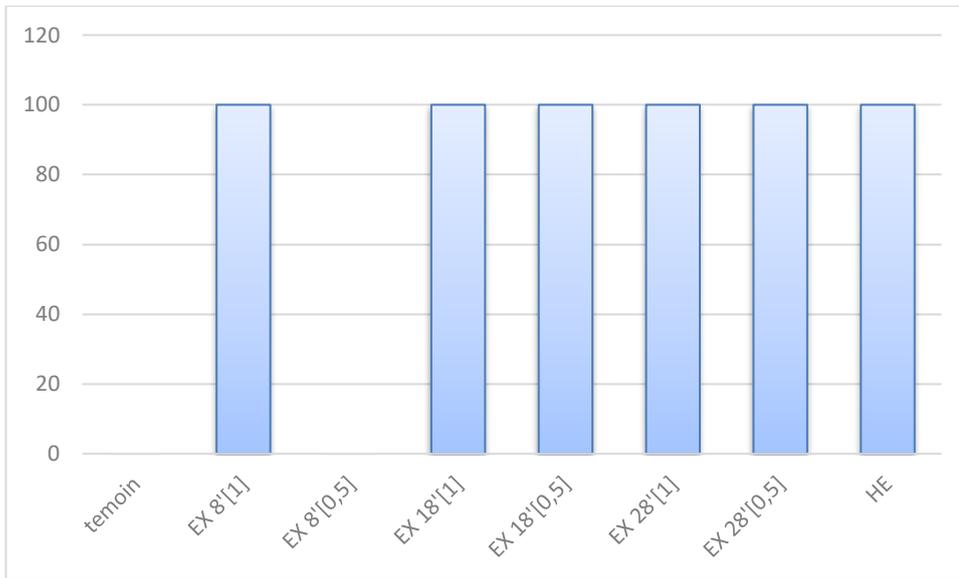


Figure 32: Effet des extraits aqueux et l’huiles essentielles d’origan sur *Clavibacter michiganensis* a différentes concentrations.



Figure 33 : Effet des extraits aqueux et l’huiles essentielles d’origan sur *Clavibacter Michiganensisa* différentes concentrations.

II.5. Test *in-vivo* :

Les symptômes apparaissent sur feuilles ; d’abord chez le témoin quelques heures après l’inoculation, sous forme de petites nécroses de quelques millimètres de diamètre, de couleur brun foncé. Les mêmes symptômes apparus à partir du troisième jour chez les folioles traitées.

Le résultat qui obtenus sont montrés dans (le figure 34),



Figure 34 :Les symptômes de *Botrytis cinerea* sur les feuilles de la vigne

Discussion

L'étude l'effet des extraits et l'huile essentielle de l'origan sur de la croissance mycélienne des souches fongiques testés (*Alternaria alternata*, *Fusarium oxysporum*, *Botrytis cinerea* et la bactérie *Clavibacter michiganensis* variée selon la méthode d'extraction choisie et la dose appliquée.

On constate qu'il y a une relation proportionnelle entre la croissance mycélienne de *Botrytis cinerea* et la dose d'extrait utilisée, plus la dose des extraits augmentent la croissance mycélienne diminue.

Un résultat insuffisant est enregistré pour l'ensemble des extraits aqueux d'origan, particulièrement l'extrait de 28 minutes. En revanche, l'huile essentielle à inhibé totalement la croissance des trois souches fongiques testées.

Nous en concluons que les paramètres extractifs influents directement sur le pouvoir antimicrobiens des extraits, plus la durée d'extraction est longue l'efficacité diminuée, ceci due à la thermosensibilité de quelques molécules bioactives.

Le pouvoir antibactérien des extraits vis-à-vis de *Clavibacter* a été évalué par la méthode de diffusion sur milieu PDA. Les résultats ont montré que l'huile essentielle exerce une action antibactérienne totale. Par contre l'effet des extraits aqueux augmente à fur et à mesure que la concentration augmente, sauf l'extrait de 8 minutes dont la faible concentration n'a aucun effet. Alors que, avec la dose doublée l'inhibition totale est enregistrée. Ce résultat concorde avec celui de Shimoni et *al.* (1993) qui ont démontré que des huiles d'origan présentaient l'activité antifongique la plus élevée contre les champignons pathogènes foliaires et telluriques.

D'après l'étude de Debbab (2017), montrent que les extraits hydro-alcooliques d'origan ont une efficacité antifongique sur la croissance mycélienne, tandis que les extraits aqueux de même plante ne donnent pas des résultats satisfaisants.

Ces résultats sont en accord avec les travaux de Chabane (2020), dont les extraits aqueux d'origan pur et dilué n'ont qu'un effet très limité vis-à-vis des souches fongiques phytopathogènes.

Soylu et *al.* (2010) a testé l'effet de l'huile essentielles de *d'origanum vulgare*, *Romarin officinalis* et de *Lavandula angustifolia* vis-à-vis *Botrytis cinerea*. Les huiles essentielles

d'origan ont présenté une inhibition très importante (élevées) à une concentration de 12,8 µg/ml.

In vivo, les résultats obtenus montrent que l'extrait aqueux de 8 minutes (Ex8) a donné des résultats assez acceptables par rapport les autres extraits aqueux de 18 et 28 minutes. Les lésions sont apparues chez le témoin quelques heures après l'inoculation, par contre chez les lots traités le processus a pris plus de temps. Après cinq jours des résultats variables sont enregistrés pour les différents traitements, sauf les feuilles traitées par l'extrait aqueux de 8min dont quelques taches sont apparues, ces derniers sont les résultats de l'état de stress

Provoqué artificiellement pour accélérer la pénétration des hyphes fongiques à travers la blessure.

Les lésions sont de couleur brune, une forme circulaire au départ puis des contours irréguliers suivant le profil des nervures des feuilles. Ces mêmes symptômes ont été décrits par Rami (2006) sur des feuilles détachées de vigne inoculées avec des isolats de *Botrytis cinerea*.

Conclusion

Conclusion

L'usage des produits chimiques tels que les fongicides, bactéricide et d'autres pesticides de synthèse sont très toxiques pour la santé humaine et l'environnement, notre étude qui synthétise un ensemble des expériences sur l'effet des extraits végétaux offre la possibilité de mettre au point de nouveaux moyens de lutte contre des maladies cryptogamiques et bactériennes.

Dans ce contexte, notre étude porte sur l'évaluation *in vitro* et *in vivo* de l'activité antifongique des huiles essentielles et des extraits aqueux, sur des souches fongiques *Alternaria alternata*, *Fusarium oxysporum*, *Botrytis cinerea* et antibactérienne sur *Clavibacter michiganensis*.

In vitro, Les résultats obtenus ont montré que l'huile essentielle détient un pouvoir antifongique intéressant à la concentration testée sur les quatre souches étudiées, toutes les concentrations ont inhibé totalement la croissance mycélienne.

En revanche, les résultats des extraits aqueux d'origan sur l'ensemble des souches étudiées dans ce travail montrent une capacité inhibitrice très faible, notamment les extraits dont la durée d'extraction est élevée. Donc, pour la technique eau sub-critique la durée d'extraction influe directement sur le résultat, plus la durée est importante plus l'efficacité diminue. Cela est dû à la dégradation des molécules thermosensibles.

In vivo, Les feuilles détachées de vigne traitées par l'extrait aqueux de l'origan ont montré une légère résistance par comparaison avec le témoin.

Selon ces résultats on peut aussi conclure que les huiles essentielles sont trop concentrées en constituants bioactives, même à très faibles doses les huiles donnent un résultat très remarquable. Dans cette étude l'huile d'*Origanum vulgare* a bloqué totalement la croissance des souches fongiques ainsi que le développement de la bactérie. Selon nos résultats on peut aussi confirmer que la durée de conservation des huiles essentielles est très importante par comparaison avec les extraits aqueux.

Ces résultats sont très encourageants quant à la possibilité d'utiliser les huiles essentielles comme moyen de lutte biologique contre les maladies des plantes, tout en évitant les traitements aux pesticides chimiques dont l'utilisation aurait des effets néfastes sur l'homme et l'environnement.

Références bibliographiques

Références bibliographiques

- **Agnandji P.** (2018). Niveaux de contamination du sol et des légumes (*Solanum macrocarpum* L. et *Lactuca sativa* L.) par les résidus de pesticides et leurs effets sur la santé des maraîchers au Sud du Bénin. Thèse de Doctorat de l'Université Abomey-Calavi, Faculté de Chimie Analytique. P : 11-21.
- **Batsch D.** (2011). L'impact des pesticides sur la santé humaine. Thèse de Doctorat de l'Université Henri Poincaré Nancy, Faculté de Pharmacie. p : 165.
- **Berrah, A.**, (2011). Etude sur les pesticides. Mémoire de Master Université de Tébessa Algérie.
- **Chandler, D. et al.**, (2011). The development, regulation and use of biopesticides for integrated pest management. Philos. Trans. R. Soc. London Ser. B. 366(1573), 1987-1998.
- **Charles Vincent Catherine Regnault-Roger, Bernard Philogène**, (2008). Biopesticides d'origine végétale, Lavoisier, 2008, 2e éd., 576 p.
- **Chen X. et al.**, (2002). Comparative analysis of the complete genome sequences of *Helicoverpa zea* and *Helicoverpa armigera* single-nucleocapsid nucleopolyhedroviruses. J. Gen. Virol., 83, 673-684
- **Deravel J., Krier F., Jacques P.** (2013). Les biopesticides, compléments et alternatives aux produits phytosanitaires chimiques (synthèse bibliographique). Biopesticides, alternatives aux produits phytosanitaires chimiques. 2014 18(2), 220-232.
- **Descoins C, Francois P, Rousel G, Trouvé C, Joubert JM, Mercier T** (2003). Les produits naturels : une chance à saisir. Phytoma, 564 : 9-12
- **Dodd S., Lieckfeldt E. & Samuels G.**, (2003). *Hypocrea atroviridis* sp. nov., the teleomorph of *Trichoderma atroviride*. Mycologia, 95(1), 27-40.
- **DUGENY F.**, (2010) : Produits Phytosanitaires, Risques pour l'Environnement et la Santé - Connaissances des usages en Zone non Agricole, Livre, p. 9.
- **El Mrabet, K., Charlet, P. & Lalère, B.** (2008). Les pesticides. Laboratoire National de métrologie et d'Essais. Paris.

- **ERRAMI M.**, (2012) : Devenir Atmosphérique de Bupirimate et Transfert de ses Métabolites (les diazines) dans l'Atmosphère, Sa Dissipation dans les Fruits de Tomate et sa Dégradation Electrochimique, Thèse de Doctorat, Spécialité : Science d'Ingénieur et Qualité de l'Environnement, Université de Reims Champagne Ardenne, p. 12.
- **Fravel, D. R.**; (2005). Commercialization and implementation of biocontrol. *Annu. Rev. Phytopathol.* 43 :337-359
- **Gatignol, C. & Étienne, J-C.** (2010). Rapport sur Pesticides et Santé. Office Parlementaire d'Évaluation des Choix Scientifiques et Technologiques. <https://www.senat.fr/rap/r09-421/r09-4211.pdf> <http://www.assemblee-nationale.fr/13/pdf/rap-off/i2463.pdf>
- **Gerecke A.C., Scharer M., Singer H. P., Muller S.R., Schwarzenbach R.P., Sagessere M., Ochsenbein U., Popow G.**, (2002). Sources of pesticides in surface waters in Switzerland: pesticide load through waste water treatment plants-current situation and reduction potential. *Chemosphere.* 48(3): 307-315.
- **GUENTHER.E** : The essential oils, Ed. Robert Krieger publishing Co. H. Huntington, New York. 1972.
- **HATEB A. MBENGUE M. NOUBATARE N. FAYE S. NIANG Y F.**, (2012) : Pollution du Sol par les Pesticides et les Engrais, Rapport, p.14.
- **Hintz W** (2001) Rapport du groupe de travail de la Biological Canadian Weed Science Society. Site Web : http://www.cwss-scm.ca/biological_control.htm. Signé le 12 novembre 2003.
- **Ignacimuthu S.**,(2012). Insect pest control: using plant resources, Alpha Science International, Oxford, U.K.
- **Isman MB** (2005). Insecticides botaniques, répulsifs et répulsifs dans l'agriculture moderne et un monde de plus en plus réglementé. *Annu Rev Entomol*, 50:45-66.
- **Jovana D., François k., Philippe J.**, (2014). Les biopesticides compléments et alternatives aux produits phytosanitaires chimique (synthèse bibliographique). *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* Vol.18, pp220-232, ISSN: 1370-6233.
- **Kumar-Das S., Mondal T.** (2014). Mode of action of herbicides and recent trends in development: A Reappraisal. *International Journal of Agricultural and Soil Science.* 2(3): 27-32.

- **Leng, P., Zhang, Z., Pan, G., Zhao, M.,**(2011). Applications and development trends in biopesticides. *African Journal of Biotechnology* 10, 19864–19873
- **Longa C. et al.,** (2009). Evaluating the survival and environmental fate of the biocontrol agent *Trichoderma atroviride* SC1 in vineyards in northern Italy. *J. Appl. Microbiol.*, 106(5), 1549-1557.
- **Louchachi Mohamed Rabie.**(2015). Enquête sur les conditions d'utilisation des pesticides en agriculture dans la région centre de l'Algéroise et perception des Agriculteurs associe à leur utilisation. Thèse magister. ENSA. 2015.
- **ManchandradeI.**(2019).BIO-BESTICIDES : A VIABLE TOOL FOR ORGANIC FARM-ING.*International Journal of Microbiology Research* ISSN: 0975-5276 & EISSN: 0975-9174, Volume 11, Issue 7, 2019, pp.-1660-1664.Available online at <https://www.bioinfopublicationorg/jouarchive.php?opt=&jouid=BPJ0000234>
- Mancini,** Traitement des déchets issus de la biomasse pour la génération d'énergie, thèse de doctorat, université Bordeaux I, Ecole doctorale des sciences chimiques, 2006.
- **Manirakiza P., Akinbamijo O., Covaci A., Pitzonzo R., Schepens P.** (2003). Assessment of organochlorine pesticide residues in West African city farms: Banjul and Dakar case study. *Arch. Environmental Contamination and Toxicology.*44:171-179.
- **Saidi –Adimi I.** (2018).Recherche et analyse des résidus de pesticides dans la tomate etla courgette cultivées dans la région de Boudouaou et Douaouda.Thèse de Doctorat de l'Ecole Nationale Supérieure Agronomique, Faculté de science agronomique. p: 5-19.
- **MARI N.,**(2018) : Les Pesticides dans l'Air Ambient, Observatoire des Résidus de Pesticides en Provence-Alpes-Côte d'Azur, Synthèse des résultats 2012 – 2015, Publication, Site web : www.airpaca.org.
- **Moulouel.N.,** (2008). Caractérisation des produits phytosanitaires périmés (le méthyl, parathion et le fénitrothion). Etude de la dégradation du fénitrothion par hydrolyse.Thèse magister, Université de Mohamed Bouguerra. Boumerdes.
- **Nollet M.L., singh Rathore.** (2015). BIOPESTICIDES HANDBOOK.CBC. press taylor & francis groupe, LLC CRC Press is an imprint of Taylor & Francis Group, an Informa business.International Standard Book Number-13: 978-1-4665-9653-5 (eBook – Pdf).
- **Olson, S.,** (2015). An analysis of the biopesticide market now and where it is going. *Out-looks on pest management* 26, 203–206.

- **Pérez-García A., Romero D. & de Vicente A.**, (2011). Plant protection and growth stimulation by microorganisms: biotechnological applications of Bacilli in agriculture. *Curr. Opin. Biotechnol.*, 22(2), 187-193.
- Portant homologation des agents de lutte biologique et des biopesticides et réglementant leur commercialisation et leur utilisation (Décret n° 99-799 du 06.10.1999, p. 3744)
- **Ramade F.**,(2005). *Éléments d'écologie, écologie appliquée*. 6e édit. Dunod. Paris.
- **Regnault-Roger C** (1999). Diversification des stratégies de Protection des plantes: intérêt des monoterpènes. *Acta Bot. Gallica*, 146: 35-43.
- Regnault-Roger C** (2005a). Molécules allélochimiques et extraits végétaux dans la protection des plantes: nature, rôle et bilan de leur utilisation au XX siècle. In Regnault-Roger C (coord.). *Enjeux phytosanitaires pour l'agriculture et l'environnement*. Tec & Doc-Lavoisier, Paris, 625-650
- **Regnault-Roger C.**, 2005. Recherche de nouveaux biopesticides d'origine végétale à caractère insecticide in biopesticides d'origine végétale, Regnault-Roger C., phellogène B.J.R.,vincent C, TEC& DOC, Lavoisier .paris, 33p
- **Rosas-Garcia N.M.**, 2009. Biopesticide production from *Bacillus thuringiensis*: an environmentally friendly alternative. *Recent Pat. Biotechnol.*, 3(1), 28-36.
- **Shaaya E.** Ravid U, Paster N, Juven B, Lisman U, Pissarev V (1991). Fumigant toxicity of essential oils against four major stored-products insects. *J Chem Ecol*, 173: 499-504.
- **Sporleder M,** Lacey L A., 2013. *Biopesticide. Insect Pests of Potato*.
- **Streblor G** (1989). *Les médiateurs chimiques*. Tec & Doc-Lavoisier, Paris
- **Tanor N**, 2008. Etude des principaux paramètres permettant une évaluation et une réduction
- **Washburn J.**, Trudeau D., Wong J. & Volkman L.,2003. Early pathogenesis of *Autographa californica* multiple nucleopolyhedrovirus and *Helicoverpa zea* single nucleopolyhedrovirus in *Heliothis virescens*: a comparison of the 'M' and 'S' strategies for establishing fatal infection. *J. Gen. Virol.*, 84, 343-351.
- **Whittaker RH** (1970). L'écologie biochimique des plantes supérieures. Dans : Sondheimer E, Simeone JB (eds). *Écologie chimique*. Presse académique, New York, 43-70.

-**A. Marrouf**, G. Tremblin, Abrégé de biochimie appliquée, EDP sciences 2009. application of high resolution mass spectrometry for human biomonitoring: An analytical

-**BEN AMOR B.**, (2008). Matrise de l'aptitude technologique de la matière végétale dans les opérations d'extraction de principes actifs ; texturation par détente instantanée contrôlée. Thèse de doctorat en génie des procédés industriels université LA ROCHELLE, France : 187.

-**Bourbia, A.**, 2013. Evaluation de la toxicité de mixtures de pesticides sur un bio indicateur dela pollution des sols *Helix aspersa* .Mémoire de Doctorat. Univ, Annaba. 110p

-**Bourgou soumaya**, Pauline Detry, Riadh Ksouri, Marie-Laure Fauconnier, 2018, techniques conventionnelles et innovantes pour l'extraction de biomolécules à partir des plantes, Journées extraction.

-**Bruneton J.**, 1999- Pharmacognosie et photochimie des plantes médicinales. 3ème Ed Tec et Doc. Paris.

-**Calvet, R.**, Barriuso, E., Bedos, C., Benoit, P., Charnay, M-P & Coquet, Y., 2005. Les pesticides dans le sol: conséquences agronomiques et environnementales. Edit. France Agricole, Paris. 637 p. ISBN : 2-85557-110-7.

-**Charbonnel J.**(2003).Contribution de l'atmosphère à l'exposition aux pesticides par la consommation de produits de jardin. École national de la santé publique. p : 2.

Couteux A., Salaün C. (2009). Index phytosanitaire ACTA 2009. 45 èmeédition. Association de Coordination Technique Agricole.MAME.

-**Chemat**, Eco-extraction du végétal procédés innovants et solvants alternatifs. Dunod, Paris, 2011.des risques d'exposition des opérateurs lors de l'application de traitement phytosanitaire en culture maraichère et cotonnière au Sénégal.

-**Drissi, M.**, Aït Daoud, N. & Soulaymani Bencheikh, R. 2010. Toxicologi+e Maroc : Pesticide, Définition et Classification. Publication officielle du Centre Anti Poison du Maroc. N° 4.

El Bakouri.H., 2006. Développement de nouvelles techniques de détermination des pesticides et contribution à la réduction de leur impact sur les eaux par utilisation des substances organiques naturelles. Thèse doctorat. Université Abdel Malek Essaadi. Tanger.

-**Farhat, A.** (2010). Vapo-diffusion assistée par micro-ondes: conception, optimisation et application. Thèse de Doctorat en Sciences (option : Sciences des Procédés, Sciences des Ali-

ments), Université d'Avignon et des Pays de Vaucluse (France) & Ecole Nationale d'Ingénieurs de Gabès (Tunisie).

-**Gaouar Z.L.** (2017). Evaluation des teneurs en résidus de pesticides dans les aliments et la nappe phréatique. Thèse de Doctorat de l'Université d'Oran 1, Faculté de médecine. p : 4.

-**Gilliom J.R.**, Barbash J. E., Crawford C. G., Hamilton P. A., Martin J. D., Nakagaki N., Nowell L. H., Scott J. C., Stackelberg P. E., et Thelin G.P. et Wolock D.M. 2006 « The Quality of Our Nation's ». Waters Pesticides in the Nation's Streams and Ground Water, 121–172.

-**Hashem M.** 2015 الزراعة العضوية . مدينة الملك عبد العزيز والتقنية الادارة العامة للتوعية العلمية والنشر. الرياض ص86

-**Herodez .S**, M. Hadolinb, M. Skergeta and Zeljko Knez, Solvent extraction study of antioxidants from Balm (*Melissa officinalis* L.) leaves, Food Chemistry, 80 (2003) 275– 282.

-**Hesham H.A.**Rassem, AbdrahmanH.Nour et Rosili M.Yunus .(2016) ; Techniques For Extraction of Essential Oils From Plants: A Review, Australian Journal of Basic and Applied Sciences, , Pages: 117-127.

-**Marília** Locatelli Corrêa-Ferreira, Guilhermina Rodrigues Noletto et Carmen Lúcia Oliveira Petkowicz, « *Artemisia absinthium* and *Artemisia vulgaris*: A comparative study of infusion polysaccharides », Carbohydrate Polymers, vol. 102, .février 2014, p. 738-745

-**Pellerin, P.** 1991. Supercritical fluid extraction of natural raw materials for the flavour and perfume industry. *Perfum. Flavor.* 16,4, 37-39.

-**Pierre M.**, Lis .M (2007) Secrets des plantes. Editions Artemis, Paris 1: 463.

-**Richard, H.** 1992. Épices et Aromates. Technologie et Documentation Lavoisier. Paris. 339p.

-**Schulz, R.**, 2004. Field studies on exposure, effects, and risk mitigation of aquatic non-pointsource insecticide pollution: a review. *J Environ Qual.* 33(2); 419-448.

-**Senthil-Nathan S.** 2015. A Review of Biopesticides and Their Mode of Action Against Insect Pests. A Review of Biopesticides and Their Mode of Action Against Insect Pests. 10.1007/978-81-322-2056-5_3

- Sofowera A.** (2010) Plantes médicinales et médecine traditionnelle d'Afrique. Karthala, Economie et Développement. Paris: 384.
- SOFOWORDA A.**, (2010). Plantes médicinales et médecine traditionnelle d'Afrique. Ed N2, KARTHALA, paris, 378p.
- Soxhlet F.**,1879. "Die gewichtsanalytische Bestimmung des Milchfettes". Dingler's Polytechnisches Journal (in German), 232: 461-465.
- TAHOUE. S.** 2017, procédures d'extraction globale des composés phytochimiques pour l'évaluation analytique des médicaments à base de plantes, Thèse docteur. Université Félix Houphouët-Boigny page 123.
- Testud F.**, Grillet J.P, Nisse C. (2007). Effets à long terme des produits phytosanitaires : le point sur les données épidémiologiques récentes. Archives des Maladies Professionnelles et de l'Environnement. 68 (4) : 394-401.
- Vigourou_villard A.**(2006). Niveau d'imprégnation de la population générale aux pesticides : éléction des substances à mesurer en priorité. Agence française de sécurité sanitaire de l'environnement et de travail.
- Wenqtang, G.**; Shufen, L.; Ruixiang, Y.; Shaokun, T.; Can, Q. 2007. Comparison of essential oils of clove buds extracted with supercritical carbon dioxide and other three traditional extraction methods. Food chem. 1001,1558-1564.

Annexes

Annexe 1

Composition chimique des milieux de culture

Milieu PDA

PDA 49 g

Eau distillé : compléter à 1000 ml

Stérilisation : à 120c pendant 20 mn

Milieu GN

Peptone.....5g

Extrait de levure3g

Extrait de viande3g

Agar bactériologique...20g

Nacl...5g

Ph du milieu ...7

Milieu de bouillon nutritif

Pour un 300 ml d'eau distillé

Extrait de viande1g

Peptone5g

Nacl.....5g