

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



UNIVERSITE ABDELHAMID IBN BADIS – MOSTAGANEM–  
Faculté Des Sciences de la Nature et de la Vie  
Département d'Agronomie

## THESE POUR L'OBTENTION DU TITRE DE DOCTEUR EN SCIENCES AGRONOMIQUES

Filière : Sciences Agronomiques

OPTION : BIOTECHNOLOGIE VEGETALE

**Etude de l'activité antimicrobienne et bioinsecticide de  
*Ruta chalepensis* L., *R. angustifolia* Pers. et  
*Haplophyllum tuberculatum* (Forsk.) A.Juss.vis-à-vis de  
quelques bioagresseurs de la culture de tomate  
(*Lycopersicum esculentum* Mill).**

Présentée par Mme : **BERGHEUL SAIDA**

### Devant le Jury :

LOTMANI	Brahim	Pr	Président	Université de Mostaganem
BEKKADA	Ahmed Mohamed Ali	Pr	Examineur	Université de Tissemsilt
BOUZOUINA	Mohamed	MCA	Examineur	Université de Mostaganem
LATREUCH	Ali	Pr	Examineur	Université de Sidi Bel Abès
TEFIANI	Choukri	MCA	Examineur	Université de Tlemcen
BERKANI	Abdellah	Pr	Directeur de thèse	Université de Mostaganem

**Année universitaire : 2017/2018.**

## REMERCIEMENTS

*Je remercie Dieu tout puissant, qui ma permis de mener à bien ce travail*

*Je tiens à exprimer toutes mes reconnaissances à Mr BERKANI. A , professeur à l'Université de MOSTAGANEM et Directeur de cette thèse de m'avoir fait confiance tout au long de la préparation de ce travail, ainssi que pour sa générosité, sa gentillesse, son encouragement et. Qu'il trouve ici toute ma gratitude et ma sympathie.*

*Un grand merci à Mr F. BOURGAUD, Directeur du laboratoire d'Agronomie et envirennement (INRA, France) et Mr Alexandre Olry Ingénieur de recherche au laboratoire d'Agronomie et envirennement (INRA) à l'Université de Lorraine (France) de m'avoir accueilli et pour m'avoir aidé à réaliser ce travail avec rigueur et patience. Leurs qualités scientifiques et humaines et leurs conseils judicieux m'ont été profitables au plus haut point.*

*Je remercie également Mr le Professeur LOTMANI. B de me faire l'honneur de présider le jury de ma thèse*

*Je suis également reconnaissante à Monsieur BOUZOUINA. M, Maitre de conférences à l'université de Mostaganem, Monsieur BEKKADA. A, Professeur à l'université de Tissemsilt, Monsieur TEFIANI. C, Maitre de conférences à l'université de Tlemcen, Monsieur LATRECH. A, pour avoir accepté d'être membres de jury pour ce travail.*

*Mes remerciements s'adressent également à notre chère amie et sœur « Nawel » qui ma proposer ce sujet, On ne t'oubliera jamais nawel, Qu'allah illumine ta tombe et t'accueil dans son vaste paradis .Sans oublier toutes les personnes qui ont contribué de près ou de loin à ce travail, je citerai spécialement : D<sup>r</sup> Bouzouina. M, P<sup>r</sup> Djibaoui. R, P<sup>r</sup> Benkada. A, D<sup>r</sup> Saiah. F, D<sup>r</sup> Boualem. M, D<sup>r</sup> Badaoui. I et D<sup>r</sup> Benourad. F.*

## *Dédicaces*

*Je dédie ce travail à :*

- *Mes chers parents*
- *Mon époux*
- *Ma belle mère*
- *Mes frères et belles sœurs*
- *Mes deux petites filles.*

TABLE DES  
MATIÈRES

## **Table des matières**

Introduction	1
Synthèse bibliographique	
<b>Chapitre I : La plante hôte et ses ravageurs</b>	
I-1- Origine et Historique	4
I-2- Classification botanique	4
I-3- Caractéristique botanique de la tomate	5
I-4- Principales exigences écologiques et climatiques de la plante	6
I-5-Production de la tomate	7
I-5-1-Production mondial de la tomate	6
I-5-2-Production de la tomate en Algérie	7
I-6-Composition chimique et valeur nutritionnelle	7
I-7-Principaux bioagresseurs de la tomate	8
I-7-1-Les agents phytopathogènes et ravageur étudiés	8
I-7-1-1- <i>Fusarium oxysporum f. sp. radicans lycopersici</i>	8
I-7-1-1-1-Le Genre <i>Fusarium</i>	8
I-7-1-1-2-Taxonomie	9
I-7-1-1-3- <i>Fusarium oxysporum</i>	9
I-7-1-1-3-1-Systématique	9
I-7-1-1-3-2-Description macroscopique et microscopique de <i>Fusarium oxysporum</i>	9
I-7-1-1-3-3-Plantes hôtes	10
I-7-1-1-3-4-Les maladies causées par <i>F. oxysporum</i>	10
I-7-1-1-3-4-1-La flétrissure fusariennes classique ( <i>Fusarium wilt</i> ) causée par <i>Fusarium oxysporum f.sp lycopersici</i>	10
I-7-1-1-3-4-2-La pourriture des racines et du collet causée par <i>Fusarium oxysporum f.sp.radicis-lycopersici (FORL)</i>	11
I-7-1-2- <i>Botrytis cinerea</i>	12
I-7-1-2-1-Position taxonomique	12
I-7-1-2-2-Position systématique de <i>Botrytis cinerea</i>	12
I-7-1-2-3-Description macroscopique et microscopique de <i>Botrytis cinerea</i>	12
I-7-1-2-4-Plantes hôtes	13
I-7-1-2-5-La pourriture grise	13
I-7-1-3- <i>Alternaria solani</i>	14

I-7-1-3-1-Position taxonomique	15
I-7-1-3-2-Classification	15
I-7-1-3-3-Description macroscopique et microscopique	15
I-7-1-3-4-Plante Hôte	16
I-7-1-3-5- <i>Alternaria</i> producteurs de mycotoxines	16
I-7-1-3-6-Les maladies causées par <i>Alternaria solani</i>	16
I-7-1-3-6-1-Alternariose	16
I-7-1-4- <i>Pectobacterium carotovorum</i> ( <i>Erwinia carotovora</i> )	17
I-7-1-4-1-Généralités	17
I-7-1-4-2-Position taxonomique	18
I-7-1-4-3-Classification	18
I-7-1-4-4- Les maladies causées par <i>Pectobacterium carotovorum</i> (synonyme: <i>Erwinia carotovora</i> )	18
I-7-1-4-4-1-La pourriture molle bactérienne	18
I-7-1-5-La mineuse de la tomate ( <i>Tuta Absoluta</i> )	19
I-7-1-5-1-Origine et distribution géographique de la mineuse de la tomate	19
I-7-1-5-1-1-En Algérie	19
I-7-1-5-1-2-Position systématique	20
I-7-1-5-1-3-Description morphologique	20
I-7-1-5-1-3-1-Œufs	20
I-7-1-5-1-3-2-Chenilles	20
I-7-1-5-1-3-3-Chrysalide	21
I-7-1-5-1-3-4-Adulte	21
I-7-1-5-1-4-Principales plantes hôtes	22
I-7-1-5-1-5-Symptômes et dégâts	23
I-7-1-5-1-6-Méthodes de lutte contre les agents phytopatogènes qui attaquent la tomate	26
 <b>Chapitre II : Composition chimique et activité biologique des trois espèces de la rue</b>	
<i>II-Ruta chalepensis</i> L	
II-1-Description botanique	27
II-1-1-Position Systématique	27
II-1-2-Ecologie et situations géographique	28
<i>II-2-Ruta angustifolia</i> Pers	
II-2-1-Description botanique	28

II-2-2-Classification botanique	29
II-2-3-Ecologie et situation géographique	29
II-3-Le genre <i>Haplophyllum</i>	29
II-3-1-Description botanique	29
II-3-2-Position systématique	30
II-3-3-Ecologie et situation géographique	30
II-4-Travaux antérieurs et principaux métabolites secondaires isolés des espèces de la rue	31
II-5-Toxicités des plantes	34
II-6-Activités biologiques des trois espèces de la rue	35
II-6-1-Effet antimicrobiens	35
II-6-2-Activités insecticides	38
II-6-3-Effets antioxydants	39
II-6-4-Autres activités	40
<b>Chapitre III: Utilisation des extraits dans la lutte biologique</b>	
III-Définition de la lutte biologique	41
III-1-Utilisation des dérivés de plantes dans la lutte contre les agents phytopathogènes	41
III-2-Caractéristiques et intérêts des préparations à base de plantes	41
III-3-Modes d'actions des substances naturelles	42
III-4-Utilisation des huiles essentielles en protection des végétaux	42
III-4-1-Exemple des cas d'utilisation des extraits de plantes dans la lutte biologique contre <i>Botrytis cinerea</i>	43
III-5-Perspectives et progrès visés par l'utilisation des extraits naturels dans la lutte biologique	43
<b>Etude expérimentale</b>	
<b>I- Matériels et méthodes</b>	45
I-1- Matériels	45
I-1-1- Site et conditions d'échantillonnage	45
I-1-2- Matériel biologique	47
I-1-2-1- Matériel végétal	47

I-1-2-2- Matériel animal ( <i>Tuta absoluta</i> )	49
I-1-2-3- Microorganismes utilisés	49
I-1-2-3-1- Matériel fongique et purification des isolats	49
I-1-2-3-2- Matériel bactérien	51
I-2- Méthodes	51
I-2-1- Séchage et préparation de la drogue	51
1-3-Etude analytiques	51
1-3-1-Détermination de la teneur d'humidité	51
1-3-2- Détermination de la teneur en matière sèche	51
1-3-3- Détermination de la teneur en matière minérale	52
1-3-4- Détermination de la teneur en matière organique	52
1-3-5-Criblage phytochimique	52
1-3-5-1-Epuisement du matériel végétal avec de l'eau chaude	53
1-3-5-1-1-Caractérisation des saponosides	53
1-3-5-1-2-Caractérisations des sucres réducteurs	53
1-3-5-2-Epuisement du matériel végétal avec un solvant alcoolique	54
1-3-5-2-1- Caractérisations des tannins	54
1-3-5-2-2-Caractérisations des polyphénols	54
1-3-5-2-3-Caractérisations des flavonoïdes (réaction a la cyanidine)	54
1-3-5-2-4- Les Alcaloïdes	54
1-3-5-2-5- Anthocyanes	55
1-3-5-2-6- Les Coumarines	55
1-3-5-2-7-Les huiles essentielles	55
I-4 -Etude quantitative	55
I-4-1- Dosage des polyphénols totaux par le réactif de Folin-Ciocalteu (méthode des microplaques)	55
I-4-2- Dosage des flavonoïdes	57
I-4-3- Extraction des coumarines et furocoumarines	57
I-4-3-1-Identification des furocoumarines par Chromatographie liquide à haute pression (UPLC/ MS)	58
I-4-3-1-2-Quantification des coumarines et furocoumarines	59
I-5-Facteurs influençant la composition chimique de l'huile essentielle	59
I-5-1- Extraction des huiles essentielles	59
I-5-1-1-Evolution du rendement en fonction de la masse végétale	59

I-5-1-2-Evolution du rendement en fonction du volume d'eau distillée	60
I-5-1-3-Détermination de la cinétique d'extraction	60
I-5-1-4- Détermination du rendement d'extraction	60
I-5-2-Analyses des huiles essentielles	61
I-5-2-1-Détermination de l'indice de réfraction	61
I-5-2-2-Analyse chimique des huiles essentielles extraites par GC/FID	61
I-5-2-3-Préparation de l'extrait méthanolique	62
1-8-2-2-Calcul du rendement d'extraction	63
I-6-Activités biologiques	59
I-6-1-Evaluation, <i>in vitro</i> , de l'activité antioxydant de l'extrait méthanoïque	64
I-7-Estimation de l'activité larvicide de l'huile essentielle des trois espèces vis- a- vis de <i>Tuta absoluta</i>	65
I-7-1-Préparation des doses de l'huile essentielle	65
I-7-2-Toxicité de l'huile essentielle par contact direct	65
1-2-7-Activité antifongique de l'huile essentielle et de l'extrait méthanolique des trois espèces étudiées	68
I-8-1- Activité antifongique de l'huile essentielle des trois espèces étudiées	68
I-8-2-Effet antifongique de l'extrait méthanolique des trois espèces étudiées	68
I-8-2-3-Préparation de l'extrait méthanolique	68
I-8-2-4-Calcul du rendement d'extraction	68
I-8-2-5-Evaluation de la croissance mycélienne	68
I-8-2-4-Evaluation du taux d'inhibition de la croissance mycélienne	68
I-8-2-5-Analyse par HPLC-UV des extraits méthanoliques	69
I-9-Etude Microbiologique	69
I-9-1-Test de confirmation de la souche bactérienne	69
I-9-2-Conservation de la souche bactérienne	69
I-9-3-Test « <i>in-vitro</i> » de l'activité antibactérienne des extraits (huile essentielle et de l'extrait méthanolique) des trois espèces végétales	69
I-9-3-1-Préparation de la préculture	69
I-9-3-2-Préparation de la suspension bactérienne	70
I-9-3-3-Etude de l'activité antibactérienne	70
I-9-3-3-1-Méthode des disques	70
I-9-3-3-2-Méthodes des puits	70
I-9-4-Préparation des dilutions	70

I-9-5-Étalement	71
I-9-6-Application des disques et incubation	71
I-9-7-Analyse statistique des donnés	71
<b>Chapitre II: Résultats et discussion</b>	
II-1-Composition chimique	72
II-2-Screening phytochimique	75
II-3-Etude quantitatives	81
II-3-1-Dosage des polyphénols	81
II-3-2-Dosage des flavonoïdes	82
II-3-3-Identification et quantification des coumarines et furocoumarines à partir des tiges et des feuilles de trois espèces de <i>Ruta.sp</i> récoltées de trois régions (EST, OUEST, SUD de l'ALGERIE).	85
II-3-3-1-Comparaison de la production des coumarines et furocoumarines dans les trois espèces de la rue	87
II-4- Cinétique d'extraction des huiles essentielles des trois espèces	89
II-4-1-Comparaison du rendement d'extraction des huiles essentielles avec la littérature	90
II-4-2-Facteurs influençant la composition chimique de l'huile essentielle	91
II-4-2-1-Influence du volume d'eau	91
II-4-2-2-Influence de la masse de la matière végétale	94
II-4-2-3-Evolution du rendement en fonction de la période de récolte	96
II-4-3-Analyses des huiles essentielles	97
II-4-3-1-Caractéristiques organoleptiques et physico-chimique des huiles essentielles	97
II-4-3-2-Analyses des huiles essentielles par GC/FID des trois espèces de la rue	98
II-5- Activité larvicide	104
II-5-1-Détermination de la DL <sub>50</sub> et la DL <sub>100</sub>	105
II-6-Activité antioxydante	110
II-7-Rendements des extraits bruts	114
II-7-1-Activité antifongique de l'extrait méthanoïque des tiges et des feuilles des espèces étudiées	116
II-7-1-1-Croissance mycélienne de FORL <i>vis-à-vis</i> des feuilles et des tiges des trois espèces étudiées	116
II-7-1-2-Croissance mycélienne d' <i>Alternaria solani vis-à-vis</i> des feuilles et des tiges des trois espèces étudiées	120

II-7-1-3-Taux d'inhibition de <i>FORL</i> et <i>Alternaria solani</i> vis-à-vis des extraits méthanoïques	124
II-7-1-4-Concentrations minimales inhibitrices (CMI)	128
II-7-2-Activité antifongique de l'huile essentielle des tiges et des feuilles des espèces étudiées	132
II-7-2-1-Evaluation de la croissance mycélienne	132
II-7-2-2-Taux d'inhibition	137
II-7-2-3-Concentrations minimales inhibitrices (CMI)	139
II-7-3-Activité antibactérienne de l'huile essentielle et de l'extrait méthanoïque des espèces étudiées	149
II-7-3-1-Coloration de Gram et identification biochimique de <i>Pectubacterium carotovorum</i>	149
II-7-3-2-Pouvoir antibactérien des huiles essentielles et des extraits méthanoïques des trois espèces contre <i>Pectubacterium carotovorum</i> par la méthode des disques.	151
<b>Conclusion</b>	158
<b>Références bibliographiques</b>	
<b>Annexes</b>	

**LISTE DES  
ABRÉVIATIONS**

## Liste des abréviations

**Abs** : Absorbance  
**ANOVA** : Analyse de la variance  
**BBA** : Bordj Bou Arreridj.  
**°C** : Degré Celsius.  
**g** : Gramme.  
**O.M.S** : Organisation mondiale de la santé.  
**U.V** : Ultra- violet.  
**T°** : Température.  
**µg** : Microgramme.  
**µl** : Microlitre.  
**L** : Litre.  
**mg** : Milligramme.  
**ml** : Millilitre  
**secs** : Secondes  
**min** : Minutes  
**rpm** : Round per minute  
**MS** : Matières sèche  
**kV** : kilovolt  
**AFNOR**: Association Française de Normalisation  
**Amu.s-1**: Atomic mass unit/ secondes  
**eV** : Électron-volt  
**LD** : Low dose  
**PLS** : Pectate lyases  
**PME** : Pectines méthyl esterase  
**PGS** : Polygalacturonases  
**AME**: Alternariol monométhyle ether  
**MS** : Matière sèche  
**MO** : Matière organique  
**MM** : Matière minérale  
**µmol/l** : micromole par litre.  
**%** : Pourcentage.  
**DO** : Densité optique  
**AlCl<sub>3</sub>** : Chlorure d'aluminium.  
**DPPH** : 2.2 diphényle-1-picrylhydrazyl.  
**D.M.S.O** : Diméthyle sulfoxyde  
**mg EQ/g** : milligrammes équivalent quercétine par gramme d'extrait sèche.  
**mg EAG/g** : milligrammes équivalent acide gallique par gramme d'extrait sèche.  
**mg EC/g** : milligrammes équivalent catéchine par gramme d'extrait sèche  
**nmol** : nanomols  
**CPG** : Chromatographie phase gazeuse  
**Fe<sub>2+</sub>** : Ions ferreux.  
**Fe<sub>3+</sub>** : Ions ferriques.  
**FeCl<sub>3</sub>** : Chlorure de fer.  
**nm** : nanometer.  
**KOH** : Potasse.  
**FRAP**: Ferric reducing antioxidant power.  
**pH** : Potentiel hydrogène

**g** : Gramme.  
**H<sub>2</sub>O** : Eau distillée.  
**H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>** : Le peroxyde d'hydrogène.  
**HO** : Le radical hydroxyle.  
**NH<sub>4</sub>OH** : Ammoniaque.  
**O<sub>2</sub>** : Oxygène moléculaire.  
**O<sub>2</sub><sup>-</sup>** : Le radical superoxyde.  
**OH** : Hydroxyle.  
**ROO•** : Le radical peroxyde.  
**ROOH** : Peroxyde alkyle.  
**CMI** : Concentration minimale inhibitrice.  
**HCl** : Acide chloridrique.  
**Min** : minute.  
**%** : Pourcentage.  
**H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>** : Acide sulfurique.  
**% I** : Pourcentage d'inhibition.  
**UPLC** : Ultra Performance Liquid Chromatography.  
**UPLC/ MS** : Chromatographie liquide à haute pression couplée à la spectrométrie de masse.  
**CG-FID** : Chromatographie en phase gazeuse couplée à un détecteur à ionisation de flamme.  
**FID** : Détecteur à ionisation de flamme  
**FAO** : Organisation des Nations unies pour l'alimentation et l'agriculture  
**FID** : Flame Ionization Detector (détecteur à ionisation de flamme).  
**Tr**: Retention time.  
**HE**: Huile essentielle.  
**FORL**: *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici*  
**FA** : Feuilles de *Haplophyllum tuberculatum* (Adrar).  
**TA** : Tiges de *Haplophyllum tuberculatum* (Adrar).  
**FB** : Feuilles de *Ruta angustifolia* (Bordj bou arriridj).  
**TB** : Tiges de *Ruta angustifolia* (Bordj bou arriridj).  
**FM** : Feuilles de *Ruta chalepensis* (Mostaganem).  
**TM** : Tiges de *Ruta chalepensis* (Mostaganem).  
**Pso**: Psoraléne  
**6 - 7 DHB**: 6-7 Dihydroxybergamottin  
**Umb**: umbelliférolone  
**Epoxyberga** : Epoxybergamottin  
**Geranyloxypso** : Geranyloxypsora  
**5G7M**: 5-Geranyloxy-7-Méthoxycoumarin

# LISTE DES FIGURES

## Liste des figures

<b>Figure 1:</b> (A) illustration des différentes parties qui constituent la tomate. (B) Coupe transversale représentant les différentes parties du fruit	<b>5</b>
<b>Figure 2:</b> Symptômes de <i>Fusarium oxysporum</i> sur fruits (A), tiges(B) et feuilles(C) de la tomate	<b>11</b>
<b>Figure 3:</b> Symptômes de <i>Botrytis cinerea</i> sur : (A) fruits, (B) feuilles, (C) tiges de la tomate	<b>14</b>
<b>Figure 4 :</b> Symptômes d'Alternariose sur : (A) fruit, (B) feuille, (C) tige de la tomate	<b>17</b>
<b>Figure 5 :</b> Symptômes de <i>Pectobacterium carotovorum</i> sur : (A) fruits, (B, C) tiges de la tomate	<b>19</b>
<b>Figure 6:</b> Cycle de vie de <i>Tuta absoluta</i>	<b>22</b>
<b>Figure 7:</b> Symptômes et dégâts de <i>Tuta absoluta</i> sur : (A) feuilles, (B) tiges, (C) fruits	<b>24</b>
<b>Figure 8 :</b> <i>Ruta chalepensis</i> L. A : Aspects générale de <i>Ruta chalepensis</i> L.	<b>27</b>
<b>Figure 9:</b> A: Fruits et graines de <i>Ruta angustifolia</i> Pers. B: Feuilles et fleurs de <i>Ruta angustifolia</i> Pers.	<b>28</b>
<b>Figure 10:</b> <i>Haplophyllum tuberculatum</i> (Forsk.) A. Juss. A: Aspects générale d' <i>Haplophyllum tuberculatum</i> (Forsk.) A. Juss. B : feuilles et fleurs de <i>Haplophyllum tuberculatum</i> (Forsk.) A. Juss	<b>30</b>
<b>Figure 11:</b> La carte de situation géographique des différentes zones d'étude (Atlas géographique mondial, 2013).	<b>45</b>
<b>Figure 12 :</b> Vue générale des trois espèces étudiées (fraîche (A) et sèche(B))	<b>48</b>
<b>Figure 13:</b> Observations macroscopiques et microscopiques des souches fongiques utilisées (X40).	<b>50</b>
<b>Figure 14 :</b> Illustration d'une plaque d'essai dans laquelle un dosage des polyphénols a été réalisé.	<b>57</b>
<b>Figure 15 :</b> Dispositif Soxhlet (photos originale).	<b>63</b>
<b>Figure 16:</b> Test du DPPH en microplaques des tiges et des feuilles de <i>H.tuberculatum</i> .	<b>65</b>
<b>Figure 17:</b> Différentes étapes du test d'évaluation de l'activité larvicide de l'huile essentielle vis-à-vis de <i>Tuta absoluta</i>	<b>67</b>
<b>Figure 18 :</b> Taux d'humidité, matière sèche, organique et minérale d' <i>Haplophyllum tuberculatum</i> (Forsk) A.Juss. (Région d'Adrar).	<b>74</b>

<b>Figure 19</b> : Taux d'humidité, matière sèche, organique et minérale de <i>Ruta chalepensis</i> L (Région de Mostaganem).	<b>74</b>
<b>Figure 20</b> : Taux d'humidité, matière sèche, organique et minérale de <i>Ruta angustifolia</i> Pers. (Région de Bordj bou argeridj).	<b>74</b>
<b>Figure 21</b> : Caractérisation des sucres réducteurs.	<b>76</b>
<b>Figure 22</b> : Caractérisation des polyphénols totaux.	<b>76</b>
<b>Figure 23</b> : Caractérisation des Flavonoïdes.	<b>77</b>
<b>Figure 24</b> : Caractérisation des Tannins.	<b>77</b>
<b>Figure 25</b> : Caractérisation des alcaloïdes.	<b>78</b>
<b>Figure 26</b> : Caractérisation des Anthraquinone.	<b>78</b>
<b>Figure 27</b> : Caractérisation des Saponosides.	<b>79</b>
<b>Figure 28</b> : Caractérisations des coumarines sous UV à 254 nm.	<b>79</b>
<b>Figure 29</b> : Dosage des polyphénols par mg/g de matière sèche (tiges, feuilles) des trois espèces.	<b>82</b>
<b>Figure 30</b> : Teneurs en flavonoïdes des extraits méthanoliques des tiges et feuilles des trois espèces de la rue.	<b>84</b>
<b>Figure 31</b> : Cinétique d'extraction par hydrodistillation de l'huile essentielle des trois espèces de <i>Ruta</i> .	<b>90</b>
<b>Figure 32</b> : Influence du volume d'eau sur le rendement de l'huile essentielle de <i>Ruta chalepensis</i> (région Ouest).	<b>93</b>
<b>Figure 33</b> : Influence du volume d'eau sur le rendement de l'huile essentielle de <i>Ruta angustifolia</i> (région Est).	<b>93</b>
<b>Figure 34</b> : Influence du volume d'eau sur le rendement de l'huile essentielle d' <i>Haplophyllum tuberculatum</i> (région Sud).	<b>93</b>
<b>Figure 35</b> : Influence de la masse de la matière végétale sur le rendement de l'huile essentielle de <i>Ruta chalepensis</i> (région Ouest).	<b>95</b>
<b>Figure 36</b> : Influence de la masse de la matière végétale sur le rendement de l'huile essentielle de <i>Ruta angustifolia</i> (région Est).	<b>95</b>
<b>Figure 37</b> : Influence de la masse de la matière végétale sur le rendement de l'huile essentielle d' <i>Haplophyllum tuberculatum</i> (région Sud).	<b>95</b>
<b>Figure 38</b> : Rendement de l'huile essentielle de <i>R.chalepensis</i> et <i>H.tuberculatum</i> en fonction de la période de récolte.	<b>96</b>

<b>Figure 39:</b> Taux de mortalité corrigée de <i>Tuta absoluta</i> en fonction du temps et des Concentrations de l'HE d' <i>Haplophyllum tuberculatum</i> et de <i>Ruta chalepensis</i> .	<b>104</b>
<b>Figure 40:</b> Croissance mycélienne (cm) de <i>FORL</i> en fonction du temps et de la concentration de l'extrait méthanolique des feuilles de <i>Ruta angustifolia</i>	<b>118</b>
<b>Figure 41 :</b> Croissance mycélienne (cm) de <i>FORL</i> en fonction du temps et de la concentration de l'extrait méthanolique des feuilles d' <i>Haplophyllum tuberculatum</i>	<b>118</b>
<b>Figure 42 :</b> Croissance mycélienne (cm) de <i>FORL</i> en fonction du temps et de la concentration de l'extrait méthanolique des feuilles de <i>Ruta chalepensis</i> .	<b>119</b>
<b>Figure 43:</b> Croissance mycélienne (cm) de <i>FORL</i> en fonction du temps et de la concentration de l'extrait méthanolique des tiges de <i>Ruta angustifolia</i>	<b>119</b>
<b>Figure 44:</b> Croissance mycélienne (cm) de <i>FORL</i> en fonction du temps et de la concentration de l'extrait méthanolique des tiges d' <i>Haplophyllum tuberculatum</i>	<b>120</b>
<b>Figure 45 :</b> Croissance mycélienne (cm) de <i>FORL</i> en fonction du temps et de la concentration de l'extrait méthanolique des tiges de <i>Ruta chalepensis</i>	<b>120</b>
<b>Figure 46:</b> Croissance mycélienne (cm) d' <i>Alternaria solani</i> en fonction du temps et de la concentration de l'extrait méthanolique des feuilles de <i>Ruta angustifolia</i>	<b>121</b>
<b>Figure 47 :</b> Croissance mycélienne (cm) d' <i>Alternaria solani</i> en fonction du temps et de la concentration de l'extrait méthanolique des feuilles d' <i>Haplophyllum tuberculatum</i>	<b>121</b>
<b>Figure 48:</b> Croissance mycélienne (cm) d' <i>Alternaria solani</i> en fonction du temps et de la concentration de l'extrait méthanolique des feuilles de <i>Ruta chalepensis</i>	<b>122</b>
<b>Figure 49 :</b> Croissance mycélienne (cm) d' <i>Alternaria solani</i> en fonction du temps et de la concentration de l'extrait méthanolique des tiges de <i>Ruta angustifolia</i> .	<b>123</b>
<b>Figure 50 :</b> Croissance mycélienne (cm) d' <i>Alternaria solani</i> en fonction du temps et de la concentration de l'extrait méthanolique des tiges d' <i>Haplophyllum tuberculatum</i> .	<b>123</b>
<b>Figure 51 :</b> Croissance mycélienne (cm) d' <i>Alternaria solani</i> en fonction du temps et de la concentration de l'extrait méthanolique des tiges de <i>Ruta chalepensis</i>	<b>123</b>
<b>Figure 52 :</b> Taux d'inhibition (%) de <i>FORL</i> traité à l'extrait méthanolique des feuilles des trois espèces étudiées.	<b>124</b>
<b>Figure 53 :</b> Taux d'inhibition (%) de <i>FORL</i> traité à l'extrait méthanoïque des tiges des trois espèces étudiées.	<b>125</b>
<b>Figure 54:</b> Taux d'inhibition (%) d' <i>Alternaria solani</i> traité à l'extrait méthanolique des tiges des trois espèces étudiées	<b>125</b>
<b>Figure 55 :</b> Taux d'inhibition (%) d' <i>Alternaria solani</i> traité à l'extrait méthanolique des feuilles des trois espèces étudiées.	<b>126</b>

<b>Figure 56:</b> Résultat du test antifongique de l'extrait méthanolique des feuilles et des tiges de <i>R.chalepensis</i> sur <i>FORL</i> .	<b>126</b>
<b>Figure 57 :</b> Résultat du test antifongique de l'extrait méthanolique des feuilles et des tiges de <i>R.angustifolia</i> sur <i>FORL</i> .	<b>127</b>
<b>Figure 58:</b> Résultat du test antifongique de l'extrait méthanolique des feuilles et des tiges de <i>H.tuberculatum</i> sur <i>FORL</i> .	<b>127</b>
<b>Figure 59 :</b> Résultat du test antifongique de l'extrait méthanolique des feuilles et des tiges de <i>R. angustifolia</i> sur <i>Alternaria solani</i> .	<b>128</b>
<b>Figure 60 :</b> Résultat du test antifongique de l'ensemble des extraits méthanoliques sur <i>Botrytis cinerea</i>	<b>128</b>
<b>Figure 61 :</b> Evolution de la croissance mycélienne de <i>Botrytis cinerea</i> en fonction des différentes concentrations de l'huile essentielle de <i>Ruta chalepensis</i> durant sept jours d'incubation	<b>133</b>
<b>Figure 62 :</b> Evolution de la croissance mycélienne de <i>FORL</i> en fonction des différentes concentrations de l'huile essentielle de <i>Ruta chalepensis</i> durant sept jours d'incubation.	<b>133</b>
<b>Figure 63 :</b> Evolution de la croissance mycélienne de <i>FORL</i> en fonction de différentes concentrations de l'huile essentielle de <i>Ruta chalepensis</i> durant sept jours d'incubation.	<b>134</b>
<b>Figure 64 :</b> Evolution de la croissance mycélienne de <i>Botrytis cinerea</i> en fonction des différentes concentrations de l'huile essentielle de <i>Ruta angustifolia</i> durant sept jours d'incubation.	<b>134</b>
<b>Figure 65 :</b> Evolution de la croissance mycélienne d' <i>Alternaria solani</i> en fonction des différentes concentrations de l'huile essentielle de <i>Ruta angustifolia</i> durant sept jours d'incubation.	<b>135</b>
<b>Figure 66 :</b> Evolution de la croissance mycélienne de <i>FORL</i> en fonction des différentes concentrations de l'huile essentielle de <i>Ruta angustifolia</i> durant sept jours d'incubation.	<b>135</b>
<b>Figure 67 :</b> Evolution de la croissance mycélienne de <i>FORL</i> en fonction des différentes concentrations de l'huile essentielle d' <i>Haplophyllum tuberculatum</i> durant sept jours d'incubation.	<b>136</b>
<b>Figure 68:</b> Evolution de la croissance mycélienne de <i>Botrytis cinerea</i> en fonction des différentes concentrations de l'huile essentielle d' <i>Haplophyllum tuberculatum</i> durant sept jours d'incubation.	<b>136</b>
<b>Figure 69:</b> Evolution de la croissance mycélienne d' <i>Alternaria solani</i> en fonction des différentes concentrations de l'huile essentielle d' <i>Haplophyllum tuberculatum</i> durant sept jours d'incubation.	<b>137</b>

<b>Figure 70</b> : Taux d'inhibition de la croissance mycélienne des trois souches fongiques <i>vis-à-vis</i> de l'effet de l'huile essentielle de <i>Ruta angustifolia</i> .	<b>138</b>
<b>Figure 71</b> : Taux d'inhibition de la croissance mycélienne des trois souches fongiques <i>vis-à-vis</i> de l'effet de l'huile essentielle d' <i>Haplophyllum tuberculatum</i> .	<b>138</b>
<b>Figure 72</b> : Taux d'inhibition de la croissance mycélienne des trois souches fongiques <i>vis-à-vis</i> de l'effet de l'huile essentielle de <i>Ruta chalepensis</i> .	<b>139</b>
<b>Figure 73</b> : Test antifongique des différentes concentrations de l'huile essentielle d' <i>Haplophyllum tuberculatum vis-à-vis</i> de <i>Botrytis cinerea</i> .	<b>144</b>
<b>Figure 74</b> : Test antifongique des différentes concentrations de l'huile essentielle de <i>Haplophyllum tuberculatum vis-à-vis</i> de <i>FORL</i> .	<b>145</b>
<b>Figure 75</b> : Test antifongique des différentes concentrations de l'huile essentielle de <i>Haplophyllum tuberculatum vis-à-vis</i> d' <i>Alternaria solani</i>	<b>145</b>
<b>Figure 76</b> : Test antifongique de l'huile essentielle de <i>Ruta chalepensis vis-à-vis</i> d' <i>Alternaria solani</i>	<b>146</b>
<b>Figure 77</b> : Test antifongique de l'huile essentielle de <i>Ruta chalepensis vis-à-vis</i> de <i>FORL</i>	<b>146</b>
<b>Figure 78</b> : Test antifongique de l'huile essentielle de <i>Ruta chalepensis vis-à-vis</i> de <i>Botrytis cinerea</i> .	<b>146</b>
<b>Figure 79</b> : Test antifongique <i>in vitro</i> de l'huile essentielle de <i>Ruta angustifolia</i> sur <i>FORL</i> .	<b>147</b>
<b>Figure 80</b> : Test antifongique <i>in vitro</i> de l'huile essentielle de <i>Ruta angustifolia</i> sur <i>Botrytis cinerea</i>	<b>147</b>
<b>Figure 81</b> : Test antifongique <i>in vitro</i> de l'huile essentielle de <i>Ruta angustifolia</i> sur <i>Alternaria solani</i> .	<b>148</b>
<b>Figure 82</b> : <i>Erwinia carotovora</i> en culture et en coloration de Gram(X40).	<b>149</b>
<b>Figure 83</b> : Résultats du test antibactérien (disques et puis) obtenus avec les extraits méthanoliques sur la bactérie <i>Pectobacterium carotovorum</i> .	<b>152</b>
<b>Figure 84</b> : Effet inhibiteur de l'huile essentielle d' <i>Haplophyllium tuberculatum vis-à-vis</i> d' <i>Erwinia carotovora</i> .	<b>153</b>
<b>Figure 85</b> : Effet inhibiteur de l'huile essentielle de <i>Ruta chalepensis pure vis-à-vis</i> d' <i>Erwinia carotovora</i> .	<b>154</b>

# LISTE DES TABLEAUX

## Liste des tableaux

<b>Tableau 1 :</b> Composition biochimique de la tomate crue	<b>8</b>
<b>Tableau 2 :</b> Stratégie de lutte contre les agents phytopatogènes qui attaquent la tomate	<b>26</b>
<b>Tableau 3 :</b> Situation géographiques et climatiques des trois zones d'étude	<b>46</b>
<b>Tableau 4 :</b> Résultats du criblage phytochimique.	<b>75</b>
<b>Tableau 5 :</b> Quantités des coumarines et furocoumarines dans les espèces étudiées (nmol / g matières sèche.	<b>86</b>
<b>Tableau 6:</b> Quantification des coumarines et furocoumarines par UPLC/MS des tiges et des feuilles des trois espèces étudiées(en nmol / g de matières sèche).	<b>87</b>
<b>Tableau 7:</b> Caractéristiques organoleptiques des huiles essentielles des trois espèces étudiées.	<b>97</b>
<b>Tableau 8 :</b> Composition chimique de l'huile essentielle de <i>Haplophyllum tuberculatum</i> analysé par chromatographie par GC/FID	<b>101</b>
<b>Tableau 9 :</b> Composition chimique de l'huile essentielle de <i>Ruta Chalepensis</i> analysé par chromatographie par GC/FID.	<b>102</b>
<b>Tableau 10:</b> Composition chimique de l'huile essentielle de <i>Ruta angustifolia</i> analysé par chromatographie par GC/FID.	<b>103</b>
<b>Tableau 11:</b> DL <sub>50</sub> et la DL <sub>100</sub> des huiles essentielles de <i>Haplophyllum tuberculatum</i> et <i>Ruta.chalepensis</i> , sur les larves de <i>Tuta absoluta</i> .	<b>105</b>
<b>Tableau 12:</b> Valeurs des IC <sub>50</sub> des différents espèces étudiées (en mg/ml).	<b>110</b>
<b>Tableau 13:</b> Analyse de variance entre l'activité antioxydante et la teneur des polyphénols	<b>113</b>
<b>Tableau 14:</b> Caractéristiques organoleptiques et rendements des extraits obtenus.	<b>115</b>
<b>Tableau 15:</b> CMI en mg/ml des extraits de feuilles et tiges des trois espèces vis-à-vis des trois souches fongiques testées	<b>129</b>
<b>Tableau 16 :</b> Résultats du dosage des polyphénols par UPLC.	<b>132</b>
<b>Tableau 17 :</b> CMI <sub>100</sub> en mg/ml des trois espèces de <i>Ruta vis-à-vis</i> de <i>FORL</i> , <i>Botrytis cinerea</i> et <i>Alternaria solani</i> .	<b>140</b>
<b>Tableau 18 :</b> Identification biochimique de <i>Pectubacterium carotovorum</i>	<b>150</b>



# RESUME

## Résumé

Le présent travail vise à étudier la composition chimique des huiles essentielles et de l'extrait méthanolique et évaluer l'activité biologique des tiges et des feuilles de trois espèces végétales: *Haplophyllum tuberculatum*, *Ruta angustifolia* et *R. chalepensis* contre *Fusarium oxysporum*, *Alternaria solani*, *Botrytis cinerea* et *Pectobacterium carotovorum*.

L'étude phytochimique a permis de mettre en évidence l'existence des polyphénols totaux, coumarines, alcaloïdes, flavonoïdes, tannins et sucres réducteurs dans les tiges et les feuilles des trois espèces étudiées. De plus, le dosage spectrophotométrique de l'extrait méthanolique affirme que les feuilles des trois espèces contiennent une teneur élevée en polyphénols et en flavonoïdes comparativement à celles des tiges.

L'extraction, la caractérisation et la quantification des coumarines et furocoumarines par chromatographie liquide à haute pression (UPLC/ MS) a permis de séparer et quantifier pour la première fois plus de quatorze composés dans les tiges et les feuilles des échantillons étudiés.

L'huile essentielle extraite de la plante par hydrodistillation a été analysée par chromatographie en phase gazeuse couplée à un détecteur à ionisation de flamme (CG-FID) pour en déterminer la composition chimique. Les résultats de l'analyse chimique ont montré que *H. tuberculatum* contient principalement : le Pipéritone et B- Germacrène quant à l'huile essentielle de *R. chalepensis* et *R. angustifolia* contient majoritairement : le 2-Undécane et le 2-Nonane.

Le test du DPPH, a révélé une bonne efficacité antioxydante surtout pour les feuilles de *R. angustifolia* et *R. chalepensis*  $IC_{50} = (0,00183 \pm 0,00027)$  et  $(0,00425 \pm 0,00044)$  mg/ml respectivement ; cette dernière reste supérieure à la capacité de piégeage du radical DPPH de l'acide ascorbique, dont l' $IC_{50} = (0,0094 \pm 0,00372)$  mg/ml.

Les extraits méthanoliques des feuilles et des tiges des trois espèces n'ont révélé aucun effet contre *Pectobacterium carotovorum*, en revanche quelques zones d'inhibitions modérées en présence de l'huile essentielle pure de *R. chalepensis* et *H. tuberculatum* estimées à  $(13 \text{ mm} \pm 0,57)$  et  $(13,33 \text{ mm} \pm 0,57)$  ont été enregistrées.

Les résultats de l'activité antifongique réalisée par la méthode de diffusion sur disques paraissent intéressants dont le plus important était celui obtenu avec *Botrytis cinerea* qui s'est montré hautement sensible *vis-à-vis* de toutes les doses utilisées. Le taux d'inhibition de ce champignon a révélé une inhibition de 100% pour les deux extraits étudiés. Cette activité antifongique peut être attribuée à la prédominance de la rutine, détectée par UPLC/MS dans les tiges et les feuilles de *R. angustifolia* et *R. chalepensis*.

En outre, le test de contact réalisé sur les larves de différents stades de *Tuta absoluta* a montré que l'huile essentielle de *R. chalepensis* et *H. tuberculatum* manifestent un effet insecticide *vis-à-vis* de *Tuta absoluta* avec un taux de mortalité corrigée de 40% pour *Ruta chalepensis* à la concentration de 10 µ/ml et 55% pour *Haplophyllum tuberculatum* à la concentration de 10 µ/ml.

**Mots clés :** *Haplophyllum tuberculatum*, *Ruta angustifolia*, *Ruta chalepensis*, huile essentielle, extrait méthanolique, activité biologique, phytochimie.

## ABSTRACT

The present work aims to study the chemical composition of essential oils and methanolic extract and to evaluate the biological activity of trees and leaves of three species, these are: *Haplophyllum tuberculatum*, *Ruta angustifolia* and *Ruta chalepensis* against *Fusarium oxysporum*, *Alternaria solani*, *Botrytis cinerea* and *Pectubacterium carotovorum*.

The phytochemical study shows the existence of total polyphenols, coumarins, alkaloids, flavonoids, tannins and reducing sugars in the stems and leaves of the three species studied. In addition, the spectrophotometric assay of the methanolic extract asserts that the leaves of the three species contain a high content of polyphenols and flavonoids

The extraction, characterization and quantification of coumarins and furocoumarines by high-pressure liquid chromatography (UPLC / MS) made it possible to separate and quantify for the first time more than fourteen compounds in the stems and leaves of the subjects studied.

The essential oil extracted from the plant by hydrodistillation was analyzed by gas chromatography coupled to a flame ionization detector (CG-FID) to determine the chemical composition. The results of the chemical analysis showed that *H. tuberculatum* contains mainly: Piperitone and B-Germacre as regards the essential oil of *R. chalepensis* and *R. angustifolia* contains mainly 2-Undecanone and 2-Nonanone.

The DPPH test, revealed a good antioxidant efficacy especially for the leaves of *R. angustifolia* and *R. chalepensis*  $IC_{50} = (0.00183 \pm 0.00027)$  and  $(0.00425 \pm 0.00044)$  mg / ml respectively; the latter remains greater than the trapping capacity of the radical DPPH of ascorbic acid, whose  $IC_{50} = (0.0094 \pm 0.00372)$  mg / ml).

The methanolic extracts of the leaves and stems of the three species showed no effect against *Pectobacterium carotovorum*, on the other hand some areas of moderate inhibition in the presence of the pure essential oil of *R. chalepensis* and *H. tuberculatum* estimated at  $(13\text{mm} \pm 0.57)$  and  $(13.33 \text{ mm} \pm 0.57)$  were recorded.

The results of the disk diffusion method appear interesting, the most important of which was that obtained with *Botrytis cinerea* which was highly sensitive to all the doses used. The inhibition rate of this fungus revealed a 100% inhibition for the two extracts studied. This antifungal activity can be attributed to the dominance of rutin, detected by UPLC / MS in the stems and leaves of *R. angustifolia* and *R. chalepensis*.

In addition, the contact test carried out on larvae of different stages of *Tuta absoluta* showed that the essential oil of *R. chalepensis* and *H. tuberculatum* showed an insecticidal effect against *Tuta absoluta* with a corrected mortality rate. 40% for *R. chalepensis* at a concentration of  $10 \mu / \text{ml}$  and 55% for *H. tuberculatum* at a concentration of  $10 \mu / \text{ml}$ .

**Keywords:** *Haplophyllum tuberculatum*, *Ruta angustifolia*, *Ruta chalepensis*, essential oil, methanolic extract, biological activity, phytochemistry.

## الملخص

يهدف هذا العمل إلى دراسة التركيب الكيميائي للزيوت الأساسية و المستخلص الميثانولي وتقييم النشاط البيولوجي للسيقان وأوراق ثلاثة أنواع من النباتات و هي: *Ruta angustifolia*، *Haplophyllum tuberculatum* و *R. chalepensis* ضد *Ruta* *Fusarium oxysporum*، *Alternaria solani*، *Pectobacterium carotovorum*، *Botrytis cinerea*،

الدراسة الكيميائية اثبتت وجود : البوليفينول، الكومارين، قلويدات، الفلافونويد، السكريات في سيقان وأوراق النباتات المدروسة. وبالإضافة إلى ذلك فإن الفحص الطيفي للمستخلص الميثانولي يؤكد أن أوراق الأنواع الثلاثة تحتوي على نسبة عالية من البوليفينول والفلافونويد مقارنة مع السيقان.

استخراج وتوصيف وتقدير الكومارين و فوروكومارينس بواسطة UPLC / MS سمح بفصل وتحديد الكمية ولأول مرة لأكثر من أربعة عشر مركب في أوراق و سيقان العينات المدروسة.

تحليل الزيوت الأساسية المستخرجة من النبات بواسطة كروماتوجرافيا الغاز إلى جانب كاشف تأين اللهب اتبت وجود توبيركولاتوم بيبيريون و جيرماكرين عند *H. tuberculatum* . اما فيما يخص التحليل الكيميائي لكل من *R. angustifolia* و *R. chalepensis* فقد اظهر وجود 2- وندكانون و 2-نونانون .

نشاط مضاد الاكسدة و ذلك باستعمال طرق الأكسدة الجذري 2 ، 2ديفنيل 1 بيكغيدرازيل اظهر فعالية ملحوظة لأوراق *Ruta angustifolia* و *R. chalepensis* و التي هي على التوالي  $(0,00425 \pm 0,00044)$  et  $(0,00183 \pm 0,00027)$  ملغ / مل، هذه الاخيرة لا تزال كميتها اكبر من قدرة حمض الاسكوربيك  $(0,0094 \pm 0,00372)$ .

أظهرت المستخلصات الميثانولية من اوراق والسيقان النباتات المدروسة عدم وجود تأثير ضد *Pectobacterium carotovorum* ، مع وجود تثبيط معتدل في وجود الزيوت الأساسية النقية لكل من *R. chalepensis tuberculatum* *H.* المقدرة ب  $(13, 33 \pm 0, 57)$   $(13 \pm 0, 57)$

نتائج النشاط البكتيري تظهر مثيرة للاهتمام والأهم من ذلك الذي تم الحصول عليها في وجود *Botrytis cinerea* و التي كانت حساسة لجميع الجرعات المستخدمة. أظهر معدل تثبيط هذا الفطر تثبيطاً 100٪ للمستخلصين المدروسين. و سبب هذا النشاط الفطري يعود إلى وجود روتين و الذي تم الكشف عنه من قبل UPLC/MS في سيقان وأوراق *R. chalepensis* و *R. angustifolia*

بالإضافة إلى ذلك أظهرت الاختبارات التي أجريت على البرقات من مراحل مختلفة من *Tuta absoluta* أن الزيوت الأساسية ل *R. chalepensis* و *H. tuberculatum* تأثير مبيد الحشرات في مواجهة هذه الحشرة مع معدل الوفيات يقدر ب 40٪ لى *R. chalepensis* و 55٪ بالنسبة الى *H. tuberculatum* بتركيز 10 ميكروغرام / مل.

**مفاتيح الكلمات:** *Haplophyllum tuberculatum*، *Ruta angustifolia*، *Ruta chalepensis* ، كيمياء العقاقير، الزيوت الأساسية، النشاط البيولوجي.

# INTRODUCTION

## Introduction générale

La tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) est l'une des cultures les plus répandues universellement. Elle a une très grande importance économique en Algérie et dans le monde. Elle occupe le deuxième rang parmi les légumes les plus commercialisés au niveau du marché international. Toutes les communautés se forcent à augmenter la production de cet aliment si utile pour garantir leur autosuffisance. La production mondiale de tomates a progressé régulièrement au cours des dix dernières années, elle est passée à plus de 100 millions de tonnes en 2009 et à 130 millions de tonne en 2014 (FAO, 2015).

Actuellement, 1/3 de la production agricole mondiale est détruite d'une année à une autre à cause des différents ravageurs tels que les insectes et les maladies fongiques et bactériennes, qui causent d'énormes dégâts de la culture du semis, jusqu'à leurs commercialisations.

Parmi les ravageurs qui attaquent la tomate, un nouveau bioagresseur est observé ces dernières années, il cause des pertes considérables aussi bien sous serre qu'en plein champs : c'est la mineuse de la tomate : *Tuta absoluta*. En outre, selon plusieurs chercheurs, l'insecte présente une très grande résistance à plusieurs insecticides, et sa lutte demeure très difficile.

Parallèlement, la fusariose, l'alternariose, la pourriture grise et la pourriture molle font partie des maladies les plus destructives de la tomate. Ces maladies sont causées par les agents pathogènes suivants: *Fusarium oxysporum*, *Alternaria solani*, *Botrytis cinerea* et *Pectubacterium carotovorum*. La pathogénicité de ces derniers évolue avec le temps. Alors que leurs résistances développées *vis-à-vis* des produits phytosanitaires rendent leurs contrôles difficiles.

Pour augmenter le rendement et éviter les pertes post-récolte, les producteurs agricoles ont de plus en plus recours aux pesticides chimiques induisant automatiquement à une pollution accrue sur l'environnement. Par ailleurs, dans un contexte focalisé sur le respect de l'environnement et la santé publique, les stratégies de lutte tendent à privilégier des pratiques limitant les intrants notamment l'utilisation de pesticides chimiques.

En associant la connaissance traditionnelle des plantes riches en métabolites secondaires, la recherche scientifique sur leurs constituants actifs et les observations *in-vitro* de leur effet antimicrobien, il est possible de dresser une stratégie d'exploitation des plantes ayant cette particularité dans le domaine de la lutte biologique contre les maladies des cultures.

De part sa situation géographique particulière, l'Algérie bénéficie d'une gamme très variée de climats favorisant le développement d'une flore riche et diversifiée. En effet, le territoire Algérien couvre d'importantes ressources végétales réparties sur les côtes, les plaines, les montagnes, la steppe, et le Sahara.

La flore algérienne avec plus de 3000 espèces est à ce jour peu explorée. Plusieurs plantes aromatiques ont été révélées comme antimicrobiennes au cours des recherches récemment réalisées. Certaines d'entre elles ont fait l'objet d'études phytochimiques et ont abouti à l'isolement et à l'identification de diverses catégories de molécules qui confirment solidement les propriétés décrites ci-dessus.

Tout en encourageant la revalorisation des substances d'origine végétale en Algérie, l'exploration de cette richesse floristique présente dans nos différents écosystèmes pourrait aboutir à l'homologation de nouveaux pesticides à base de plantes qui sont très riches en métabolites secondaires.

Du fait de leurs abondances dans la nature et de leurs utilisations par les populations locales pour se soigner. Trois espèces différentes de la famille des Rutacées font l'objet de ces essais : la rue d'Alep (*Ruta chalepensis*), la rue à feuille étroite (*Ruta angustifolia*) et la rue saharienne (*Haplophyllum tuberculatum*) réparties sur trois zones géographiques distinctes (la côte de Mostaganem, les hautes plaines de Bordj Bouareridj et le Sahara d' Adrar).

Les aptitudes que possèdent les plantes de cette famille les rendent intéressantes dans la recherche de substances végétales éventuellement efficaces contre les pathogènes choisis pour cette étude. Les extraits naturels par la diversité des constituants qui composent ces plantes, sont des substances très actives et pourrait constituer à ce titre une source inépuisable. La qualité de ses derniers dépend d'un grand nombre de facteurs d'ordre naturel (génétique, localisation, période de récolte, sol, climat, etc...) ou technologiques (méthode d'extraction utilisée).

Ces produits, à structure chimique souvent complexe, sont très variés et très différents selon les espèces. Dans le cas de notre étude, les rutacées sont connues par leurs activités : antibactérienne, antifongique, insecticides et antioxydantes. Ce pouvoir est dû essentiellement à leurs richesses en molécules biologiquement actives, parmi ces substances: les polyphénols et plus précisément les flavonoïdes, les coumarines et les furocoumarines qui constituent l'un des groupes les plus importants et qui interviennent dans l'ensemble dans plusieurs activités biologiques (Haddouchi et *al.*, 2013) .

Les travaux réalisés par certains auteurs (Vyan, 2002 ; Hale *et al.*, 2004 ; Fabian *et al.*, 2006 ) ont relevés les propriétés antiseptiques des extraits naturels de plusieurs plantes médicinales et aromatiques contre des agents pathogènes. Cependant, très peu d'études ont été réalisées jusqu'à ce jour concernant l'effet biologique des extraits naturels de la rue sur des agents phytopatogènes d'où l'intérêt de ce travail, qui vise à analyser qualitativement et quantitativement les deux extraits de trois espèces de la rue et évaluer le potentiel antioxydant et l'activité antimicrobienne des extraits méthanolique et huile essentiel préparés à partir de la partie aérienne des trois espèces : *Haplophyllum tuberculatum*, *Ruta angustifolia* et *Ruta chalepensis*.

Les principales parties de ce travail se résument comme suit :

- La première partie a été essentiellement consacrée aux données bibliographiques, dont le premier chapitre aborde des études antérieures incluant la présentation de la plante hôte (*Lycopersicon esculentum* Mill) et ses ravageurs. Quant au deuxième chapitre, il présente une synthèse bibliographique sur la composition chimique et l'activité biologique des trois espèces étudiées et le troisième chapitre porte sur l'utilisation des extraits dans la lutte biologique.
- La deuxième partie traite la partie expérimentale, incluant les différentes techniques (Matériels, méthodes, matériels biologiques.....).
- La troisième partie a été consacrée à la présentation des résultats phytochimiques et biologiques obtenus et leurs interprétations, suivie de la discussion.
- Enfin, une conclusion avec une synthèse des résultats obtenus et des perspectives devant faire l'objet de futures travaux.

PREMIERE PARTIE :  
SYNTHESE  
BIBLIOGRAPHIQUE

CHAPITRE I :

LA PLANTE HÔTE ET  
SES RAVAGEURS

### I-1- Origine et Historique

La tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill) est originaire des Andes d'Amérique du Sud, dans une zone allant du sud de la Colombie au Nord du Chili et de la cote Pacifique, aux contreforts des Andes (Equateur, Pérou). Elle fut découverte par Mathiolus en 1554, domestiquée au Mexique puis introduite en Europe au 16<sup>ème</sup> siècle via l'Espagne (Naika et al., 2005). Elle s'est ensuite propagée en Asie du Sud et de l'Est, en Afrique et en Moyen-Orient (Shankara et al., 2005).

En Algérie, ce sont les cultivateurs du Sud de l'Espagne (Tomateros), qui l'ont introduite en raison des conditions climatiques qui sont propices pour sa culture. Quant à sa consommation, elle a commencée dans la région d'Oran en 1905 puis, elle s'étendit vers le centre, notamment au littoral algérois (Latigui, 1984).

Sa culture sous serre connaît un grand essor dans la région saharienne et principalement dans les Zibans (Biskra) qui est classé comme premier producteur à l'échelle national (DSA, 2014).

### I-2- Classification botanique

Elle est classée selon des critères différents liés à l'aspect botanique, la composition génétique et le type de croissance (Gallais et Bannerot, 1992).

Les botanistes modifièrent à plusieurs reprises les noms de genre et d'espèce attribués à la tomate. Elle a été classée par Linné en 1753, comme *Solanum lycopersicon*, d'autres botanistes lui ont attribué différents noms : *Solanum lycopersicon*, *Solanum esculentum*, *Lycopersicon licopersicum* ; c'est finalement *Lycopersicon esculentum* attribué par Philippe Miller en 1754, qui a été retenu (Munroe et Small, 1997).

Selon Spichiger *et al.* (2004) et Dupont et Guignard, (2012) la tomate appartient à la classification suivante :

Règne :        Plantae  
Sous règne : *Trachenobionta*  
Division :    *Magnoliophyta*  
Classe :       *Magnoliopsida*  
Sous classe : *Asteridae*  
Ordre :        *Solanales*  
Fmille :       *Solanaceae*  
Genre :        *Lycopersicum*  
Espèce :       ***Lycopersicum esculentum* Miller.**

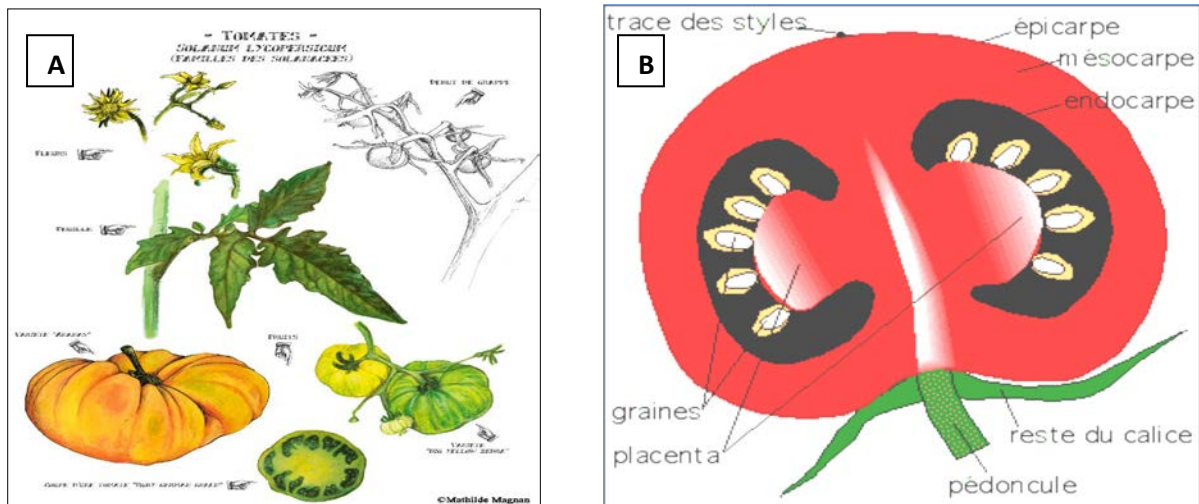
### I-3- Caractéristique botanique de la tomate

La tomate est une plante herbacée annuelle, diploïde à  $2n=24$  chromosomes appartenant à la famille des Solanaceae. Les racines sont très développées avec une racine centrale pivotante pouvant atteindre une longueur de 100 à 150 cm. Le système racinaire est relativement superficiel, environ 70% du volume racinaire est situé dans les premier 20cm du profil du sol. Les tiges de la plantes sont souvent retombantes ou légèrement dressé, lignifiée à ramification secondaires, elle peut atteindre 50-200 cm, selon les variétés et les conditions de culture (Judd et *al.*, 2002).

Les feuilles présentent une phyllotaxie à disposition alternée, et sont de forme composée. La fleur est hermaphrodite. Le calice comporte six sépales, six corolles réunies formant un tube entourant le pistil. La pollinisation s'effectue par autogamie. Les fruits sont généralement rouges, il existe des variétés jaunes violacées et même blanches (Went ,1957)

Les fruits de la tomate sont des baies charnues, de formes globulaires ou aplaties avec un diamètre de 2 à 15 cm (Fig. 1). Ils sont ronds et réguliers ou côtelés. En général, les fruits murs varient du jaune au rouge en passant par l'orange, selon la variété (Naika et *al.*, 2005).

Les graines sont nombreuses, en forme de rein ou de poire, poilues, beiges, de 3 à 5 mm de long et de 2 à 4 mm de large. L'embryon est enroulé dans l'albumen. Chaque fruit contient un nombre important de graines qui varie entre 80-500 graines par fruit (Shankara, 2005).



**Figure 1:** (A) illustration des différentes parties qui constituent la tomate. (B) Coupe transversale représentant les différentes parties du fruit (Prat et *al.*, 2005).

#### **I-4- Principales exigences écologiques et climatiques de la plante**

*Lycopersicon esculentum* Mill est une plante des climats tempérés et chauds. Sa température idéale de croissance se situe entre 20-25° C le jour, 13-17° C la nuit, Elle craint le gel et modérément tolérante à une grande variation de pH. Un pH de 6,5-7,0 est préféré bien que les plantes de tomates fassent bien dans des sols plus acides avec un apport nutritif en proportions équilibrées. La tomate est confrontée à une contrainte majeure qui est la sensibilité aux froids, elle ne supporte pas les températures inférieures à 2°C et redoute les gelées et le vent chaud (Naika et *al.*, 2005).

Sa période de végétation est assez longue, qui dure entre cinq et six mois entre le semis et la première récolte. La multiplication de la plante se fait par semis, vers le mois de Février à Mars.

C'est une culture très exigeante qui demande un sol profond et bien fumé et bien ameubli en profondeur (Polese, 2007).

#### **I-5- Production de la tomate**

##### **I-5-1- Production mondiale de la tomate**

La tomate est cultivée dans presque tous les pays du monde, sa production est répartie dans toutes les zones climatiques, y compris dans des régions relativement froides grâce au développement des cultures sous abri. A l'échelle mondiale la tomate est classé deuxième culture légumière après la pomme de terre de par son volume de production.

La tomate est produite pour deux marchés distincts : la tomate de marché pour la consommation en frais et la tomate d'industrie pour la transformation et la conserve. l'Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture a publié des données en 2014 et qui révèlent une augmentation de la production mondiale de tomates par rapport à l'année précédente, atteignant 7031 millions de kilos, soit une augmentation de 4,29 pour cent (FAO,2014).

Plus de la moitié de cette production provient d'Asie et notamment de Chine. L'Europe produit près de 13% de la production mondiale ce qui représentait un peu moins de 21 millions de tonnes en 2013. C'est en Europe que l'on trouve les meilleurs rendements mondiaux sur la culture de la tomate. Le rendement européen augmente tous les ans même si la quantité produite chaque année reste globalement la même (France Agrimer, 2014).

### **I-5-2- Production de la tomate en Algérie**

En Algérie, la tomate occupe une place privilégiée dans l'économie agricole Algérienne avec près de 33 000 ha cultivés annuellement et une production de un million de tonnes de tomates fraîches (FAO, 2014). Sa production est en plein expansion, à la faveur de nombreux programmes mis en place par le ministère de l'agriculture et du développement rural. A cet effet, de nouvelles techniques de productions sont introduites ces dernières années permettant plus de rendement à l'hectare. Les statistiques de l'année 2009 établie par le Ministère de l'agriculture font état d'une superficie globale de tomate maraichère cultivée de 21 320 Ha avec un rendement de 6.5 millions de quintaux et les wilayas les plus productrices de la tomate maraichère sont : Tipaza, Alger, Chlef, Mostaganem, El-Bayad, Biskra et pour la tomate industrielle les wilayas les plus productrices sont : Skikda, Guelma, El-Taref et Annaba (MADR, 2009).

### **I-6- Composition chimique et valeur nutritionnelle**

La tomate est un aliment diététique, très riche en eau (93 à 95%), en éléments minéraux et en oligo-éléments (Tab. 1). Parmi les minéraux de la tomate, le potassium domine largement, suivi par le chlore, le phosphore et le magnésium. Parmi les oligo-éléments, on peut noter des teneurs non négligeables en fer et en zinc, ainsi que des traces de cobalt, de nickel, de fluor, de bore et de sélénium. Les vitamines du groupe B sont assez abondantes et toutes représentées y compris la vitamine B8 et l'acide folique (B9). Par contre, ce fruit ne renferme que de faibles quantités de glucides (3%), de protéines (moins de 1 %) et seulement des traces de lipides. De ce fait, elle est pauvre en calories (15 Kcal pour 100 g, soit 63 kJoules) (Favier *et al.*, 2003).

Plusieurs études récentes associent la consommation de tomates et de ses produits dérivés à une réduction des risques de contracter des cancers et des maladies cardiovasculaires. Cet effet protecteur a été principalement attribué à ses précieux composants bioactifs avec propriétés antioxydants (Borguini et Torres, 2009) comme les carotènes (lycopène qui donne leur couleur rouge aux tomates ainsi que  $\beta$ -carotène), l'acide ascorbique, tocophérol et les composés phénoliques (Periago *et al.*, 2009). Le lycopène le plus puissant antioxydant caroténoïdien a montré d'autres effets bénéfiques sur la santé tels que l'induction de la communication entre les cellules, la modélisation des hormones du système immunitaire et d'autres voies métaboliques. Il neutralise, plus efficacement, le radical libre, particulièrement agressif, dérivé de l'oxygène. Alors que les composés phénoliques (comme la rutine et l'Ac chlorogénique) présentent un large éventail de propriétés physiologiques

comme des anti-allergéniques, anti-inflammatoires, anti- microbien, antithrombotique, anti-athérogène et effets cardioprotecteurs et vasodilatateurs (Balasundram *et al.*, 2006).

**Tableau 1** : Composition biochimique de la tomate crue (Teneur par 100 g) (Ciqua,2013).

Energie (kcal)	18
Energie (KJ)	77
Eau (g)	93 ,3
Glucides disponibles (g)	3,2
Fibres alimentaires (g)	1,3
Lipides (g)	0,2
Protéines (g)	0,9
Sodium (g)	6
Potassium (g)	245
Magnésium (g)	11
Phosphore (g)	25
Calcium (g)	10
Fer (g)	0,4
Carotène (µg)	600
Lycopène (mg)	6

## **I-7- Principaux bioagresseurs de la tomate**

Comme toutes les cultures ; la tomate est sujette à l'attaque de plusieurs ravageurs et agents phytopathogènes appartenant à différents groupes d'organismes vivants. Ils constituent donc une menace importante pour la culture de la tomate, pouvant ainsi provoquer des pertes économiques considérables. La culture de tomate peut être affectée par plusieurs maladies : maladie cryptogamiques, bactériennes, virales, insecticides et physiologiques en raison de l'humidité et de la température ambiante (Trottin-caudal, 2011).

### **I-7-1- Les agents phytopathogènes et ravageur étudiés**

#### **I-7-1-1- *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis lycopersici***

##### **I-7-1-1-1- Le Genre *Fusarium***

Le genre *Fusarium* tire son nom du latin *fusus* car ses spores sont en forme de fuseau. La première et véritable description du genre *Fusarium* a été réalisée par Link en 1809, ce dernier a créé le genre pour des espèces présentant des spores (macroconidies) cloisonnées, fusiformes, formées sur des stromas. Le genre *Fusarium* regroupe un grand nombre d'espèces, présentant une spécificité parasitaire pour une large gamme de plante hôtes (Ozenda, 1990) et responsable des maladies connues sous le terme de « fusarioses »

Sur la tomate (fusariose de la tomate) on distingue *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis lycopersici* qui attaque les parties racinaires et *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* qui attaque les parties aériennes de la plante (Pitt et Hocking, 1997).

#### **I-7-1-1-2- Taxonomie**

La diversité et l'extrême variabilité des champignons appartenant au genre *Fusarium* expliquent les difficultés rencontrées dans leur classification, d'où de nombreux systèmes taxonomiques.

Ainsi, les travaux de Wollenweber et Rincking(1935), qui ont servi de références, ont pu décrire 65 espèces, 55 variétés et 22 formes, rassemblées en 16 sections et 6 sous-sections.

Le genre *Fusarium* a été profondément revu par Synder et Hansen (1940), Messiaen et Cassini (1968,1981) et Henni et al. (1994).

Aujourd'hui et grâce à l'utilisation des techniques de la biologie moléculaire, la systématique des *Fusarium* a considérablement évolué et ces derniers sont considérés comme les formes asexuées de plusieurs espèces d'Ascomycètes.

#### **I-7-1-1-3- *Fusarium oxysporum***

##### **I-7-1-1-3-1- Systématique**

Depuis la description du genre *Fusarium* par Link (1809), de nombreux travaux ont été consacrés à la taxonomie de ce champignon. Selon la classification de Wollenweber et Reinkin (1935), le genre *Fusarium* est subdivisé en 16 sections regroupées en 9 espèces phytopathogènes.

Embranchement	Thallophytes
Classe	Deutéromycètes
Ordre	Moniliales
Famille	<i>Tuberculariacea</i>
Genre	<i>Fusarium</i>
Espèce	<b><i>Fusarium oxysporum</i>.</b>

### **I-7-1-1-3-2- Description macroscopique et microscopique de *Fusarium oxysporum***

*Fusarium oxysporum* est un champignon vasculaire, imparfait avec un mycélium septé aérien, généralement blanchâtre ou rosâtre, il peut prendre d'autres pigmentations (violette, mauve, orange ou belge) qui sont dues à la formation d'une multitude de spores en surface par des organes fructifère, ainsi qu'aux variations de la lumière du milieu de culture (Messaoudi et al., 1989)

Le *Fusarium oxysporum* fait partie du groupe des champignons imparfaits chez lesquels la phase sexuée n'existe pas ou, du moins, n'a jamais été observée. Il produit trois types de spores asexuées produites par des sporodochies ou des sclérotés : les microconidies, les chlamydospores, et les macroconidies (Assigbest, 1993). En plus, la production de plusieurs enzymes qui agissent sur les pectines et la cellulose composant les parois cellulaires de la plante comme : les pectinases, les pectines méthyl esterase (PME), les polygalacturonases (PGS), les pectate lyases (PLS), les cellulase et les hemicellulases). L'hydrolyse de la pectine en acide pectique conduit à la formation d'une masse gluante qui bouche les vaisseaux et bloque la circulation de la sève (Semal, 1989). Les champignons du genre *Fusarium* synthétisent également des toxines responsables de l'augmentation de la perméabilité cellulaire et d'une importante transpiration des plantes atteintes comme : les lycomarasmine et de l'Acide fusarique) et qui facilite la classification des différentes espèces du champignon (Cobaz, 1990).

### **I-7-1-1-3-3- Plantes hôtes**

*Fusarium oxysporum* est un champignon d'origine tellurique très ubiquiste, qui présente une très grande diversité génétique et écologique et qui infectent collectivement plus de 100 hôtes différents, provoquant des pertes économiques importantes chez de nombreuses plantes cultivées comme le bananier, le cotonnier, le melon, la tomate, etc provoquant ainsi des maladies sur de nombreuses espèces végétales cultivées d'intérêt économique (Armstrong et Armstrong, 1965).

### **I-7-1-1-3-4- Les maladies causées par *F. oxysporum***

*Lycopersicon esculentum* est sujette à deux maladies fusariennes :

#### **I-7-1-1-3-4-1- La flétrissure fusarienne classique (*Fusarium wilt*) causée par *Fusarium oxysporum f.sp lycopersici***

Le flétrissement vasculaire est plus sévère dans des conditions chaudes du sol et dans les serres. Les symptômes développés sont le résultat d'un stress sévère d'eau (Bouhot and Lefebvre, 1972).

La tomate est souvent cultivée en serre ou les températures élevées du sol massif des vaisseaux conducteurs dans lesquels le champignon sporule. Les microconidies sont transportées de façon passive par le flux du xylème et peuvent ainsi infecter des parties aériennes. La présence de mycélium et de ces conidies ainsi que les réponses locales de la plante (formation des tyloses, gommages) vont causer un blocage du transport d'eau dans les vaisseaux et donc des symptômes de flétrissement sont observés sur la plante (Messiaen and Cassini, 1981).

#### **I-7-1-1-3-4-2- La pourriture des racines et du collet causée par *Fusarium oxysporum f.sp.radicis-lycopersici* (FORL)**

Découverte pour la première fois au Japon en 1969 (Menzies et Javis, 1994), la maladie est présente aujourd'hui dans plusieurs pays du globe terrestre.

Ce champignon décasteur est avant tout inféodé au système racinaire de la plante de la tomate, sur lequel il provoque, dans un premier temps, de nombreuses lésions brun rougeâtres humides, développement d'un chancre brun sur un seul côté de la tige et du collet en forme d'une flamme. A la suite de ces altérations, des symptômes de flétrissement et de jaunissement apparaissent à la périphérie du limbe des vieilles feuilles (Fig. 2), suivit de la nécrose des pétioles et de chute des feuilles (Blancard et *al.*, 2013).



**Figure 2:** Symptômes de *Fusarium oxysporum* sur fruits (A), tiges(B) et feuilles(C) de la tomate (Blancard et *al.*, 2013).

### **I-7-1-2- *Botrytis cinerea***

#### **I-7-1-2-1- Position taxonomique**

Le nom *Botrytis cinerea* a été donné par Persoon en 1801 à un agent pathogène de la vigne. Ce champignon comme beaucoup d'autres connaît une double classification:

**A**—une forme parfaite (téleomorphe), *Botryotinia fuckeliana* (de Barry) Wetzl. C'est un Ascomycète, de la classe des Discomycètes, de l'ordre des Léotiales, famille des Sclerotiniaceae

**B**— une forme imparfaite (anamorphe), *Botrytis cinerea* Pers. C'est un Deutéromycète de la classe des Hyphomycètes, de l'ordre des Moniliales, famille des Moniliaceae (Martinez et al., 2005).

C'est De Bary (1866) qui a établi une relation génétique entre *Botrytis cinerea* Pers, organisme asexué, et *Botryotinia fuckeliana* appelé au départ *Peziza fuckeliana*, organisme sexué. Groves et Drayton (1939) ont observés pour la première fois, *in vitro*, la formation d'apothécies par *B. cinerea* confirmant le lien systématique entre les deux formes du champignon. C'est cependant le nom de *B. cinerea*, largement connu par les mycologistes et phytopathologistes qui fut retenu alors que généralement le nom scientifique d'un champignon est donné par sa forme sexuée.

#### **I-7-1-2-2- Position systématique de *Botrytis cinerea***

Selon Christiaan Hendrik Persoon (1974), *Botrytis cinerea* se classe comme suit:

Règne : Fungi  
Division : Ascomycota  
Classe : Leotiomycetes  
Ordre : Helotiales  
Famille : *Sclerotiniaceae*  
Genre : *Botrytis*  
Espèce : ***Botrytis cinerea***.

#### **I-7-1-2-3- Description macroscopique et microscopique de *Botrytis cinerea***

Au cours de son cycle biologique, *B. cinerea* peut produire du mycélium, des spores asexuées ou conidies, des spores sexuées ainsi que des sclérotos.

Le mycélium de *B. cinerea* comprend des filaments articulés, grisâtres ou olivâtres, cylindriques, quelquefois vésiculeux au niveau de la cloison médiane, dont le diamètre varie

considérablement suivant les conditions de développement des hyphes. Lorsque le mycélium est au stade de fructification, il produit des touffes de conidiophores grisâtres. Parfois, ce mode de multiplication peut disparaître et laisser place à une prolifération mycélienne blanche qui correspond à l'élongation d'hyphes grêles, hyalins qui se répandent sous forme de "toile". Le mycélium peut se conserver dans les débris de plantes de la culture précédente (Viennot-Bourgin, 1965).

Lorsque les conditions deviennent favorables, *B. cinerea* fructifie pour donner des conidies. Elles prennent une part importante dans la dissémination du champignon. Leur libération est favorisée par un climat humide, puis elles sont transportées par le vent, la pluie et les insectes (Holz *et al.*, 2004).

Lorsque les conditions deviennent défavorables au développement de mycélium et de conidies, des sclérotés se forment. Ils sont constitués par du mycélium agrégé blanchâtre. En vieillissant, ils durcissent et deviennent noirâtres (Elad, 2007).

#### **I-7-1-2-4- Plantes hôtes**

*Botrytis cinerea* est un champignon polyphage capable d'attaquer plus de 230 espèces de plantes (Jarvis, 1980). Il affecte de nombreuses productions végétales d'importance économique en culture sous serre ou en plein champ, comme par exemple: le raisin, la pomme, la poire, la cerise, la fraise et le kiwi en production fruitière, l'aubergine, la carotte, la laitue, le concombre, le poivron, la tomate, la courgette en production légumière ou des plantes ornementales comme la rose, le gerbera ou le cyclamen (Gullino, 1992).

#### **I-7-1-2-5- La pourriture grise**

*Botrytis cinerea* est l'agent responsable de la pourriture grise une maladie très répandue dans les cultures de tomates sous abri et qui apparaît dans des conditions d'humidité élevée pendant une longue période. Les spores germent à partir de 18-23° C et un taux d'humidité relative a plus de 95%. La conidie émet alors un tube germinatif qui se différencie rapidement en une cellule spécialisée, l'appressorium, qui va pénétrer dans les tissus de la plante hôte. Ce dernier peut traverser la cuticule mais sait aussi profiter d'une légère blessure pour s'introduire. D'autres structures se présentant sous la forme d'appressoria multi-lobés ont également été observées lors de l'infection (Holz *et al.*, 2004).

Le champignon a plusieurs armes chimiques à sa disposition: des enzymes de haut poids moléculaire qui percent la paroi et la membrane cellulaire et conduisent à la décomposition des tissus : des enzymes pectiques dégradant telles que la pectine estérase de

méthyle, de pectine lyase et d'un certain nombre de différentes polygalacturonases. Des toxines sesquiterpéniques ayant un squelette de botryane (principalement du botrydial et du dihydrobotrydial et leurs dérivés) qui sont des facteurs de virulence importants. Une fois rentré, le champignon détruit les cellules sous-jacentes. Au fur et à mesure et même au devant de sa progression. On le qualifie de nécrotrophe, en raison de cette faculté de pouvoir détruire les tissus avant de les coloniser, de se nourrir de tissus morts et de pouvoir progresser parmi eux (Alfonso, 2011).

Les symptômes observable sur fleurs, tiges, feuilles, se traduisent généralement par l'apparition des taches en anneaux concentriques plus foncées et un feutrage gris due a une production importante de spores stagnant, sur fruits verts ou rouges des anneaux translucides à blanc , présentant au centre un point nécrotique (Fig. 3), peuvent aussi être observées avec un pourrissement des tissus infectés; elle sont témoins de tentatives d'attaque du fruit contre ce champignons aérien (Blancard et *al.*,2013).



**Figure 3:** Symptômes de *Botrytis cinerea* sur : (A) fruits, (B) feuilles, (C) tiges de la tomate (Blancard et *al.*, 2013).

### I-7-1-3- *Alternaria solani*

Les *Alternaria* sont des champignons fréquents dans notre environnement. Ils appartiennent aux moisissures atmosphériques. Ils peuvent être isolés de végétaux très divers. *Alternaria* comprend près de 275 espèces (Simmons, 2007) avec des modes de vie saprophytes et phytopathogènes qui peuvent affecter les cultures sur champs ou les produits végétaux pendant le récolte et poste récolte (Logrieco et *al.*, 2009). Les températures élevées (18 à 25° C) et les pluies fréquentes alternées avec des périodes de séchage favorisent la sporulation du champignon. Le champignon *Alternaria solani* survit dans le sol sous forme de

conidies (Rotem, 1994) de mycélium et des spores pluricellulaires, sur les débris végétaux non décomposés, les mauvaises herbes et les graines de tomate. Les spores (conidies) sont disséminées par le vent et la pluie et l'eau au niveau des étages foliaires inférieurs. Les taches foliaires qui résultent de cette contamination primaire vont sporuler et donner de nouvelles conidies qui sont à leur tour disséminées dans l'ensemble du feuillage et vont contaminer de nouvelles plantes déclenchant une épidémie générale de la parcelle concernée (Badillet, 1991).

#### **I-7-1-3-1- Position taxonomique**

Les *Alternaria* sont des champignons filamenteux imparfaits appartenant à la classe des Deutéromycètes. Quelques formes parfaites (sexuées) sont connues et appartiennent à la classe des Ascomycètes (*Clathrospora*, *Leptosphaeria*, *Lewia*, *Pleospora*). On connaît 44 espèces mais il y en a certainement près d'une centaine. Parmi eux, *Alternaria solani*, un champignon phytopathogène de la famille des *Pleosporaceae* présent dans les régions tempérées et tropicales (Weir et al., 1998).

#### **I-7-1-3-2- Classification**

Règne	Fungi
Division	Ascomycota
Sous-division	Pezizomycotina
Classe	Dothideomycetes
Ordre	Pleosporales
Famille	Pleosporaceae
Genre	<i>Alternaria</i>
Espèce:	<i>Alternaria solani</i> . (Sorauer, 1896).

#### **I-7-1-3-3- Description macroscopique et microscopique**

Les champignons du genre *Alternaria* sont des Deuteromycètes, cette classe renferme tous les champignons à mycélium cloisonné dont la forme de reproduction est généralement inconnue mais possèdent un mode de multiplication asexuée, par conidies. Certaines espèces d'*Alternaria* ont une reproduction sexuée et leur forme parfaite appartient aux Loculoascomycètes. Les *Alternaria* sont classé dans l'ordre des hyphales, ayant des conidiophores peu différenciés, libre, disséminés sur le substrat et à croissance sympodiales

et des conidies qui se forment hors d'un concept spécial (Agrios, 2005). Les membres du genre *Alternaria* possèdent des conidies pestées avec cloisons transversales et longitudinales, les cellules sont pluricellulaires de couleur foncée généralement piriformes ou ovotides de tailles variables selon les espaces, elles possèdent un pigment de type mélanine qui leur servent de protection contre les conditions environnementales défavorables, y compris la résistance aux microbes et enzyme hydrolytiques (Rotem, 1994).

#### **I-7-1-3-4- Plante Hôte**

*Alternaria solani*, signalé depuis plusieurs décennies sur Solanacées, il a longtemps été décrit comme affectant la tomate, l'aubergine, la pomme de terre, ainsi que plusieurs adventices de cette famille botanique (Blancar et al., 2009).

#### **I-7-1-3-5- Alternaria producteurs de mycotoxines**

Bien que *A.alternata* a été considéré comme l'espèce principal productrice de mycotoxines, les autres membres du genre, tels que *A.citri*, *A.solani*, *A.longipes* et *A.tenuissima* et *A.arborescens* espèces infectoria groupes, sont également capable de produire ces contaminant toxiques dans leurs plante hôtes (Barkai-Golan, 2008).

Le genre *Alternaria* produisent un sertain nombre de mycotoxynes à savoir l'altermariol, alternariol monométhylque éther (AME) et l'acide tenuazonique (Bottalico et Logrieco, 1998).

#### **I-7-1-3-6- Les maladies causées par Alternaria solani**

##### **I-7-1-3-6-1- Alternariose**

Parmi les maladies aériennes de la tomate, l'altérnariose, la plus répondues dans le monde, elle est retrouvée sur tous les continents, partout ou cette solanacée est cultivée. On la retrouve sous de nombreux climats, en zone de productions tropicales, subtropicales et tempérées (Akhtar, 1994).

La maladie se manifeste par des symptômes variés, à tous les stades du développement de la plante. Des taches noires, circulaires, nécrotiques de 4 à 7 mm de diamètre, apparaissent sur les feuilles et s'agrandissent en cercles concentriques (Bancard et al., 2013). Sur les tiges, les taches sont brunes ou grises, concentriques et elliptiques (Fig. 4). Ces lésions peuvent entraîner, à la longue, la défoliation du plant (Verma et Verma, 2010). Les fruits peuvent également être la cible du champignon. On observe alors des taches noires de 1 à 2 cm, en creux, à la base du calice (point d'attache du fruit sur la plante) (Messiaen et al., 1991). Ces lésions constituent des points d'entrée favorables à d'autres champignons et bactéries qui entraînent des pourritures humides.

Cette maladie peut affecter sérieusement la récolte en diminuant la surface foliaire active de la culture et on provoquant des pertes économiques considérables (Sang et *al.*, 2011).



**Figure 4 :** Symptômes d'Alternariose sur : (A) fruit, (B) feuille, (C) tige de la tomate (Blancard et *al.*, 2009).

#### **I-7-1-4- *Pectobacterium carotovorum* (*Erwinia carotovora*)**

##### **I-7-1-4-1- Généralités**

*Erwinia carotovora* est une bactérie psychrotrophe qui se développe à des températures comprises entre 5 et 36° C avec un optimum entre 27 et 30° C. Les *E. carotovora* sont des bâtonnets (0,5-1 µm de diamètre sur 1-3 µm de longueur) Gram-négatif mobiles grâce à des flagelles péritriches, anaérobies facultatifs et ayant une forte activité pectolytique (Stevenson et *al.*, 2001). Elles sont capable de décomposer le peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) et de réduire les nitrates, fermenter le glucose et la produire de l'acide à partir de certains hydrates de carbone (méliobiose, D-arabitol ou tréhalose). Leur température optimale de croissance se situe entre 27° C et 35° C selon les espèces (Perombelon and Kelman, 1980).

*Erwinia carotovora carotovora* est un agent pathogène de nombreux fruits et légumes (pomme, carotte, betterave, navet, tomate, pomme de terre, etc.) (Pérombelon & Kelman, 1980).

L'arsenal de pathogénicité des *E. carotovora* est constitué d'une variété d'enzymes extracellulaires de macération, comprenant les pectinases (pectate lyase, pectine lyase, polygalacturonase), les cellulases et les protéases provoquent la dégradation des tissus végétaux à des degrés d'agressivité variables (Whitehead et *al.*, 2001).

#### **I-7-1-4-2- Position taxonomique**

Le genre *Pectobacterium* (ex *Erwinia carotovorum*) est un groupe de bactéries pectinolytiques isolé pour la première fois en 1901 par Jones sous le nom de *Bacillus carotovorus* d'une pourriture humide de carotte (Skerman et al., 1980). En 1920, en honneur du phytopathologiste Erwin F. Smith, Winslow classa ces bactéries pectinolytiques dans le genre *Erwinia*. Ce genre comprend deux groupes d'espèces morphologiquement similaires mais présentant de nettes différences d'expression du pouvoir pathogène et de caractéristiques biochimiques. Il renferme d'une part l'espèce type *Erwinia amylovora* agent causal du feu bactérien et d'autre part les *Erwinia* pectinolytiques responsables de la pourriture molle des tubercules de pomme de terre (Perombelon and Kelman, 1980; Toth and Birch, 2005). Des récentes études de taxonomie ont conduit les auteurs à distinguer clairement trois genres différents : *Pectobacterium* spp, *Dickeya* spp et *Brenneria* spp

#### **I-7-1-4-3- Classification**

**Règne :** Bacteria

**Embranchement :** Proteobacteria

**Classe :** Gamma Proteobacteria

**Ordre :** Enterobacteriales

**Famille :** Enterobacteriaceae

**Genre :** *Pectobacterium*

**Nom binominal :** *Pectobacterium carotovorum*. (synonyme: *Erwinia carotovora*) (Jones, 1901).

#### **I-7-1-4-4- Les maladies causées par *Pectobacterium carotovorum* (synonyme: *Erwinia carotovora*)**

##### **I-7-1-4-4-1- La pourriture molle bactérienne**

La bactérie s'attaque en premier lieu à la tige, grâce à son activité pectinolytique et se développe à l'intérieur de celle-ci. Ainsi, des lésions humides et brunes s'étend dans la moelle ; celle-ci se liquéfie assez rapidement, elle s'étend ensuite aux assises externes de la tige et les dégrades. Ainsi, des lésions longitudinales brun sombre à noire couvrent et ceignent la tige sur plusieurs centimètres (Fig. 5). L'altération interne de la tige a une conséquence sur le fonctionnement des plantes et notamment sur le transport de l'eau et des

éléments minéraux, ce qui entraîne le flétrissement et le jaunissement des feuilles (Blancard et al., 2013).



**Figure 5** : Symptômes de *Pectobacterium carotovorum* sur : (A) fruits, (B, C) tiges de la tomate (Blancard, 2013).

#### **I-7-1-5- La mineuse de la tomate (*Tuta Absoluta*)**

##### **I-7-1-5-1- Origine et distribution géographique de la mineuse de la tomate**

La mineuse de la tomate *Tuta absoluta* Meyrick (Lepidoptera: Gelechiidae) est un insecte qui vivait naturellement en Amérique du Sud (Siquiera et al., 2000). La propagation de ce ravageur à travers le monde a été assurée par les migrations et les échanges commerciaux entre les continents américains et européens. A cet effet, cet insecte a été signalé pour la première fois en Espagne (Valencia) en 2006, et en 2007 plusieurs foyers ont été identifiés le long du bassin méditerranéen (Urbaneja et al., 2007). *Tuta absoluta* s'est propagé vers la plupart des pays méditerranéens (Maroc, Algérie, Tunisie, France, Portugal, Italie, Grèce, Turquie, Egypte,..). L'insecte a poursuivi sa dispersion dans de nombreux pays d'Europe : Pays-Bas, l'Albanie, Portugal, la Bulgarie, Chypre, Allemagne, Hongrie et la Lituanie. Le nouveau ravageur de la tomate les cultures a été signalé récemment en provenance de Grèce et dans plusieurs pays d'Afrique et du Moyen orient, ce qui permet d'apprécier la capacité de dispersion rapide et continue de ce ravageur (EPPO, 2007; Urbaneja et al., 2007; Vieira, 2007; Alim, 2008; Kharroubi, 2008 ; Lebdi-Griッサ et al., 2011).

##### **I-7-1-5-1-1- En Algérie**

La découverte du ravageur pour la première fois en Algérie a été réalisée dans la région de Mostaganem (Ouest Algérien) en Mars 2008 sur tomate sous abris en plastique dans

la commune de Mazagran, limitrophe de celle de Stidia en Algérie (Berkani et Badaoui, 2008).

La dissémination de l'insecte invasif s'est poursuivie d'abord sur tout le littoral et la région sublittoral (Boumerdés, Tipaza, Chlef, Jijel, Bejaia, Skikda, el Taref, Annaba et Alger). Du fait que le ravageur a trouvé les conditions favorables à sa propagation, il a été signalé plus tard à Blida, Batna, El Oued, Ourgla et Adrar Cette propagation confirme son potentiel en matière de dissémination.

#### **I-7-1-5-1-2- Position systématique**

La position systématique de *Tuta absoluta* a été établie par Meyrick en 1917 :

Embranchement :	Arthropoda
Sous embranchement :	Uniramia.
Classe :	Insecta
Ordre :	Lepidoptera.
Famille :	Gelechiidae.
Sous famille :	Gelechiinae.
Genre :	<i>Tuta</i> .
Espèce :	<i>Tuta absoluta</i> . (Meyrick, 1917).

#### **I-7-1-5-1-3- Description morphologique**

C'est un insecte qui possède 10 à 12 générations par an et un cycle biologique complet en l'espace de 29 à 38 jours selon les conditions ambiante (Berkani et Badaoui, 2008).

On distingue quatre phases de développement du ravageur: l'œuf, quatre stades larvaires, le stade nymphal (chrysalide) et le stade adulte.

##### **I-7-1-5-1-3-1- Œufs**

Ils mesurent 0,36 cm de long et 0,22 cm de large. Ils sont de forme elliptique, de couleur crème. La femelle pond de 40-50 œufs et qui sont disposés à la face inférieure des jeunes bourgeons ou sur les jeunes feuilles. L'incubation dure de 4 à 5 jours selon la température (Margarida, 2008)

##### **I-7-1-5-1-3-2- Chenilles**

La chenille de premier stade est de couleur crème puis devient verdâtre et rose clair. Elle mesure à la naissance entre 0,6 et 0,8 mm ; elle est de couleur crème avec une tête noire,

elle est munie de trois paires de vrais pattes et de cinq paires de fausses pattes qu'on appelle « pseudopodes ».

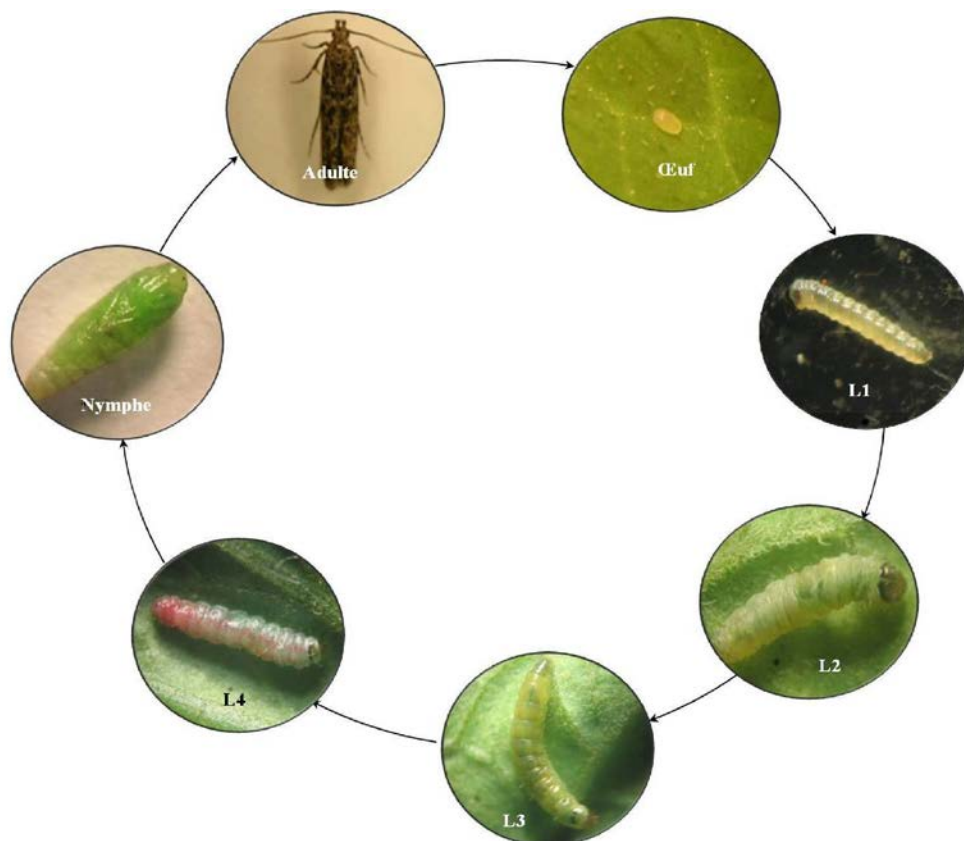
Vargas (1970) indique que le deuxième stade ressemble au premier stade en taille mais change de couleur, il passe à la couleur blanche au moment de la mue. La taille moyenne de la larve à la fin du deuxième stade est de 2,80mm. Le stade L<sub>3</sub> mesure environ 4,5 mm, elle est de couleur gris blanchâtre puis passe au vert, avant de passer au quatrième stade où elle devient blanchâtre sa taille est d'environ 7,5 mm, au maximum 8 mm. Au quatrième stade apparaît une tache rougeâtre dorsale qui s'étend des ocelles jusqu'à la marge postérieure, elles se réfugient soit dans le sol soit dans les feuilles ou elles tissent un cocon blanchâtre (Silva, 2008).

#### **I-7-1-5-1-3-3- Chrysalide**

C'est le stade pendant lequel la larve cesse de s'alimenter. Elle est de forme cylindrique de 4,3mm de large et 1,1mm de diamètre. La nymphose peut avoir lieu au sol, sur les feuilles ou à l'intérieur des mines. Elle est couverte généralement par un cocon blanc et soyeux. La phase nymphale dure de 9 à 11 jours (Marcano, 2007).

#### **I-7-1-5-1-3-4- Adulte**

Ce micro lépidoptère mesure de 6 à 7 mm de long et de 8 à 10 mm d'envergure. Il est de couleur grise argenté avec des taches brunes sur les ailes. Les femelles ont l'abdomen brun crémeux, plus large et plus volumineux que les males (Estay, 2000). Leurs antennes sont filiformes. L'un des caractères principaux de cette famille est le sommet concave des ailes postérieures, facilement identifiable (Fig. 6). De plus, il est à noter la présence de palpes labiaux proéminents (Brambila *et al.* 2013).



**Figure 6:** Cycle de vie de *Tuta. absoluta*

(Berkani et Badaoui, 2008).

- Oeuf : 3 à 5 jours.
- Larve : 11 à 19 jours, composés de quatre stades différents.
- Chrysalide : 6 à 10 jours.
- Imago : 6 à 7 jours pour le mâle contre 10 à 15 jours pour la femelle.

#### **I-7-1-5-1-4- Principales plantes hôtes**

L'insecte se développe principalement sur la tomate (*Lycopersicon esculentum*) ; Fernandez et Montagne (1990) ont comparés la préférence d'ovipositeur des femelles de la mineuse sur des plants de tomate par rapport à d'autres solanacées, comme la pomme de Terre et l'aubergine. Il semble que *T. absoluta* préfère toujours la tomate, sur laquelle le ravageur peut facilement compléter son cycle de vie en se nourrissant de toutes les parties aériennes de la plante.

La mineuse de la tomate peut se nourrir d'autres espèces de solanacées comme la Pomme de terre (*Solanum tuberosum*) le poivron (*Capsicum annuum*) et l'aubergine (*Solanum melongena*). *T.absoluta* peut se développer sur le tabac (*Nicotiana tabacum*).

Certaines mauvaises herbes comme la morelle noire (*Solanum nigrum*) et la morelle jaune (*Solanum elaeagnifolium*) et la stramoine (*Datura stramonium* L.) sont des plantes hôtes pour *T.absoluta* (Mallea *et al.*, 1972).

#### **I-7-1-5-1-5- Symptômes et dégâts**

Ce microlépidoptère peut générer des dégâts spectaculaires pouvant aller jusqu'à 80 à 100%. Il provoque des pertes de rendement considérables sur la tomate car ses larves peuvent se nourrir sur toute les parties de la plante (feuilles, tiges, fleurs, et fruits) (Torres *et al.*, 2002).

Selon koudjil *et al.* (2015), l'agressivité de la mineuse de tomate est exprimée en nombre de mines par feuille, elle varie dans le temps et dans l'espace et elle est très importante durant la période allant de février jusqu'au juin.

L'étude du génitalia réalisée par les travaux de Berkani & Badaoui (2008) à confirmée que *T.absoluta* est un insecte qui a de grandes potentialités de reproduction, lorsque la nourriture est disponible. Les adultes sont de mœurs nocturnes et se cachent dans la végétation pendant le jour. La femelle pond dans la partie aérienne de la plante hôte (Maria Margarida Vieira, 2008). Dès leur éclosion et après une courte durée d'environ 18 minutes de parcours sur la plante, les larves de l'insecte commencent à creuser des galeries sous l'épiderme des feuilles pour ce nourrir du parenchyme. Les larves attaquent le végétal quelle que soit la phénologie de la plante hôte. Une larve consomme en moyenne 2,8 cm<sup>2</sup> de surface foliaire au cours de son développement, surtout durant le dernier stade (Estay, 2000). Les feuilles attaquées se dessèchent et deviennent cassantes, ceci influent énormément sur la photosynthèse. Sur tiges, Les larves pénètrent à l'intérieur des tiges et forme des galeries et laisse cette déjection (Mallia, 2009).

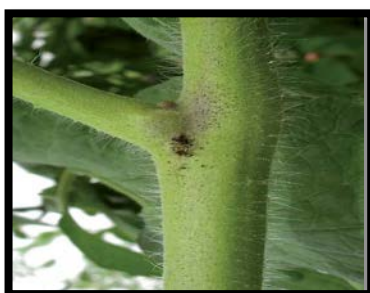
Les larves peuvent sortir de leurs galeries pour infester d'autres organes comme les fruits verts ou murs (Fig. 7) on laissant des trous par lesquels peuvent pénétrer d'autres ravageurs provoquant ainsi plusieurs maladies. Les nécroses peuvent être profondes et rendent les fruits invendables et impropres à la consommation.

Les dommages se traduisent par une réduction de la capacité de production de la plante, une baisse des boutons floraux, la chute des fruits attaqués par les larves, la pourriture provoquée par les blessures et les pertes de production qui peuvent atteindront 100%(Collavino *et Gimenez*, 2008).

**(A) Feuillage**



**(B) Tiges**



**(C) Fruits**



**Figure 7:** Symptômes et dégâts de *Tuta absoluta* sur :**(A)** feuilles, **(B)** tiges, **(C)** fruits  
(Perera, 2008).

### **I-7-1-5-1-6- Méthodes de lutte contre les agents phytopathogènes qui attaquent la tomate**

De nombreux insecticides chimiques ont été utilisés pour contrôler ou détruire ces agents nuisibles (Tab. 2). Malgré leur efficacité l'utilisation de ces substances chimiques présentent plusieurs problèmes : l'apparition de la toxicité chez l'homme, la pollution de l'environnement, et le plus important du point de vue de la lutte contre les bioagresseurs, c'est l'apparition de la résistance à ces molécules chimiques chez ces ravageurs. Cela a conduit à trouver d'autres alternatives à la lutte chimique (Da Silva et *al.*, 2014).

**Tableau 2:** Stratégie de lutte contre les agents phytopatogènes qui attaquent la tomate (Motta *et al.*, 2005 ; Lietti *et al.*, 2005 ; Silva, 2008 ; Urbaneja *et al.*, 2008 ; Badaoui *et al.*, 2010).

Maladies	Agent responsable	Stratégie de lutte
<b>Alternariose</b>	<i>Alternaria solani</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>-Utilisation des variétés résistantes</li> <li>-Adopter des rotations culturales</li> <li>-Aération des tunnels</li> <li>-Utiliser des semences saines</li> <li>-Destruction des fanes des cultures précédentes</li> <li>-Pulvériser le plantes avec des produits chimiques tels que l'azoxystrobine</li> </ul>
<b>Pourriture grise</b>	<i>Botrytis cinerea</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>-Réduire les sources d'infection</li> <li>-Destruction des débris végétaux</li> <li>-Choisir des variétés résistantes</li> <li>-Eviter l'excès d'eau et l'excès d'azote</li> <li>-Bonne aération des serres</li> <li>-La lutte chimique en préventif (Alterner les produits de la famille benzimidozoles et les dicarboximides).</li> </ul>
<b>Flétrissure fusarienne</b>	<i>Fusarium oxysporum</i> <i>f. sp. Radicis lycopersici</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>-Utilisation des substrats et des plants soins</li> <li>-Elimination des plants malades en cours de culture</li> <li>-Pratique d'un buttage des plants pour l'obtention de l'émission de nouvelles racines</li> <li>-Utilisation de variétés résistantes</li> <li>-Utilisation de souches protectives (Azoxystrobin et fludioxonil)</li> </ul>
<b>Pourriture molle</b>	<i>Erwinia corotovora</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>-Réduire au minimum les blessures fortes aux fruits</li> <li>-Utiliser des semences saines</li> <li>-Récolter par temps sec l'entreposage</li> <li>-Utilisation du chlore dans l'eau peut aider à réduire le risque d'infection par la bactérie</li> <li>-Désinfecter le sol avec du formel dèhyde ou de sulfate de cuivre entre le récoltes</li> <li>-Planter les plantes dans un sol bien drainé, à des intervalles appropriés pour une ventilation adéquate entre elles</li> </ul>
<b>Insectes</b>	<i>Tuta absoluta</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>-Destruction des organes de la plante attaquée par l'insecte.</li> <li>-Utilisation des systèmes piégeage (phéromones sexuelles ex, à glue, à eau, piège delta.. ect).</li> <li>-Attraction des adultes par des sources lumineux.</li> <li>-Installation de la culture de la tomate en association avec d'autres plantes qui auraient des effets répulsifs envers l'insecte.</li> <li>-Utilisation d'insecticide chimique : organophosphorés, carbonates, pyréthroides</li> <li>-Utilisation des auxiliaire et des entomopathogènes autoctones ex : <i>Beauveria.sp</i>, <i>Nesidiocris tenuis</i>, <i>Macroloplus caliginosus</i> et <i>Dicyphys tomanini</i> qui ont donnés de très bons résultats en Algérie et e Europe.</li> </ul>

CHAPITRE II :  
COMPOSITION  
CHIMIQUE ET  
ACTIVITÉ  
BIOLOGIQUE DES  
TROIS ESPÈCES DE  
LA RUE

## II- *Ruta chalepensis* L.

### II-1- Description botanique

*Ruta chalepensis* L. est une plante aromatique, vivace, herbacée à fleur jaunes avec un feuillage léger, glanduleux à très forte odeur fétide, tige ligneuses à la base, atteint 80cm de haut. Ses feuilles très larges (d'où le synonyme *Ruta macrophylla*, « Rue à grandes feuilles ») sont composées (les inférieures en forme de stipules et pétiolulées), chacune divisées en plusieurs segments qui sont subdivisées en plus petites folioles ovales-oblongues (Couplan, 2012). En Eté, s'épanouissent des fleurs de 1 à 2 cm de diamètre, en coupe, de couleur jaune foncé (Figure 8), portant quatre ou cinq pétales frangés de longs poils. Elles sont réunies en cymes lâches, Les Fruits sont aigus, acuminés de 6 à 9 mm de diamètre, avec des grappes fructifères étalées. La multiplication de la rue se fait par semi ou bouturage et la période de floraison est de février à juin (Bernadet et *al.*, 1989) .



**Figure 8** : *Ruta chalepensis* L. **A** : Aspects générale de *Ruta chalepensis* L. ( Paquereau, 2013). **B** : Fleurs et feuilles de *Ruta chalepensis* L. (photo originale).

#### II-1-1- Position Systématique (APGII, 2005).

Embranchement	<i>Spermaphyta</i>
Sous-embranchement	<i>Angiospermes</i>
Sous-classe	<i>Rosidae</i>
Classe	<i>Eudicots</i>
Ordre	<i>Sapindales</i>
Famille	<i>Rutaceae</i>
Genre	<b><i>Ruta</i></b>
Espèce	<b><i>Ruta chalepensis</i> L.</b>

## II-1-2- Ecologie et situation géographique

Plante originaire de la région méditerranéenne et qui à largement réponde dans de nombreux régions du monde (Sud-ouest de l'Asie, Sud de l'Europe, Afrique du nord), ont la retrouve surtout dans les régions tempéré et tropicaux (Gonzalez-Trujano *et al.*, 2006).

En Algérie, *Ruta chalepensis* L, est une espèce spontanée, très abondante, elle pousse spontanément dans les rocailles, les pelouses, les rochers et les collines sèches (Beniston, 1984) ; on la rencontre fréquemment surtout dans les zones montagneuses à l'intérieur de l'Atlas saharien et les terrains calcaires des régions méditerranéennes (Clevely et Richmond , 1997).

## II-2- *Ruta angustifolia* Pers

### II-2-1- Description botanique

Plante vivace de 30 à 80cm de hauteur, glauque, glanduleuse dans le haut. Les feuilles sont oblongues dans leur pourtour, à folioles oblongues en coin, les inférieures en forme de stipules. Elle possède des fleurs jaunes (Figure 9), assez grandes et des bractées petites, lancéolées, plus étroites que le rameau ou le pédoncule qui les porte. Les sépales sont ovales, sub-obtus et les pétales en spatules, ciliés-frangés, à franges fines aussi longues que leur largeur. Quant à l'inflorescence, la plante est caractérisée par une grappe fructifère allongée, lâche, à pédicelles à peine plus longs que la capsule. Le fruit est une capsule assez grande, subglobuleuse, à 4-5 lobes aigus, connivents (Schmelzer et Gurib-Fakim, 2013).



**Figure 9:** **A:** Fruits et graines de *Ruta angustifolia* Pers. (Meyer, 2014). **B:** Feuilles et fleurs de *Ruta angustifolia* Pers. (photo originale).

## II-2-2- Classification botanique

<b>Règne</b>	<i>Plantae</i>
<b>Sous-règne</b>	Tracheobionta
<b>Division</b>	<i>Magnoliophyta</i>
<b>Classe</b>	<i>Magnoliopsida</i>
<b>Sous-classe</b>	<i>Rosidae</i>
<b>Ordre</b>	<i>Sapindales</i>
<b>Famille</b>	<i>Rutaceae</i>
<b>Genre</b>	<b>Ruta</b>
<b>Espèce</b>	<b><i>Ruta angustifolia Pers.</i></b>

## II-2-3- Ecologie et situations géographiques

L'aire générale de l'espèce est strictement eu-méditerranéenne, elle se rencontre sur une grande partie des côtes de l'Europe méridionale, de l'Afrique du Nord et des îles de la Méditerranée, mais ne s'écarte guère du littoral. Ce n'est toutefois pas une espèce halophile, car elle peut s'enfoncer à quelques kilomètres vers l'intérieur (très loin même en Tunisie et en Algérie) et s'élever jusqu'à l'altitude de 600m (Salvo et *al.*, 2011).

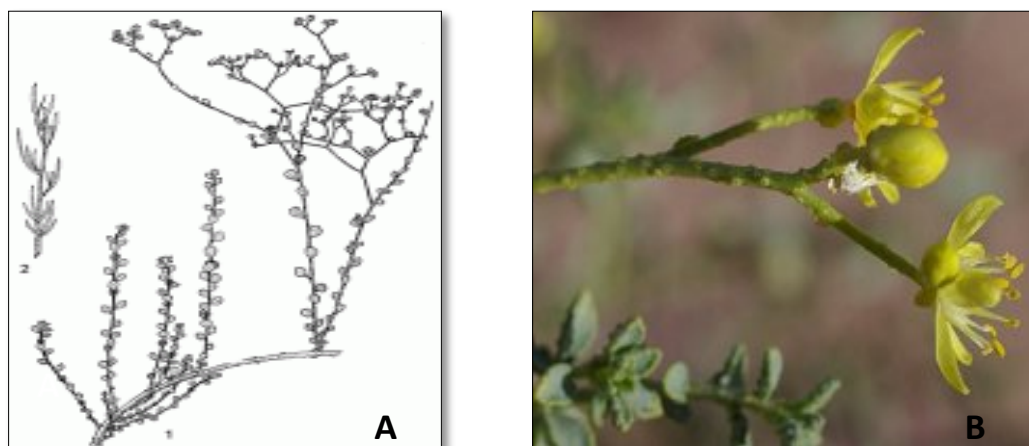
## II-3- Le genre *Haplophyllum*

Selon Townsend (1986), le genre *Haplophyllum* comprend 66 espèces réparties dans les régions tempérées, les zones subtropicales d'Eurasie et la zone tropicale du nord d'Afrique de l'Est (Somalie).

### II-3-1- Description botanique

*Haplophyllum tuberculatum* (Forsk.) A. Juss. est une plante herbacée vivace qui appartient à la famille des Rutacées, ramifiée et ligneuse à la base, intégralement couverte de grosses glandes renfermant une essence à forte odeur désagréable. Les feuilles sont fortement odorantes, spatulées, atténuées en pétiole, à bords un peu enroulés en dessous (Salvo et *al.*, 2011). Les tiges, comme le montre la figure 10, sont très rameuses de 40-60 cm de haut, glabre ou à poils courts, parfois avec des pousses stériles basales, vert jaunâtre à presque blanches. Les fleurs sont jaunes, elles ont cinq pétales et cinq étamines. Elles donnent un fruit formé de cinq carpelles, chacune contenant un ou deux graines noires. La floraison a lieu de Juin à Août. Le fruit est une capsule portée par un pédoncule un peu plus court qu'elle ; il s'ouvre à maturité, libérant de nombreuses graines noires ou brunâtres (Alvarez Cruz, 2011).

- En Français : Rue
- En Arabe : Faijel
- En Anglais: Plant of the mosquito.



**Figure 10:** *Haplophyllum tuberculatum* (Forsk.) A. Juss. **A:** Aspects générale d'*Haplophyllum tuberculatum* (Forsk.) A. Juss. (Álvarez Cruz, 2011). **B :** feuilles et fleurs de *Haplophyllum tuberculatum* (Forsk.) A. Juss (Photo originale).

### II-3-2- Position systématique

Les études phytochimiques, les données botaniques, ainsi que la connaissance de la biogenèse des métabolites secondaires ont permis de clarifier la position systématique de la plante. Selon Townsend (1986), la classification d'*Haplophyllum tuberculatum* (Forsk.) A. Juss. est représentée comme suite :

<b>Règne</b>	Plantae
<b>Division</b>	Magnoliophyta
<b>Classe</b>	Magnoliopsida
<b>Ordre</b>	Sapindales
<b>Famille</b>	Rutaceae
<b>Genre</b>	<b>Haplophyllum</b>
<b>Espèce</b>	<b><i>Haplophyllum tuberculatum</i> (Forsk.) A. Juss.</b>

### II-3-3- Ecologie et situations géographique

*Haplophyllum tuberculatum* (Forsk.) A. Juss. appelée autrefois *Ruta tuberculata* (Ozenda, 1977) est une espèce saharienne répandue dans tout le nord de l'Afrique, surtout dans le Sahara septentrional et le Sud de l'Europe. Elle couvre cinq régions différentes : l'Irano –

touraniens, la région méditerranéenne, saharo -arabe, et la région soudano – zambéziennes. On l'observe en certains lieux bien précis du plateau, dans les épandages ou les oueds argilo-sableux (Benchelah et *al.*, 2000).

#### **II-4-Travaux antérieurs et principaux métabolites secondaires isolés des espèces de la rue**

De nombreuses études phytochimiques ont été réalisées (El-Naggar et *al.*, 2014 ; Eissa et *al.*, 2014 ; Hammiche et *al.*, 2013) afin de savoir la composition chimique des trois espèces, à la suite de ces analyses, il c'est avéré que les plantes étudiées sont riches en métabolites secondaires.

Les composés isolés de *Ruta chalepensis* et *Ruta angustifolia* sont essentiellement les même, bien qu'il y ait des différences d'un point de vue quantitatif. Toutefois, ces différences sont de la même importance que celle observées entre des provenances différentes et même entre les différentes parties au sein de ces mêmes espèces. Les travaux de (Merghache et *al.*, 2009) affirment que la nature et les teneurs de ces composés sont très variables selon : l'espèce, le stade de développement et la distribution géographique .

Les trois espèces renferment essentiellement de nombreux composés appartenant à différentes classes chimiques : alcaloïdes, coumarines, flavonoïdes et les huiles essentielles (Hammiche et Azzouz, 2013).

Les alcaloïdes sont présents surtout dans la famille des Rutaceae (Hammiche et Azzouz, 2013). Actuellement, plus de 470 structures d'alcaloïdes ont été définies dans la famille des *Rutaceae*. La majeure partie de ces alcaloïdes dérive de deux voies biosynthétiques, dont celle de l'acide anthranilique qui aboutit à la plupart des alcaloïdes de la famille des *Rutaceae*.

La classe des alcaloïdes est la classe de composés la plus caractéristique pour les trois plantes. Plusieurs étude bibliographique du genre *Ruta* et *Haplophyllium* ont montrés que ces derniers sont très riches en alcaloïdes. Le tableau n°2 ci-après, représente les produits isolés de quelques espèces des deux genres.

Les teneurs en alcaloïdes sont estimées de 0,4 à 1,4 % des constituants de *Ruta chalepensis* (Foster et Tyler, 1999).

Les deux espèces *R.chalepensis* et *R.angustifolia* se caractérisent par la présence d'alcaloïdes de type : acridone et l'arboritine, commune dans les parties aériennes et les rutacridones et gravacridonediols qui sont présents dans la racine des deux plantes.

Environ une centaine d'alcaloïdes de l'acridone ont été isolés de différentes espèces de *Rutaceae* (Maier et al., 1993). Ils sont de couleur jaune et présentent une fluorescence jaune brillant sous UV, permettant leur détection. Ces alcaloïdes sont présents, uniquement, dans la famille des *Rutaceae*. La plupart des alcaloïdes sont communs à *Ruta graveolens*, à *Ruta chalepensis* L, et à *Ruta montana* (El Sayed et al., 2000). Certains alcaloïdes de type dihydrofuroquinoléine quaternaire, comme le ribalinium, le platydesminium, ou de type pyrannoquinoléine comme le rutilinium existent également chez *Ruta chalepensis*, *Ruta angustifolia*, *Ruta montana* et *Ruta corsica*. Ils sont considérés comme de bons « marqueurs » du genre *Ruta* (Petit-Paly et al., 1982). *Haplophyllum tuberculatum* contient également une gamme d'alcaloïdes et de lignanes. On a isolé des alcaloïdes quinoliniques des parties aériennes : la dihydroperfammine, la skimmianine, l'évoxine, la  $\gamma$ -fagarine, la flindersine, la folifine et l'haplofoline ; également des alcaloïdes tyramines comme la tubérine, la buchapine, l'haplotubine, la tubacétine, la tubasénécine et l'haplotubine. Les parties aériennes permettent également d'isoler la diphylline (un lignane), la justicidine-A et -B (des lignanes arylnaphtalènes), ainsi que la tuberculatine (un lignane apioside).

Une étude chimique effectuée sur trois espèces différentes de *Ruta* : *R. chalepensis*, *R. bracteosa* et *R. macrophylla* a révélé la présence d'un nouveau alcaloïde qui est le chlorinate acridone (Baumert et al., 1992).

L'étude menée par Eissa et al. (2014) sur la partie aérienne de *Haplophyllum tuberculatum* a permis d'isoler plusieurs flavonoïdes. Il s'agit des : méthoxyflavones, flavonols (quercétin), acide cinnamic et l'acide benzoïc. Les feuilles séchées de *R. chalepensis* et *R. angustifolia* contiennent de 7- 8% de rutine, un hétéroside de la quercétine qui contient un disaccharide (la rutinose) comme composé sucré, qui est à l'origine de leurs amertumes (Hammiche et Azzouz, 2013).

Les coumarines constituent, à côté des alcaloïdes, un second groupe de métabolites secondaires largement répandus dans la famille des *Rutaceae* et plus particulièrement dans le genre *Ruta* L.

Les espèces du genre *Ruta* renferment 0,4 à 1,7 % de matière sèche de furocoumarines. Dans *Ruta graveolens*, les teneurs sont maximales dans les péricarpes au moment de la fructification (jusqu'à 1,5 % de MS). Les feuilles renferment 0,36 % de matière sèche et les tiges 0,2 % de matière sèche (Milesi et al., 2001).

Les coumarines détectées sont essentiellement, des coumarines simples ou des dimères, des furocoumarines et des dihydrofurocoumarines. Le principal constituant des coumarines est un glucoside, la rutarine (0,9 %) (Eilert, 1994). Les plus communes des furanocoumarines sont les psoralènes, bergaptène (5-méthoxypsoralène), xanthotoxine (8-méthoxypsoralène), isopimpinelline (5,8-méthoxypsoralène) et rutarétine (dihydrofuranocoumarine).

Plusieurs de ces composés sont communs à *Ruta graveolens*, *Ruta chapelensis*, *R. angustifolia*, *Ruta montana* (El Sayed et al., 2000 ; Ivanova et al., 2004) (Tableau n°2). L'héraclénol et la rutamontine ont été identifiés dans les parties aériennes de *Ruta montana*, dans la région de Mila, en Algérie (Kabouche et al., 2003). Par ailleurs, le psoralène y a été déterminé à un taux de 3,5 %, dans la région d'Oran (Kambouche et al., 2008).

L'étude menée sur *Haplophyllum tuberculatum* par Arrif et al. (2005) a permis de mettre en évidence une coumarine de type methoxsalene, L'analyse spectrophotométrique on utilisons (HPLC) a montré que la quantité de cette dernière augmente avec le temps et atteint son maximum au mois de Mai 10772.8µg /100g de matière sèche par rapport au mois d'Avril de qui n'était que 5228.8 µg /100g de matière sèche.

En outre, les huiles essentielles constituent une autre classe de métabolites secondaires très abondantes dans les deux genres étudiées (*Ruta* et *Haplophyllum*) et qui sont principalement présentent dans les parties aériennes, avec un taux de 0,1 à 0,7 % de matière sèche. Elle renferme, jusqu'à 90 constituants dont les principaux sont des monoterpènes pour le genre *Haplophyllum* et des cétones aliphatiques pour le genre *Ruta* (Petit-Paly et al., 1982).

La composition chimique des huiles essentielles varie avec la période et le lieu de récolte. Il a été rapporté que le 2-undécanone est le constituant majoritaire de l'huile essentielle de *Ruta chalepensis* de provenance l'Argentine (38.1%), la Turquie (66.5%) l'Iran (52.5%) et l'Inde (4.3 - 67.8%). Cependant l'huile essentielle de provenance l'Italie contient deux constituants majoritaires le 2-nonanone (49.9 %) et le 2-undécanone (30.0 %) (Bagchi et al., 2003 ; Merghache et al, 2009).

Les analyses chimique réalisées par chromatographie en phase gazeuse (CG) et CG – spectrométrie de masse (SM) sur l'huile essentielle de *Ruta chalepensis* récoltées à partir de six différentes régions de la wilaya de Tlemcen dans le nord ouest Algérien, ayant des

situations géographiques et des conditions climatiques différentes. 20 composés représentant 64.66 - 93.99% de l'huile essentielle ont été identifiés et comme composé majoritaire le 2-undécanone avec un taux de (20,40- 82,74%) (Merghache et *al.*, 2009).

Les huiles essentielles obtenus à partir de *Haplophyllum tuberculatum* contiennent principalement des monoterpènes (77,8%), des sesquiterpènes (13,8%) et des hydrocarbures et ont une forte odeur de citron (Debouba et *al.*, 2014). Les huiles essentielles de *H. tuberculatum* récoltées à Oman contenaient environ 30 composés dont les principaux étaient :  $\beta$ -phellandène (23,3%), le limonène (12,6%), le  $\beta$ -ocimène (12,3%), l' $\alpha$ -caryophyllène (11,6%), le mycrène (11,3% ) et l' $\alpha$ -phellandène (10,7-32,9%), le  $\beta$ -caryophyllène (6,3-12,8%), le  $\beta$ -pinène (7,6-8,0%), le limonène (4,0-9,6%) et le  $\delta$ -3-carène (5,5-6,0%). Cependant, l'huile essentielle des plantes récoltées en avril comprenait principalement du linalool (15,0%), de l'acétate de linalyle (10,6%), du  $\beta$ -caryophyllène (9,7%) et de l' $\alpha$ -terpinéol (6,7%) (Al-Burtamani et *al.*, 2005).

De plus les travaux effectués par Haddouchi et ses collaborateurs (2013) sur l'huile essentielle de : *R. chalepensis*, *R. angustifolia*, *R. graveolens* et *H. tuberculatum* récoltées de quatre régions différentes de l'Algérie montrent bien la différence de la composition de l'huile essentielle entre les différentes espèces étudiées ; l'huile essentielle des trois espèces contient la même composition avec une très grande abondance des cétones, contrairement à l'huile essentielle de *Haplophyllum tuberculatum* qui a marqué une composition totalement différente comparativement aux trois autres espèces.

## II-5- Toxicités des plantes

Les trois espèces ont le pouvoir de provoquer des gastro-entérites intenses, avec vertiges, tremblements et convulsions. Leur emploi en général n'est indiqué qu'en dose très réduite. A forte dose, elles provoquent de graves empoisonnements et elles risquent d'être toxique (Baba Aissa, 2000). En cas de grossesse et à forte doses, elles peuvent provoquer un avortement (Valnet, 1983).

La manutention des plantes est à contrôler car elles ont un certains degrés de toxicité. En usage fréquent, elles exercent localement une action irritante, due à l'action des furocoumarines en particulier : le 5-méthoxypsoralène (bergaptène) et le 8-méthoxypsoralène (xanthotoxine), à la suite de contact cutané avec ces espèces et d'exposition aux UV. Cela se traduit par des érythèmes, des dermatites bulleuses parfois sévères, simulant des brûlures, qui

provoquent des réactions de photoallergie « photodermatites » semblables à celles de l'herbe à puce chez certaines personnes (Furniss et al., 2007).

## II-6- Activités biologiques des trois espèces de la rue

Les métabolites secondaires, en particulier les flavonoïdes, les coumarines les alcaloïdes et les huiles essentielles, sont responsables de la plupart des activités biologiques des trois plantes étudiées (Hammiche et Azzouz, 2013). Les recherches actuelles réalisées sur l'effet des extraits des trois espèces semblent confirmer plusieurs propriétés attribuées par la pharmacopée traditionnelle et même pour l'industrie moderne, les plus importants sont :

### II-6-1- Effet antimicrobiens

Plusieurs chercheurs ont présenté dans leurs travaux l'effet antibactérien des extraits de *Ruta.sp* contre un ensemble de bactéries pathogènes (Mancebo et al., 2001).

Abou-Zeid et ses collaborateurs (2014) ont testé l'extrait méthanolique de *Chrysanthemum cornarium*, *Capparis spinosa*, *Carthamus lanatus* et *Haplophyllum tuberculatum* vis-à-vis d'un ensemble de bactéries (gram négative et gram positive), les résultats témoignent d'une activité antibactérienne intéressante de *Haplophyllum tuberculatum* comparativement aux autres espèces végétales avec une zone d'inhibition de 79 mm. Cette forte activité est attribuée selon l'équipe de recherche à la présence des composés phénolique et en particulier aux acides phénoliques et aux flavonoïdes.

En plus de l'activité antibactérienne, des études réalisées in vivo et in vitro ont prouvé que les extraits naturels des *Ruta.sp* possèdent des propriétés antifongiques contre un certain nombre de mycètes. Les auteurs les attribuent aux furanocoumarines et aux alcaloïdes de type quinoléine et quinolone avec une activité fongicide très importante particulièrement vis-à-vis de *Botrytis cinerea*, parasite de la vigne (Oliva et al., 2003).

Une activité antifongique significative a également été reportée pour certaines coumarines. Dans leurs études in vitro, Degree et son équipe qui ont montré que les coumarines paralysent la croissance de *Saccharomyces servisiae*. A de fortes concentrations à raison de 100-1000 ppm, elles retardent ou bloquent la germination des spores d'*Aspergillus niger* et de *Penicillium glaucum*.

L'activité antifongique des huiles essentielles extraites des plantes aromatiques a été largement décrite in vivo et in vitro dans plusieurs travaux. Les huiles agissent sur un large spectre de champignons, moisissures et de levures en inhibant : la germination des spores,

l'élongation du mycélium, la croissance, la sporulation et la production de toxines chez les moisissures (Pinto *et al.*, 2007).

Les propriétés antifongiques des huiles essentielles sont associées à la prédominance des fonctions chimiques. Etant donné la grande complexité de la composition chémotypique des huiles essentielles, et malgré de possibles synergies, certains chercheurs préfèrent étudier l'effet d'un composé isolé pour pouvoir ensuite le comparer à l'activité globale de l'huile essentielle (Chaumont et Leger, 1989).

Comme pour l'activité antibactérienne, le pouvoir antifongique semble être lié à la présence de certaines fonctions chimiques dans la composition des huiles essentielles. Plusieurs travaux ont révélé que le pouvoir inhibiteur était essentiellement dû à la réactivité de la fonction aldéhyde avec le groupement thiol des acides aminés impliqués dans la division cellulaire

(Kurita *et al.*, 1979). L'étude menée par Said Hassane *et al.* (2011) a montré que l'huile essentielle de *Plectranthus aromaticus* Roxb sur un ensemble de champignons phytopathogènes dotés d'un grand pouvoir antifongique même à faible concentration ceci est expliqué par la richesse de la plante en alcools terpéniques et en phénols.

Ces propriétés sont étroitement liées à la nature de leurs constituants et des groupements ou fonctions chimiques qu'ils possèdent ; c'est le cas de l'activité antifongique qui décroît selon le type de fonctions chimiques : Phénols >Alcools> Aldéhydes> Cétones> Ethers> Hydrocarbures (Ullree *et al.*, 2002).

Par conséquent, un certain degré d'hydrophobicité des composés phénoliques ou aldéhydes aromatiques paraît donc requis pour exprimer une caractéristique antifongique optimale. Voukou *et al.*, (1988) ont montré que les phénols (eugénol, chavicol 4-allyl-2-6-diméthoxyphénol) sont plus antifongiques que les aldéhydes testés (cinnamique et hydrocinnamique).

Les huiles essentielles ont également un pouvoir antibactérien très important. La première mise en évidence de l'action des huiles essentielles contre les bactéries a été réalisée en 1881 par Delacroix (Boyle, 1995). Depuis, de nombreuses huiles ont été définies comme antibactériennes (Burt, 2004). Selon Zelagui *et al.* (2012) Cette activité est par ailleurs variable d'une huile essentielle à l'autre et d'une souche bactérienne à l'autre (Kalemba et

kunicka, 2003 ; Oussou, 2008 ; Avlessi, 2012). Elles peuvent être bactéricides ou bactériostatiques (Oussou *et al.*, 2009).

Les huiles essentielles agissent aussi bien sur les bactéries à Gram positif que les bactéries à Gram négatif. Toutefois, les bactéries à Gram négatif paraissent moins sensibles à leur action et ceci est directement lié à la nature de leur paroi cellulaire (Burt, 2004). Il existe cependant quelques exceptions. Les bactéries Gram à Gram négatif comme *Aeromonas hydrophila* (Wan *et al.*, 1998) et *Campylobacter jejuni* (Wannissorn *et al.*, 2005) ont été décrites comme particulièrement sensibles à l'action des huiles essentielle.

L'activité antimicrobienne est principalement on fonction soit de leurs compositions chimiques, et en particulier de la nature de leurs composés volatils majeurs soit à leurs effets synergique ou additif de plusieurs constituants (Sipailiene *et al.*, 2006 ; Oussou, 2009). La variabilité des constituants des huiles suggère qu'elles agissent sur plusieurs sites d'action dans les micro-organismes, étant donné que chaque composé possède son propre mode d'action (Guinoiseau, 2010).

Oussou en 2009 a étudié les propriétés antibactériennes de l'huile essentielle issues de la partie aérienne de *Ruta montana* récoltée à Mila (Est Algérien) et qui ont révélées un pouvoir antibactérien remarquable contre un ensemble de bactéries (*Escherichia coli* *Pseudomonas aeruginosa* ; *klebsella pneumoniae* et *Staphylococcus aureus*) cette activité est du à la richesse de la plante aux composés cétoniques avec un taux de 60.1 % représentée par le 2-Undecanone

Les caractéristiques des huiles essentielles sont attribuées aux dérivés terpénoïdes et phénylpropanoïdes dont elles sont constituées (Guinoiseau, 2010). Les terpènes ainsi que les flavonoïdes peuvent pénétrer dans la double couche phospholipidique de la membrane de la cellule bactérienne et induire sa rupture. Le contenu cytoplasmique est déchargé à l'extérieur de la cellule impliquant sa destruction (Tsushima *et al.*, 1996).

Certains composés phénoliques des huiles essentielles interfèrent avec les protéines de la membrane des micro-organismes comme l'enzyme ATPase, soit par action directe sur la partie hydrophobe de la protéine, soit en interférant dans la translocation des protons dans la membrane prévenant la phosphorylation de l'ADP (Kurita et Koike, 1982; Hammer *et al.*,

1999). Johansen *al.* (1997) ; dans ses travaux a démontré que la synthèse de l'ADN, l'ARN, des protéines et des polysaccharides peuvent être inhibés par les huiles essentielles.

## II-6-2- Activités insecticides

*Haplophyllum tuberculatum* est utilisé depuis longtemps pour protéger le bétail des morsures des insectes et des mouches (Miller *et al.*, 1988). L'extrait de l'éthanol des parties aériennes de *H. tuberculatum* possède une bonne activité insecticide contre *Culex quinquefasciatus* Fact Sheet (Zohair *et al.*, 1989). L'extrait à l'hexane des parties aériennes s'est avéré avoir aussi une activité insecticide significative contre les aleurodes adultes (*Bemisia tabaci*).

L'extrait de *Ruta chalepensis* a montré, à faible concentration (0,32 %), une activité antiproliférative sur les larves d'un papillon de la famille des Pyrales (*Hypsipyla gran-della*) qui ravage les forêts tropicales (Mancebo *et al.*, 2001) Cette action larvicide est retrouvée sur d'autres espèces ; elle implique les furocoumarines mais également des alcaloïdes comme la rutamine (quinolone) (Emam *et al.*, 2009).

Les huiles essentielles forment une classe de bioinsecticides intéressante puisqu'elle est constituée de plusieurs composés à mécanismes d'action multiples, elles ont des modes d'application variés.

Les huiles essentielles agissent directement sur la cuticule des insectes et acariens à corps mou. Isman (1999) émet cette hypothèse car plusieurs huiles essentielles semblent plus efficaces sur les arthropodes à corps mou. C'est le cas du Facin qui exerce une répression satisfaisante sur les thrips, les pucerons, les aleurodes et certains acariens. La nature lipophile de l'huile essentielle peut dégrader la couche cireuse et causer des pertes en eau. Les trachées et les sacs d'air des insectes sont enduits de cette couche cireuse et sont affectés par l'huile essentielle ce qui peut entraîner l'asphyxie.

Ces essences végétales ont des effets anti-appétant, affectant ainsi la croissance, la mue, la fécondité et le développement des insectes. Regnault-Roger et Hamraoui (1995) ont observé l'effet du linalool, du thymol et du carvacrol sur la fécondité et le nombre d'œufs pondus du bruche du haricot. Une inhibition complète de la pénétration des larves dans les grains traités de linalool et de thymol a été observée. De plus ce dernier produit s'est avéré inhibiteur de l'émergence des adultes.

Plusieurs études réalisées affirment que les huiles essentielles présentent un effet toxique fumagant. Chez les peuples africains l'ajout d'échantillons de plantes vertes dans les caveaux de riz et de grains est une pratique courante pour chasser les insectes et les rongeurs des denrées stockées. La fumigation au moyen des huiles essentielles a été étudiée avec le charançon du riz *Sitophilus oryzae* (L.), des coléoptères des grains dont le bruchidae, *Callosobruchus chinensis* (L.); les résultats démontrent que les effets toxiques dépendent de l'espèce d'insecte, de la plante et du temps d'exposition à l'huile essentielle (Kim *et al.* 2003).

En plus de leurs pouvoirs toxiques fumagant, les huiles essentielles présentent un effet répulsif plusieurs études ont démontré que les huiles essentielles ont un effet répulsif qui est étroitement lié à la structure de la molécule testée. L'huile essentielle a un effet inhibiteur sur la ponte, causant une rétention des œufs, et sur l'émergence des adultes (Chiasson, Beloin, 2007). Une étude récente a été réalisée par Abbas *et al.* (2013), où l'huile essentielle de la partie aérienne de *Ruta chalepensis* a été testé pour son activité répulsive contre les larves d'une espèce de moustique *Anopheles mosquitoes*, l'huile essentielle a montré un degré de répulsion très intéressant contre ce parasite vecteurs de plusieurs maladies comme la malaria.

### **II-6-3- Effets antioxydants**

La caractéristique frappante des *Rutaceae* réside dans la diversité de leurs métabolismes polyphénolique, produit naturel antioxydant. Une évaluation de l'activité antioxydante des extraits méthanolique de *Ruta chalepensis* collectée du Nord de Tunisie a montré que l'extrait de la plante exhibe un pouvoir antioxydant intéressant (Sengul *et al.*, 2009).

Les composés phénoliques (les flavonoïdes en particulier) semblent être de bons candidats pour leurs activités antioxydants du fait de la présence de nombreux hydroxyyles, pouvant réagir avec les radicaux (Zhang *et al.* , 2011).

Certains constituants des huiles essentielles présentent un pouvoir antioxydant très marqué et sont aujourd'hui commercialisés. Le pouvoir antioxydant de ces huiles est développé comme substitut dans la conservation alimentaire ; c'est le cas de l'eugénol, du thymol, du carvacrol, etc. Ce sont surtout les phénols et les polyphénols qui sont responsables de ce pouvoir (Les résultats déjà publiés montrent que les huiles essentielles constituent une bonne source d'antioxydants naturels recherchés pour leur innocuité relative (Djedd *et al.*, 2004).

#### II-6-4- Autres activités

La rue, par sa forte odeur et ses composés puissants, est utilisée pour le contrôle des ravageurs, notamment contre les mollusques et les nématodes (Merghache et *al.*, 2009).

Différents extraits des parties aériennes de *H.tuberculatum* se sont avérés réduire significativement l'éclosion des œufs tout en augmentant la mortalité des œufs et des juvéniles du nématode à galles *Meloidogyne javanica*. Leur activité molluscicide significative contre *Biomphalaria alexandrina* a également été démontrée (Kallel et *al.*, 2009).

En ce qui concerne l'action nématocide, une étude réalisée par Stephan (2004) mentionne qu'*H. tuberculatum* présente un effet toxique sur les œufs et les juvéniles de *Meloidogyne* spp.

**CHAPITRE III :**  
**UTILISATION DES**  
**EXTRAITS DANS LA**  
**LUTTE BIOLOGIQUE**

### III- Définition de la lutte biologique

Le concept de la lutte biologique sous sa forme « scientifique » contre les ravageurs est connu pratiquement depuis plus d'un siècle. Pendant cette période, des efforts considérables ont été réalisés pour développer cette méthode de la lutte contre les ravageurs (Dib, 2012). Il existe de nombreuses définitions de la lutte biologique mais nous nous en tiendrons à une définition générale telle que celle proposée par l'OILB (Organisation Internationale de Lutte Biologique) est la suivante : "L'utilisation d'organismes vivants ou de leurs produits pour prévenir ou réduire les dégâts causés par les ravageurs aux productions végétales." La lutte biologique est donc l'utilisation d'organismes vivants dans le but de limiter la pullulation et/ou la nocivité des divers ennemis des cultures « rongeurs, insectes, nématodes, maladies des plantes et mauvaises herbes » (Altieri et *al.*, 2005). Elle est fondée sur la régulation préventive et durable d'importants ravageurs par leurs ennemis naturels. Cette interaction se base alors sur trois éléments: le ravageur, l'auxiliaire et son habitat (Boller et *al.*, 2004).

#### III-1- Utilisation des dérivés de plantes dans la lutte contre les agents phytopathogènes

Le contrôle des bioagresseurs par des extraits végétaux a longtemps été réalisé de manière traditionnelle et donc leur utilisation repose souvent sur des bases empiriques. La meilleure connaissance des mécanismes d'action mis en œuvre par ces produits offre des perspectives nouvelles pour la protection des cultures, en raison de leurs nombreux avantages écologiques. Plusieurs approches se distinguent actuellement : l'utilisation de formulations phytosanitaires spécifiques (biopesticides d'origine végétale), ou mixtes (association avec des pesticides organiques de synthèses) (Ajouz, 2009). Ces deux démarches ouvrent des possibilités de développement commercial à ces substances d'origine végétale pour lutter contre les maladies des plantes, dynamisant ainsi l'avènement d'une nouvelle génération de solutions renouvelables, écologiquement et environnementalement acceptables, face aux bioagresseurs (Kadidia, 2013).

#### III-2- Caractéristiques et intérêts des préparations à base de plantes

Les préparations à base de plantes sont des extraits aqueux ou hydro-alcooliques. Les huiles essentielles par extension peuvent être considérées comme des résidus d'extraction par l'eau mais ne peuvent pas être considérées comme des extraits aqueux de par leur nature. En effet "l'extraction" consiste à solubiliser des molécules d'intérêts dans des solvants. Les

composés organiques ainsi extraits appartiennent à différentes familles de molécules comme les glucides (oligosides, monosides et dioses), les peptides, les acides aminées et les composés appartenant au métabolisme secondaire de la plante (Bertrand et Andreu, 2013). Ces derniers composés sont impliqués dans les réactions de défense de la plante, dans la communication interbiotique interspécifique (plante/insectes, plante/microorganismes, plante/plante) ou intraspécifiques (communication entre les plantes, signaux d'alertes...) ou encore dans la protection de la plante contre les effets délétères des UV (Bourgaud, 1990).

Dans la plupart des cas, ce sont ces derniers composés que l'agriculteur s'emploie à exploiter à travers l'utilisation de préparations à base de plantes. Les extraits obtenus sont des mélanges complexes de ces différentes molécules de faibles poids moléculaires et de grande diversité de structures. Cette diversité de structures implique une diversité d'activité. Les composés identifiés dans ces extraits naturels ont des propriétés antifongiques directes, insectifuges, photoprotectrices, phytotoxiques... Ces composés d'origine naturelle sont réputés instables, biodégradables et photosensibles. La préparation, la conservation et l'utilisation des préparations d'origine naturelle nécessitent donc certaines précautions afin d'optimiser leurs activités (De Belair, 1990).

### **III-3- Modes d'actions des substances naturelles**

Les substances naturelles peuvent avoir plusieurs modes d'actions:

- Actif par ingestion, en paralysant de manière directe les insectes ravageurs;
- Actif par contact, en déshydratant de manière directe la cuticule des animaux ravageurs ou des plantes;
- Actif par effet mécanique (barrière physique);
- Effet répulsif, en créant des perturbations sur le comportement des ravageurs installés à la surface des plantes;
- En stimulant la défense des plantes (autodéfense des plantes), en permettant à la plante de déclencher ses réactions de défenses. (SDN - SDP) (Damoiseau, 2013).

### **III-4- Utilisation des huiles essentielles en protection des végétaux**

Les huiles essentielles existent généralement que chez les végétaux supérieurs. Les plantes à huiles essentielles dégagent généralement une odeur parfumée et sont ainsi appelées plantes aromatiques. Elles sont utilisées dans l'alimentation, la médecine traditionnelle et la protection des végétaux. Aussi, les huiles essentielles connaissent plusieurs applications industrielles notamment dans l'industrie agroalimentaire (Nébié, 2006).

Les huiles essentielles ont de nombreuses propriétés insecticides et antifongiques. En effet plusieurs travaux de recherches ont donné des résultats probants. L'activité antifongique des huiles essentielles de *Cymbopogon citratus*, *Eucalyptus camaldulensis*, *Lippia multiflora* a été démontrée sur la transmission de *Phoma sorghina* sur les plantules de sorgho (Puryilé Médah, 2009). Les huiles essentielles de *Cymbopogon schoenanthus*, *C. giganteus*, *Lippia multiflora*, *Ocimum basilicum* et *Securidaca longepedunculata* ont des propriétés antifongiques (Nébié, 2006). L'application de l'huile essentielle de *Armoracia rusticana* sur *Lycoriella ingenua* provoque une mortalité de 100% de celui-ci (Park *et al.*, 2006). Somda *et al.* (2007) montrent que l'huile essentielle de *Cymbopogon citratus* est efficace contre *P. sorghina* et *F moniliforme* en traitement de semence.

#### **III-4-1- Exemple des cas d'utilisation des extraits de plantes dans la lutte biologique contre *Botrytis cinerea***

Un extrait de feuilles de la Renouée de Sakhaline (*Reynoutria sachalinensis*, nom commercial Milsana) a été décrit comme un éliciteur de défense de la vigne contre *B. cinerea* (Carlen *et al.*, 2003). Dans les vignobles allemands, un traitement des baies de raisin avec le Milsana tous les sept à dix jours a entraîné un meilleur contrôle de la pourriture grise que le soufre et le cuivre (Schmitt *et al.*, 2002). Aux Etats-Unis, quatre traitements de Milsana, réalisés entre la véraison et la récolte, a réduit l'incidence de *B. cinerea* dans les grappes de raisin de 50% (Schilder *et al.*, 2002). Ce produit est d'ailleurs homologué aux Etats-Unis sur cultures ornementales, en tant que biofongicide .

Le mélange d'extraits d'algues et de chlorure d'aluminium ( $AlCl_3$ ), contenus dans le produit Synermix, induit l'accumulation de resvératrol, composé phénolique antimicrobien, dans les feuilles de vigne (Jeandet *et al.*, 2000). Ceci induit par conséquent une résistance systématique chez la plante. La quantité de resvératrol accumulée est plus importante chez la variété Rupestris du Lot, ce qui indique que la quantité de resvératrol produite par la plante est dépendante de la variété. Dans des vignobles traités pendant huit ans, Synermix a renforcé l'efficacité de l'iprodione contre *B. cinerea* (Cilindre *et al.*, 2007).

#### **III-5- Perspectives et progrès visés par l'utilisation des extraits naturels dans la lutte biologique**

La lutte contre les agents pathogènes des plantes passe par l'utilisation de plusieurs méthodes dont les plus connues sont les méthodes culturales, les traitements avec les produits de synthèses, l'utilisation de variétés résistantes. Mais le moyen le plus employé est l'utilisation des pesticides de synthèse. En ce qui concerne la conservation des récoltes, les

paysans ont un savoir faire propre à eux qui consiste à utiliser des produits dérivés des plantes contre les bioagresseurs. C'est ce savoir faire que la recherche a mis en valeur avec l'utilisation des extraits de plantes (Kadidia, 2013).

De nouvelles méthodes d'identification et de caractérisation des principes actifs contenus dans les substances naturelles permettent déjà de mieux connaître ceux présents dans tel ou tel extrait. Ces technologies nouvelles alliées à une meilleure connaissance des mécanismes d'actions de ces substances ou de leurs extraits (en particulier ceux liées à la stimulation des défenses naturelles des plantes) permettront la mise au point de solutions de plus en plus nombreuse (Dugrand et *al.*, 2013).

Cependant, on doit réaliser que la recherche nécessaire pour mettre en évidence les produits naturels à propriétés insecticides ou fongicides nécessite, à un certain stade, des équipements coûteux et une main d'œuvre spécialisée. Il ne suffit pas de récolter quelques feuilles ou quelques lianes et de les macérer dans un solvant organique. On doit appliquer à l'utilisation des produits naturels les mêmes exigences toxicologiques qu'aux produits de synthèse. Il faut en établir la toxicité aiguë et chronique, les propriétés mutagènes, tératogènes et cancérigènes (Tlili-Ait Kaki, 2013).

Cela indique que la perspective visée par la recherche sur les substances naturelles est de contribuer à bâtir une méthodologie simple d'évaluation garantissant l'innocuité des préparations à base de plantes et définissant les conditions de leur bonne élaboration et de leur utilisation optimale. Ces points constituent donc, les conditions d'un véritable développement de ces solutions de lutte biologique (Dugrand et *al.*, 2013).

Si la recherche continue ses investigations, l'exploitation de ses substances chimiques naturelles des plantes serait une méthode réaliste et écologiquement saine pour la protection des cultures. Aussi, elle aura un rôle proéminent dans la fabrication de futurs pesticides (Tiendrebéogo, 2011).

DEUXIEME PARTIE :

ETUDE

EXPÉRIMENTALE

CHAPITRE I :  
MATÉRIEL ET  
MÉTHODES

## I- Matériel et méthodes

### I-1- Matériel

#### I-1-1- Site d'échantillonnage

La partie aérienne (tiges et feuilles) des trois espèces des plantes étudiées ont été collectées aléatoirement au mois de Mars 2013 ; période de floraison. Trois sites, correspondant à trois régions d'Algérie ont été choisis (Fig.11): Mostaganem située dans l'Ouest Algérien (Lat. 35 ° 55' 52 " N, Long. 0 ° 05' 21 " E, Alt. 102 m), Bordj Bou Arreridj (Est Algérien) (Lat. 36 ° 4 '0 "N, Long. 4 ° 46' 0 " E, Alt. 906 m) et Adrar (Sud Algérien) (Lat. 27 ° 52 '27 " N, Long. 0 ° 17' 37 " O, Alt. 257 m). Les paramètres géographiques et climatiques sont indiqués dans le tableau 3.



**Figure 11:** Carte de situation géographique des différentes zones d'étude. 1 : Mostaganem (Ouest Algérien), 2 : Bordj Bou Arreridj (Est), 3 : Adrar (Sud). (Atlas géographique mondial, 2013).

**Tableau 3 :** Situations géographiques et climatiques des trois zones d'étude (Map Data, Google 2013).

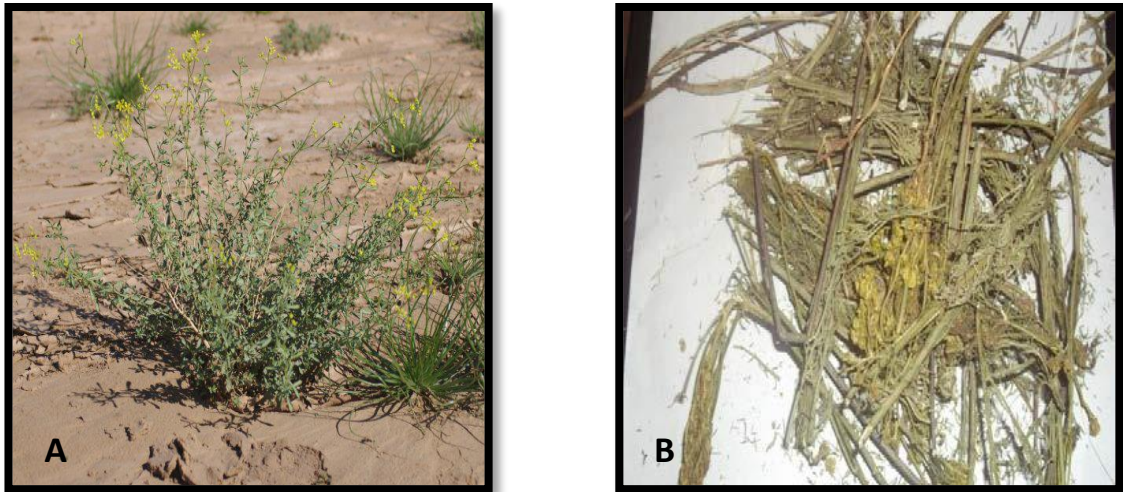
Non scientifique	Nom arabe	Régions de récolte	Situation géographique	Climat
<i>Ruta Chalepensis</i> L.	Fidjel	Mostaganem	Achachaa, située à la wilaya de Mostaganem (Ouest Algérien) La wilaya de Mostaganem se situe au Nord-Ouest). Elle est délimitée : <ul style="list-style-type: none"> <li>• au Nord, par la Méditerranée ;</li> <li>• à l'Ouest, par la wilaya d'Oran ;</li> <li>• à l'Est, par la wilaya de Chlef ;</li> <li>• au Sud, par les wilayas de Mascara et Relizane;</li> </ul>	Semi aride à hiver tempéré
<i>Ruta angustifolia</i> Pers.	Fidjel	Bordj Bou Arreridj	La ville de Bordj-Bou-Arreridj est située sur les hauts plateaux Algériens (Nord-Est). Elle est délimitée : <ul style="list-style-type: none"> <li>• au Nord, par la wilaya de Béjaïa;</li> <li>• à l'Ouest, par la wilaya de Bouira;</li> <li>• au Sud, par la wilaya de M'Sila ;</li> <li>• à l'Est, par la wilaya de Sétif.</li> </ul>	Continental
<i>Haplophyllum tuberculatum</i> (Fosk.)A. Juss	Rue du Sahara (Chedjeret er rih Fidjel)	Adrar	Inzegmir située à la wilaya d'Adrar (sud-ouest de l'Algérie). Elle est délimitée : <ul style="list-style-type: none"> <li>• au Nord, par El Bayadh et Ghadaïa ;</li> <li>• à l'Ouest, par Béchar et Tindouf ;</li> <li>• au Sud, par Mali et la Mauritanie ;</li> <li>• à l'Est, par Tamanrasset.</li> </ul>	Désertique sec et chaud

## **I-1-2- Matériel biologique**

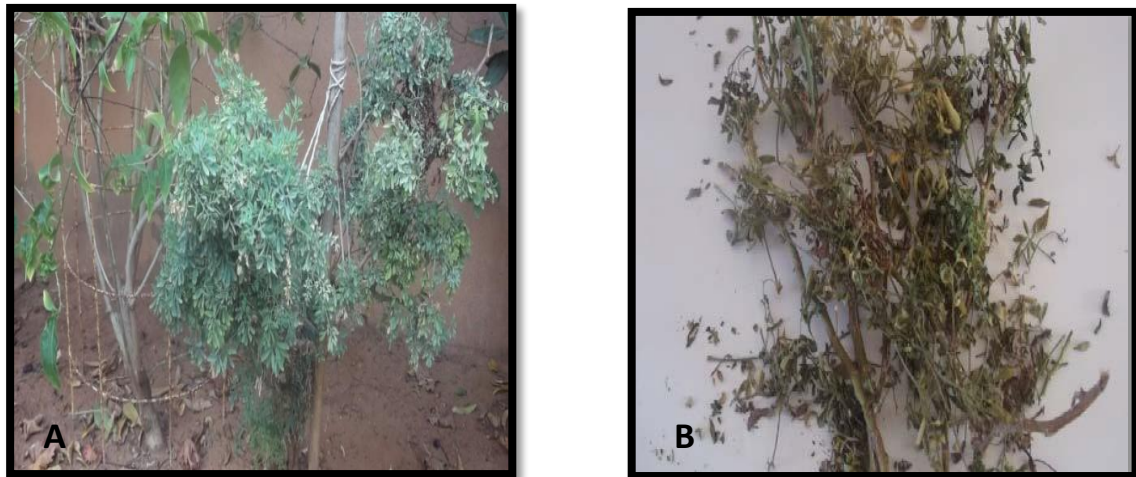
### **I-1-2-1- Matériel végétal**

Les espèces végétales utilisées sont : *Ruta chalepensis* L., *Ruta angustifolia* Pers. et *Haplophyllum tuberculatum* (Forsk.) Juss.

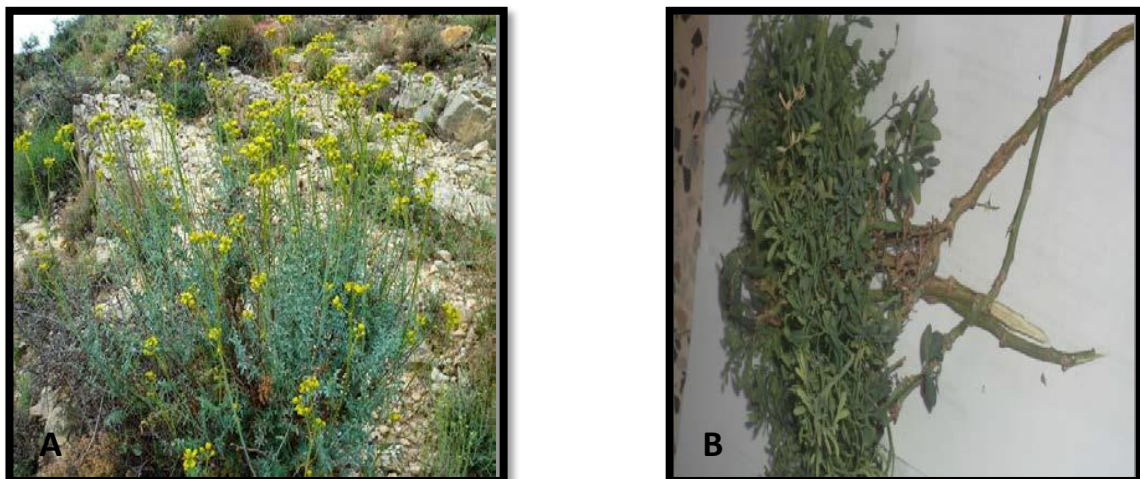
L'identification botanique a été faite par Dr. Sekkal F/Z, enseignante chercheur à l'Université de Mostaganem. Les spécimens authentifiés (Fig. 12) ont été déposés au niveau de l'herbier du laboratoire d'Ecologie végétale de l'Université Ahmed Ben Bella 1 Oran (Algérie), et enregistrés sous les références suivantes : *Ruta angustifolia* Pers. (code: 1726-1), *R. chalepensis* L. (code: 1726-2), *Haplophyllum tuberculatum* (Forsk.) Juss. (Code: 1722).



Aspect général d' *Haplophyllum tuberculatum* (région d' Adrar) (Photo originale).



Aspect général de *Ruta chalepensis* (région de Mostaganem) (Photo originale).



Aspect général de *Ruta angustifolia* (région de Bordj Bou Arreridj) (Photo originale).

**Figure 12 :** Vues générales des trois espèces étudiées (fraîche (A) et sèche(B)).

### **I-1-2-2- Matériel animal (*Tuta absoluta*)**

Les larves de « *Tuta absoluta* » ont été collectées au mois de Mai 2013 à partir d'une serre de tomates exempte de tout traitement au pesticide. Située dans la station expérimentale de l'Université de Mostaganem (Département d'Agronomie), cette station est localisée dans la commune de Mazagran à 4 Km au Sud de Mostaganem entre 35°35'35'', d'altitude et 0°4'44'' de longitude.

Au niveau de cette serre, le prélèvement des feuilles de tomates infestées par la mineuse a été fait d'une manière aléatoire.

L'identification de l'insecte a été faite par Mme Kolai N. (Université Abdelhamid Ibn Badis). Les larves de différents stades (L<sub>1</sub>, L<sub>2</sub>, L<sub>3</sub> et L<sub>4</sub>) ont été choisies d'une manière aléatoire.

### **I-1-2-3- Microorganismes utilisés**

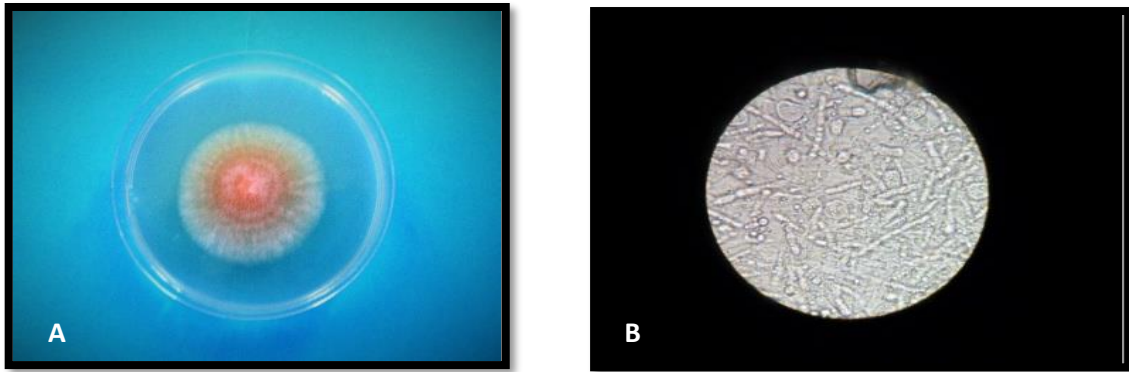
#### **I-1-2-3-1- Matériel fongique et purification des isolats**

Les tests antifongiques de l'huile essentielle des trois espèces ont été réalisés au laboratoire de protection de végétaux. Les isolats retenus pour ce travail proviennent du laboratoire de protection de végétaux (Université de Mostaganem).

Après avoir incubé les boîtes, des repiquages de manière aseptique sont effectués, l'opération est renouvelée jusqu'à l'obtention d'une purification complète de la culture fongique. Les trois espèces purifiées et destinées aux tests antifongiques sont :

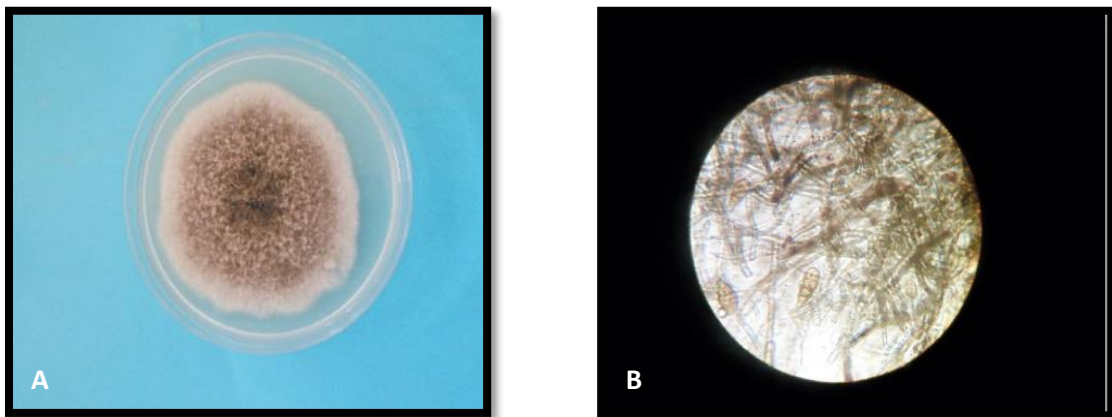
*Fusarium oxysporum f. sp. radicis-lycopersici*, *Botrytis cinerea* et *Alternaria solani*

(Fig. 13). Le milieu PDA a été utilisé pour la croissance des champignons choisis (Annexe 6).



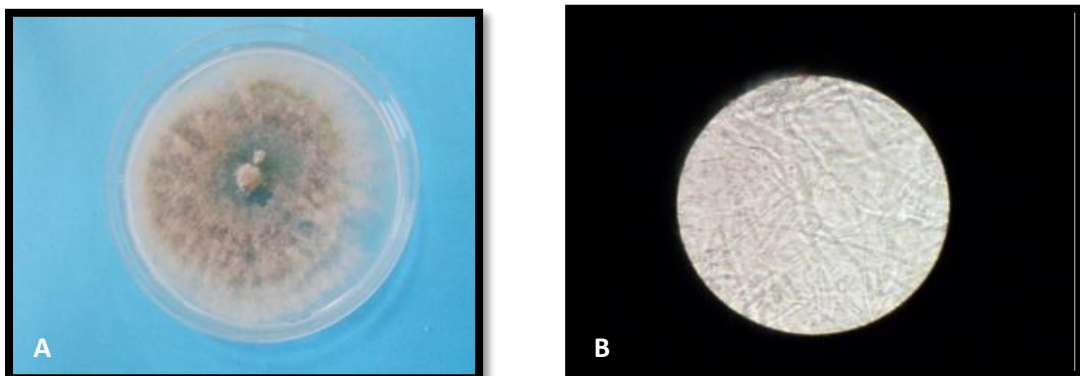
**A-** Vue macroscopique de *Fusarium oxysporum f. sp. radicis-lycopersici*

**B-** Vue microscopique de *Fusarium oxysporum f. sp. radicis-lycopersici*



**A-** Vue macroscopique d'*Alternaria solani*.

**B-** Vue microscopique d'*Alternaria solani*



**A-** Vue macroscopique de *Botrytis cinerea*

**B-** Vue microscopique de *Botrytis cinerea*

**Figure 13:** Observations macroscopiques et microscopiques des souches fongiques (X40).

### **I-1-2-3-2- Matériel bactérien**

La souche bactérienne *Pectobacterium carotovorum*, appelée aussi *Erwinia carotovora*, nous a été fournie par le laboratoire de protection des végétaux (Université de Mostaganem).

## **I-2- Méthodes**

### **I-2-1- Séchage et préparation de la drogue**

Le séchage des échantillons a été réalisé à l'abri de la lumière et à une température ambiante, afin de préserver au maximum l'intégrité des molécules. Ils ont été, ensuite, pesés et broyés à l'aide d'un mortier, pour les futures investigations phytochimiques et biologiques.

## **1-3-Etude analytique**

Les analyses effectuées sont toutes conformes aux normes (AFNOR, 1985). Elles consistent en la détermination de la matière sèche, minérale et organique.

### **1-3-1- Détermination de la teneur d'humidité**

Selon Audigie et *al.* (1985), on procède à une dessiccation du produit à une température de  $103^{\circ} \text{C} \pm 2^{\circ} \text{C}$  dans une étuve jusqu'à l'obtention d'une masse constante. Le taux d'humidité est défini comme la perte de masse subie dans les conditions de la mesure. Elle est exprimée par la relation :

$$\text{H\%} = \frac{\text{Poids X} - \text{Poids Y}}{\text{Poids X}} \cdot 100$$

Poids X : Poids de l'échantillon (frais).

Poids Y : Poids de l'échantillon (après séchage).

H% : Taux d'humidité exprimé en pourcentage.

### **1-3-2- Détermination de la teneur en matière sèche**

La matière sèche est déterminée à partir d'une masse X de matière végétale introduite dans un creuset taré, puis séchée dans une étuve à  $105^{\circ} \text{C}$  jusqu'à un poids constant. Après refroidissement dans un dessiccateur, le creuset est pesé. Le taux de matière sèche est déterminé par l'équation:

$$MS(\%) = S / X \cdot 100$$

S : Masse du creuset sorti du dessiccateur moins la tare ;

X : Masse de la matière végétale fraîche ;

MS% : Taux de la matière sèche.

### 1-3-3- Détermination de la teneur en matière minérale

La méthode utilisée est la méthode de minéralisation par calcination. Le taux de la matière minérale est le résidu minéral après destruction de la matière organique par calcination dans un four à une température de 550° C durant 6 heures. Le pourcentage de la matière minérale est donné par la relation suivante :

$$MM\% = ((tare + X) - tare) / X \cdot 100$$

X : Masse de la prise d'essai.

### 1-3-4- Détermination de la teneur en matière organique

La teneur de la matière organique est déterminée par la différence entre la matière sèche et la matière minérale (Sauvant, 1988).

$$MO\% = MS \% - MM\%$$

### 1-3-5- Criblage phytochimique

L'examen phytochimique est nécessaire pour identifier les grandes familles de métabolites secondaires existants dans les feuilles et les tiges des plantes étudiées. Il est fondé sur des réactions de coloration ou de précipitation à l'aide de réactifs appropriés. Les essais phytochimiques ont été menés suivant les méthodes décrites par : Paris et *al.*, 1969 ; Rizk, 1982 ; Trease et Evans, 1987 ; Harborne, 2005; Békro et *al.*, 2007 ; N'guessan et *al.*, 2009).

- ✓ Les composés appartenant au groupe des flavonoïdes ont été mis en évidence par la réaction à la cyanidine.
- ✓ La caractérisation des tanins a été faite par la réaction au chlorure ferrique.

- ✓ La recherche des alcaloïdes a été réalisée à l'aide des réactifs généraux de caractérisation des alcaloïdes (Réactif de Dragendorff, réactif de Mayer et le réactif de Bouchardât).
- ✓ La recherche des saponosides est basée sur la propriété de mousser les solutions aqueuses.
- ✓ La présence des anthocyanes a été effectuée par l'ajout de HCl à 2N.
- ✓ L'ajout de l'ammoniaque dilué à 10% et la fluorescence bleue des tubes sous UV à 366 nm confirme la présence des coumarines.
- ✓ La détection des composés réducteurs a été faite à l'aide de la liqueur de Fehling.

Les résultats sont classés selon l'apparition en :

- +++ : Réaction très positive
- ++ : Réaction moyennement positive
- + : Réaction faiblement positive
- : Absence

### **1-3-5-1- Epuisement du matériel végétal avec de l'eau chaude**

Un gramme de matière végétale (tiges, feuilles) est infusé dans 100 ml d'eau distillée bouillante pendant 15min. L'infusé est filtré et l'extrait aqueux est soumis aux tests suivants:

#### **1-3-5-1-1- Caractérisation des saponosides**

La détection des saponosides est réalisée en ajoutant 3ml d'eau distillée à 2 ml d'extrait végétal. La solution obtenue est fortement agitée. La formation d'une mousse stable, persistant pendant 20 minutes indique la présence abondante des saponosides (hauteur supérieure à 1 cm).

La teneur en saponosides est évaluée comme suit :

- ✓ Pas de mousse = test négatif
- ✓ Mousse moins de 1 cm = test faiblement positif
- ✓ Mousse de 1-2 cm = test positif
- ✓ Mousse plus de 2 cm = test très positif.

#### **1-3-5-1-2- Caractérisation des sucres réducteurs**

Leurs détection consistent à traiter l'extrait avec deux à trois gouttes de la liqueur de Fehling (A+B) (1/1) (voir annexe), l'ensemble est porté à ébullition dans un bain marie pendant 30 min. L'apparition d'un précipité rouge-brique au fond du tube indique la présence de composés réducteurs.

### **1-3-5-2- Epuisement du matériel végétal avec un solvant alcoolique**

#### **1-3-5-2-1- Caractérisation des tannins**

Une quantité de 1,5 g de matériel végétal sec sont placés dans 10 ml de méthanol dilué à 80 %. Après 15 minutes d'agitation, les extraits sont filtrés et mis dans des tubes. L'ajout de  $\text{FeCl}_3$  à 1 % permet de détecter la présence ou non de tanins. La couleur vire au bleu noir en présence de tanins galliques et au brun verdâtre en présence de tanins catéchiques (Rizk, 1982). La réaction de Bate-smith a permis de confirmer la présence ou l'absence des tannins condensés ; une coloration rouge signe leurs présences.

#### **1-3-5-2-2- Caractérisation des polyphénols**

La réaction au chlorure ferrique ( $\text{FeCl}_3$ ) a permis de caractériser les polyphénols selon le protocole suivant:

Une prise d'échantillon végétal de 0,5 gramme est macérée à la température ambiante dans 15ml d'un mélange hydro- acétonique (acétone – eau) à (60 : 40 v/v), puis filtré à l'aide d'un papier filtre, puis une goutte de solution de chlorure ferrique à 2% est ajouté à l'extrait acétonique. L'apparition d'une coloration bleu-noirâtre ou verte plus ou moins foncée fut le signe de la présence de polyphénols.

#### **1-3-5-2-3- Caractérisation des flavonoïdes (réaction à la cyanidine)**

La réaction à la cyanidine à permis la caractisation des flavonoïdes. 5ml d'extrait éthanolique est évaporé à 65° C, pendant 10 min. Le filtrat obtenu a été repris dans 1 ml d'acide chlorhydrique concentré. En ajoutant deux à trois copeaux de magnésium, il y aura un dégagement de chaleur ; une coloration rose rouge cerise, orangé ou rouge violacée marque la présence des flavonols, flavones et les flavonones.

#### **1-3-5-2-4- Caractérisation des alcaloïdes**

Un macéré est préparé avec 1g de matière végétale et 3ml d'acide chlorhydrique diluée à 5%. L'ensemble est filtré, puis divisé à trois volumes.

1. Un millilitre de l'extrait est ajouté à deux à trois gouttes de Réactif de Mayer.
2. Un millilitre de l'extrait est ajouté à deux à trois gouttes de Bouchardât.
3. Un millilitre de l'extrait à deux à trois gouttes de Dragondroff.

La présence d'un précipité ou d'une coloration orangée ou brun-rougeâtre, après quelques minutes indique la présence des alcaloïdes.

### **1-3-5-2-5- Caractérisation des anthocyanes**

Deux millilitres d'infusé aqueux sont ajoutés à 2 ml de HCl à 2N. L'apparition d'une coloration rose- rouge qui vire au bleu violacé par addition d'ammoniac indique la présence d'anthocyanes.

### **1-3-5-2-6- Caractérisation des coumarines**

Une quantité de Cinq millilitres d'extrait végétal est évaporé au bain marie jusqu'à obtention d'un volume de 1ml. Un millilitre d'eau chaude a été ajouté. Les 2 ml obtenus sont divisés dans deux tubes en deux volumes égaux. Dans l'un des tubes, 0,5 ml de NH<sub>4</sub>OH dilué à (10%) a été ajouté, l'autre sert de témoin. L'apparition d'une fluorescence bleue sous les rayons UV à 366 nm confirme la présence des coumarines.

### **1-3-5-2-7- Les huiles essentielles**

Grâce a un appareillage de type « Clévenger », l'extraction de l'huile essentielle a été effectuée par hydrodistillation pendant une durée de trois heures pour une quantité de 100g de matière végétale sèche immergée dans 1000 ml d'eau distillée (Clevenger, 1928).

Le liquide obtenue est appelé « distilla » et qui contient deux phase : une phase organique « qui est l'huile essentielle » et une phase aqueuse « eau aromatisée ». Le distilla est versé dans une ampoule de décantation afin d'éliminer la phase aqueuse par différence de densité. L'huile essentielle a été stockée à l'obscurité à 4° C, pour les travaux ultérieurs.

## **I-4 - Etude quantitative des composés phénoliques**

### **I-4-1- Dosage des polyphénols totaux par le réactif de Folin-Ciocalteu (méthode des microplaques)**

Cette analyse a été effectuée au laboratoire « d'Agronomie et Environnement » (INRA, Nancy-Colmar, France).

Les polyphénols produits par les végétaux en tant que métabolites secondaires constituent une large gamme de molécules chimiques, dont leur nature chimique et teneur sont extrêmement variables d'une espèce à une autre. Plusieurs méthodes analytiques peuvent être utilisées pour la quantification des polyphénols totaux. L'analyse par le réactif de Folin–Ciocalteu est la plus utilisée.

Le réactif de Folin-Ciocalteu est un acide de couleur jaune constitué par un mélange d'acide phosphotungstique et d'acide phosphomolybdique. Il est réduit lors de l'oxydation des

phénols en un mélange d'oxyde bleu de tungstène et de molybdène. La coloration produite, dont l'absorption maximum à 765 nm est proportionnelle à la quantité de polyphénols présents dans les extraits végétaux (Molyneux, 2004 ; Portes, 2008).

Pour évaluer les teneurs en polyphénols totaux, la méthode des microplaques a été utilisée. Brièvement, 20 µl d'extrait méthanolique sont ajoutées dans les colonnes 3 à 11. Dans les deux colonnes d'extrémité 20 µl d'eau est additionné. Un étalon a été réalisé avec des concentrations croissantes d'acide gallique allant de 0,4 à 0,0031 mg/ml, rajoutée dans la deuxième colonne de la plaque. Dans tous les puits de la plaque d'essai, 80 µl de réactif de Folin-Ciocalteu dilué au dixième, suivis de 80 µl de carbonate de sodium à 7,5 % sont additionnés (Figure. 14).

La plaque d'essai est incubée dans un lecteur microplaque (SYNERGY HT, BioTek®, logiciel GEN5) dès que le carbonate de sodium est rajouté sous agitation, pendant 5 secs à 25° C. Les données de la dernière lecture à 760 nm sont copiées et insérées dans un fichier ODF via Open Office. Les résultats obtenus sont exprimés en milligramme équivalent acide Gallique par gramme de matière végétale sèche (mg EAG/g MS) (Boizot et Charpentier, 2006).

L'équation de la régression linéaire de la courbe d'étalonnage a été utilisée par calcul des teneurs, selon la formule suivante :

$$\text{Polyphénols totaux} = \text{DO}_{\text{essai}} - \text{DO}_{\text{blanc}} - b/a * 50 * \text{facteur de dilution}$$

Avec :

$\text{DO}_{\text{essai}}$  : Absorbance pour un essai avec l'extrait au 1/4

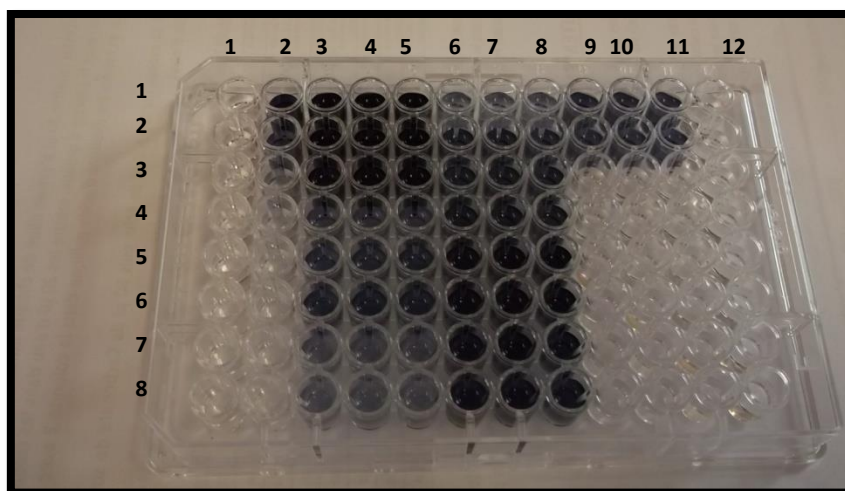
$\text{DO}_{\text{blanc}}$  : Absorbance pour un essai avec l'eau

a : pente de la droite « gamme étalon ».

b : coefficient directeur de la droite « gamme étalon »

50 : pour obtenir la quantité dans 1ml

Facteur de dilution : normalement 4, sauf échantillons peu/ trop concentré (hors gamme).



**Figure 14 :** Illustration d'une plaque d'essai dans laquelle un dosage des polyphénols a été réalisé.

#### **I-4-2- Dosage des flavonoïdes**

Le dosage des flavonoïdes a été réalisé par l'utilisation de la méthode colorimétrique au trichlorure d'aluminium, décrite par Sombié et *al.* (2011). La quantification des flavonoïdes a été effectuée par une méthode basée sur la formation d'un complexe entre les flavonoïdes et le trichlorure d'Aluminium. Le complexe produit est d'une couleur jaune, qui absorbe dans le visible à 415 nm.

Un volume de 1 ml d' $\text{AlCl}_3$  (2%) a été mélangé à un volume égal d'extrait. Les D.O ont été lues après 10 minutes d'incubation, à l'aide d'un spectrophotomètre contre une courbe étalon (voir annexe 4), préalablement tracée avec la quercétine comme substance de référence. Trois lectures ont été faites par échantillon et les résultats ont été exprimés en mg Equivalent Quercétine (EQ) par gramme de matière végétale sèche (mg EQ/g MS)

#### **I-4-3- Extraction des coumarines et furocoumarines**

Cette partie d'étude a été réalisée au laboratoire « Agronomie et environnement » (INRA, Nancy-Colmar, France).

L'extraction des furocoumarines est réalisée selon le protocole de Dugrand et *al.* (2013), avec quelques modifications. 20 mg de feuilles ou de tiges sont broyées en poudre dans l'azote liquide, puis 800  $\mu\text{L}$  de méthanol diluée à 80% est ajouté afin d'y solubiliser les dérivés phénylpropanoïdes. L'homogénéisation du broyat est obtenue en vortexant

vigoureusement, pendant 30 secs (30X100 rpm). Les échantillons sont par la suite, incubés dans un bain à Ultrason pendant 15 min afin d'optimiser l'extraction des phenylpropanoïdes (augmentation de leur solubilisation). Cette solution méthanolique est centrifugée pendant 30 min à 13,2 krpm, afin de séparer le surnageant contenant les molécules d'intérêt et le culot qui contient les produits insolubles. A l'issue de cette étape de centrifugation, le surnageant est récupéré et une deuxième extraction est réalisée afin d'optimiser l'extraction.

800 µL de méthanol 80 % sont ajoutés au culot qui est resuspendu par vortexage pendant 30 sec est de nouveau sous mis dans un bain à Ultrasons, durant 15min. Après une ultracentrifugation de 20 min à 13,2 Krpm, le surnageant dans lequel se trouvent les furocoumarines est ajouté au premier surnageant. La solution finale est évaporée dans un rotavapor. Ensuite, 100µl de méthanol à 80 % sont ajoutés au culot suivi d'une étape de vortexage et de bain à ultrasons.

La dernière étape de centrifugation permet de récupérer les phenylpropanoïdes solubles qui sont aliquotés dans des piluliers avant analyse chromatographique. Chaque extrait est dilué d'un facteur 10 afin de pouvoir quantifier les molécules qui s'avèrent trop concentrées dans la solution mère (phénomène de saturation du signal et points hors gamme) (Royer et *al.*, 2013).

#### **I-4-3-1- Identification des furocoumarines par Chromatographie liquide à haute pression (UPLC/ MS)**

L'analyse chromatographique a été effectuée en utilisant un système NEXERAUHPLC (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japon) équipé d'un réseau de photodiodes (PDA), d'un détecteur (SPDM20A, Shimadzu) combiné avec un spectromètre de masse (simple quadripôle, LCMS2020, Shimadzu).

La séparation a été réalisée sur une colonne de phase inverse C18 (ZORBAX Eclipse Plus), 150 × 2, 10 mm, la taille des particules=1,8µm (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) protégée par un filtre à débordement (Agilent Technologies). Les analyses sont thermostatées à 40° C.

Les solvants permettant la séparation des molécules sont composés de : acide formique (0,1%) dans l'eau ultrapure (tampon A) et 0,1% acide formique dans du méthanol (tampon B). Les composés ont été élues en utilisant un gradient de concentration croissante de tampon B en suivant les ratios A / B suivants : (0 : 90, 10 min), (80 : 20, 0,74 min), (40 : 60, 5,88 min), (10 : 90, 10 min), (0 : 100, 4 min), et (90 : 10, 4 min). Les analyses ont été effectuées à un débit de 0,2 ml / min, et le volume d'injection est de 3µl.

La durée totale de l'analyse est de 20 min. Le système UPLC a été connecté à la station mobile par une double source d'ions (Duis), un mélange entre ionisation électro spray (ESI), et la pression atmosphérique ionisation chimique (APCI). Les températures des blocs sont fixées à 350, 250 et 400° C, respectivement. La tension capillaire a été fixée à 4,5 kV. Pour chaque composé, les tensions de la ligne de désolvatation (DL) et Qarray ont été optimisées pour augmenter la sensibilité de détection. Pour cela, chaque furocoumarine standard a été injectée et analysée directement dans le spectromètre de masse à la concentration de 1µM. La détection est réalisée en un seul mode (détection d'ions (SIM)) pour augmenter la sélectivité.

#### **I-4-3-1-2- Quantification des coumarines et furocoumarines**

La quantification a été réalisée à l'aide d'angélicine comme étalon interne analytique, une furanocoumarine angulaire qui n'est pas présente chez les Rutacées. L'angélicine a été ajoutée à la même concentration (5µM) dans tous les échantillons ainsi que dans les solutions d'étalonnage. Les solutions d'étalonnage contiennent toutes des molécules normalisées aux mêmes concentrations allant de 1 à 30 µmol / L (1, 3, 6, 12, 18, 24 et 30 µmol / L). Les courbes d'étalonnage ont été établies pour chaque composé en reliant l'intensité du pic à la concentration théorique de l'étalon dans la solution. Une régression linéaire est alors réalisée (Dugrand et *al.*, 2013 ; Royer et *al.*, 2013).

### **I-5- Facteurs influençant la composition chimique de l'huile essentielle**

#### **I-5-1- Evolution du rendement en fonction de la durée d'extraction**

La cinétique d'extraction a été explorée en effectuant des prélèvements à intervalles réguliers (chaque 30 minutes) et qui s'étalent de 0 à 180 minutes, dans le but d'en récupérer des quantités significatives et mesurables. Les quantités des huiles essentielles obtenues permettent le calcul des rendements à chaque intervalle de temps.

Les conditions opératoires suivies dans cette expérimentation sont les suivantes :

- La masse de la matière végétale utilisée : 50 g
- La durée d'extraction est de 30, 60, 90, 180 min.
- Le volume d'eau 1000 ml.

#### **I-5-1-1- Evolution du rendement en fonction de la masse végétale**

Afin de visualiser l'effet de la masse de la matière végétale sur le rendement d'extraction des huiles essentielles, des extractions sur la matière végétale ayant des masses

différentes (25 g ; 50 g ; 75 g et 100 g) ont été effectuées dans un temps d'extraction de 1h 30min pour les masses de 25 et 50 g et de 3 heures pour celles de 75 et 100 g.

Les conditions opératoires suivies dans cette expérimentation sont résumées comme suit :

- La masse de la matière végétale utilisée : 25 g ; 50 g ; 75 g et 100 g
- La durée d'extraction est de 1h30 min pour (25g et 50g) et 3 heures pour 75 et 100 g.
- Le volume d'eau 1000 ml.

#### **I-5-1-2- Evolution du rendement en fonction du volume d'eau distillée**

Le but visé dans cette partie d'étude est d'évaluer l'effet du volume d'eau sur le rendement en huile essentielle. Pour cela, une quantité fixe de 50 g de matière végétale est utilisée pour des volumes d'eau allant de 250 ml à 1000 ml.

Les conditions opératoires sont les suivantes:

- La masse de la matière végétale utilisée : 50 g
- Les volumes d'eau utilisées est de 250 ml ; 500 ml ; 750 ml ; 1000 ml.
- La durée d'extraction 3 heures.

#### **I-5-1-3- Détermination de la cinétique d'extraction**

La cinétique a été explorée en effectuant des prélèvements à intervalles réguliers (chaque 30 minutes) et qui s'étalent de 0 à 180 minutes dans le but d'en récupérer des quantités significatives et mesurables. Les quantités des huiles essentielles obtenues permettent le calcul des rendements à chaque intervalle de temps.

Les conditions opératoires suivies dans cette expérimentation sont les suivantes :

- La masse de la matière végétale utilisée : 50 g
- La durée d'extraction est de 30, 60, 90, 180 min.
- Le volume d'eau 1000 ml.
- La saison de la récolte.

#### **I-5-1-4- Détermination du rendement d'extraction**

Selon la norme AFNOR (1988), le rendement en huile essentielle ( $RD_{HE}$ ) est défini comme étant le rapport entre la masse de l'huile essentielle obtenue après extraction ( $M_{HE}$ ) et la masse de la matière végétale utilisée ( $M_{MV}$ ). Il est donné par la formule suivante :

$$RD\% = M_{HE} / M_{MV} \times 100$$

$M_{HE}$  : masse en gramme de l'huile essentielle

$M_{MV}$  : masse en gramme du matériel végétal

**RD** : rendement de l'extraction

## **I-5-2- Analyses des huiles essentielles**

### **I-5-2-1- Détermination de l'indice de réfraction**

L'indice de réfraction d'une huile essentielle est le rapport entre le sinus de l'angle d'incidence et le sinus de l'angle de réfraction d'un rayon lumineux de longueur d'onde déterminée, passant de l'air dans l'huile essentielle maintenue à une température constante.

Un réfractomètre permettant la lecture directe de l'indice de réfraction située entre 1,300 et 1,700. L'appareil est ajusté de manière à donner, à la température de 20° C, une valeur de 1,333 pour l'eau distillée (AFNOR, 2000).

Les différentes caractéristiques organoleptiques (aspect, couleur, odeur) de l'essence des plantes ont été notées.

### **I-5-2-2- Analyse chimique des huiles essentielles extraites par GC/FID**

L'analyse des huiles essentielles de la partie aérienne des plantes étudiées a été effectuée par chromatographie en phase gazeuse couplée à un détecteur à ionisation de flamme au laboratoire d'analyse des extraits végétaux et des arômes « LEXVA Analytique, Saint-Beauzire (France) », laboratoire d'analyse des extraits végétaux et des arômes (France). L'analyse GC/FID a été réalisée grâce à un Chromatographe AGILENT 7890 couplé à un spectromètre de masse AGILENT 5975. Le chromatographe est équipé d'une colonne capillaire de type apolaire DB5 MS (20 m long, diam 0,180 mm ep 0.18 µm). La colonne est programmée à une température de 50° C pendant 3,2 min, avec 8° C d'augmentation par min puis porté à 300° C; il a été maintenu pendant 5 min. Le gaz vecteur est l'hélium pulsé à la vitesse de 1m/mn. Les températures de détecteur et de l'injecteur ont été maintenues respectivement à 280 et 250° C. Le spectromètre de masse a été réalisé en utilisant la gamme 33-400 amu.s<sup>-1</sup>, avec un voltage ionisant de 70 eV.

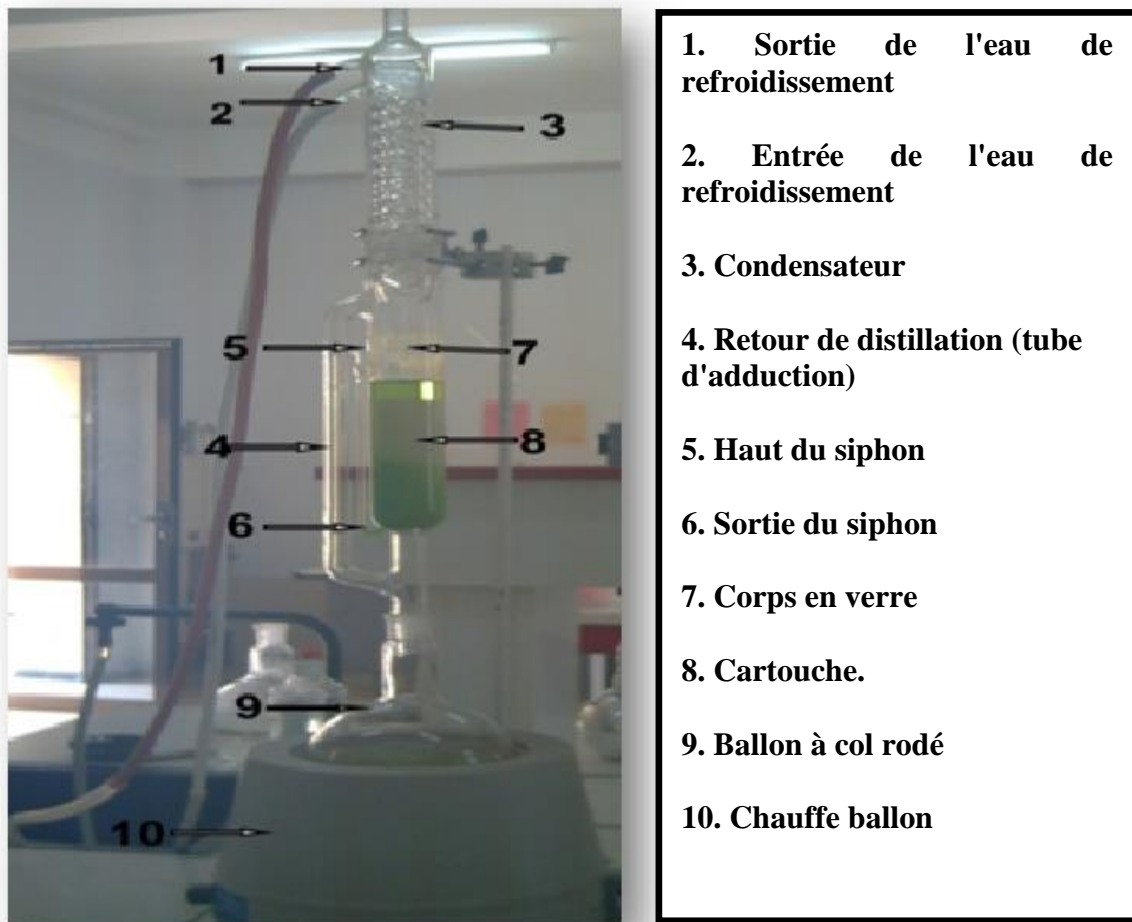
L'analyse en GC/FID a été effectuée par chromatographie en phase gazeuse AGILENT 6890 en utilisant un détecteur FID.

### **I-5-2-3-Préparation de l'extrait méthanolique**

Après la collecte, la partie aérienne des échantillons des trois espèces étudiées sont mis à l'air libre. Les tiges et les feuilles sont ensuite séparées manuellement, broyées, puis pesées à sec. L'extraction est réalisée dans un appareil « soxhlet » surmonté d'un réfrigérant (condensateur) porté par un ballon contenant 800 ml de méthanol. Ainsi, 8g de matière végétale broyée (feuilles ou tiges) est placée dans une cartouche en papier filtre. En chauffant, le solvant s'évapore, se condense dans le réfrigérant, retombe dans l'extracteur, solubilise les principes actifs et retourne dans le ballon de récupération : l'opération est répétée plusieurs fois jusqu'à épuisement total de la plante (épuisement après six cycles) (Fig. 15).

Le temps de traitement diffère selon l'espèce et l'organe (tiges ou feuilles) utilisé. La solution méthanolique obtenue est ensuite destinée à l'évaporation dans un évaporateur rotatif (Büchi Rotavapor R-200), pour enfin récupérer uniquement le résidu sec qui est ensuite pesé pour calculer le rendement de chaque plante. Le résidu sec est récupéré du ballon avec quelques millilitres de méthanol et conservé à + 4° C et à l'obscurité.

A partir de la solution mère de l'extrait alcoolique, des dilutions de (1000, 2000, 3000 et 4000 et 5000 µl) ont été préparées dans 9 ml de DMSO. Dans chaque boîte Pétri 1 ml de chaque concentration est versée dans le milieu de culture (PDA). Trois répétitions sont retenues pour chaque concentration (El-Haci et *al.*, 2012).



**Figure 15 :** Dispositif soxhlet (Photos originale).

### 1-8-2-2-Calcul du rendement d'extraction

Le rendement d'extraction est exprimé en pourcentage par rapport au poids du matériel sec du départ, il est déterminé par la relation suivante :

$$\text{RD (\%)} = \frac{M_{\text{ext sèche}}}{M_{\text{ext}}} \times 100$$

$M_{\text{ext}}$  : la masse d'extrait avant l'évaporation (en g).

$M_{\text{ext sèche}}$  : la masse de l'extrait après l'évaporation (en g).

**RD** : le rendement.

## I-6-Activités biologiques

### I-6-1- Evaluation, *in vitro*, de l'activité antioxydante de l'extrait méthanolique

Le test de piégeage du radical DPPH par la méthode des microplaques a été évaluée au laboratoire d'Agronomie et environnement (INRA, Nancy-Colmar, France). Ce test, qui utilise une réaction d'oxydoréduction avec le radical DPPH (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl), a été utilisé pour déterminer la capacité antioxydante des extraits méthanoliques. Le radical a une couleur violette en raison de l'électron non apparié de l'azote, et après réaction avec l'atome d'oxygène d'un piègeur de radicaux, il s'ensuit la réduction du radical 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl et la formation du DPPH-H (2,2-diphényl-1-picrylhydrazin) de couleur jaune. Le changement de couleur peut être suivi par spectrophotométrie à 517 nm et de cette façon le potentiel antioxydant de l'extrait de la plante peut être déterminé (Popovici et *al.*, 2009).

Chaque extrait est dilué dans 100  $\mu$ l de méthanol, puis dilué en cascade d'une dilution de 1/2 jusqu'à une dilution de 1/128 (Fig. 16).

La solution de DPPH a été préparée par solubilisation de 4,72 mg de DPPH dans 100 ml de méthanol. 70 $\mu$ l des solutions des extraits de phenylpropanoïdes des tiges et des feuilles des espèces étudiées ou 70 $\mu$ l du standard (Acide Ascorbique) ont été ajoutés à 140 $\mu$ l de DPPH. Les mélanges ont été agités et incubés à l'obscurité pendant 30 min. La décoloration est comparée au contrôle négatif contenant seulement la solution de DPPH mesurée à 517 nm. Ainsi le mélange réactionnel sera réalisée directement dans des puits et la plaque sera incubée à l'obscurité, puis lue directement dans l'appareil. La lecture des microplaques à 96 puits se fait au lecteur de microplaques SYNERGY HT BioTek, avec le logiciel GEN5. La réalisation de la cinétique de cette activité a permis de déterminer les concentrations qui correspondent à 50 % d'inhibition (IC50) ainsi que leurs taux d'inhibitions; *via* la mesure du taux de décoloration du radical DPPH du violet au jaune en spectrophotométrie. La valeur d'IC50 la plus faible correspond à l'efficacité de l'extrait la plus élevée, elle est exprimée en mg/ml (Kim et *al.*, 2003).

Les valeurs des absorbances mesurées permettent de déterminer, pour chaque concentration testée, le pouvoir antioxydant (PA). Elles sont calculées grâce à la formule suivante :

$$\text{PA (\%)} = 1 - \frac{\text{DO}_{\text{essai}} - \text{DO}_{\text{blanc}}}{\text{DO}_{100\%}} \times 100$$

Avec :

PA : Pouvoir antioxydant

DO<sub>essai</sub> : 1/3 solution d'extrait+2/3 solution de DPPH

DO<sub>blanc</sub> : 1/3 solution d'extrait+2/3 méthanol

DO<sub>100%</sub> : 1/3 méthanol+2/3 solution de DPPH



**Figure 16:** Test du DPPH en microplaques des tiges et des feuilles de *H.tuberculatum*.

### **I-7- Estimation de l'activité larvicide de l'huile essentielle des trois espèces vis- a- vis de *Tuta absoluta***

Les tests de l'activité larvicide ont été réalisés au laboratoire de protection des végétaux (Université de Mostaganem).

#### **I-7-1- Préparation des doses de l'huile essentielle**

Différentes doses de l'huile essentielle obtenues (2, 4, 6, 8, 10 µl/ml) ont été préparées, en diluant dans chaque dose 1ml de solvant (acétone) dans les volumes successifs de l'huile essentielle (Ndomo et *al.*, 2009).

#### **I-7-2-Toxicité de l'huile essentielle par contact direct**

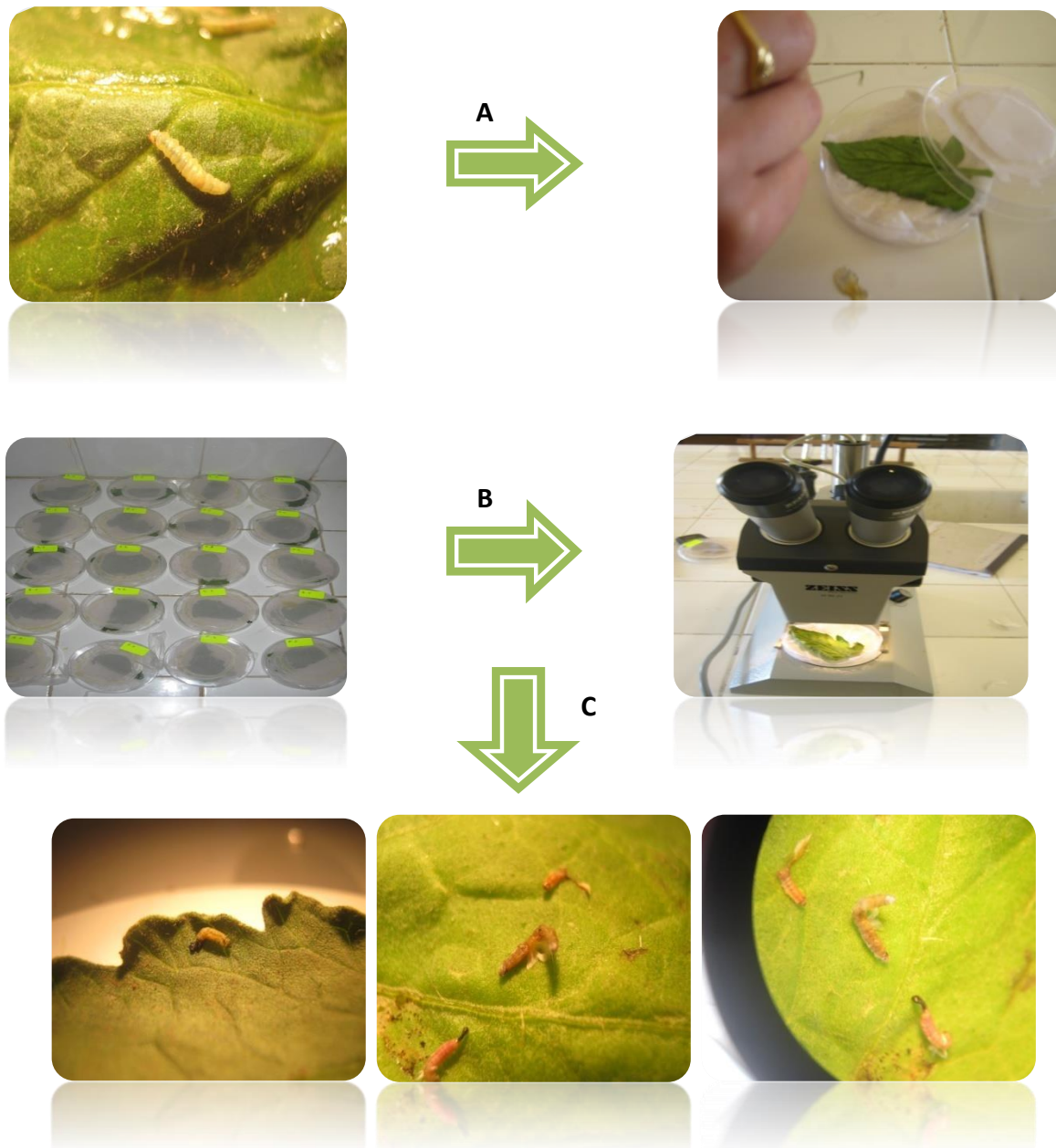
Vingt larves de *Tuta absoluta* portées par une feuille fraîche de tomate sont introduites dans une boîte de Pétri. Pour chaque dose (témoin compris), cinq répétitions de l'huile essentielle de *H. tuberculatum* et de *R. chalepensis* ont été réalisées. Pour empêcher la sortie des insectes, les boîtes sont recouvertes de moustiquaires. Concernant le témoin, les

feuilles portant les larves de *Tuta absoluta* sont imprégnées d'acétone. Les larves mortes ont été comptées toutes les 24h pendant trois jours (Fig. 17).

Les mortalités dans les boîtes traitées ( $M_0$ ) ont été exprimées selon la formule d'Abbott en mortalité corrigées (MC), tenant compte des mortalités naturelles observées dans les boîtes témoins ( $M_t$ ) selon la formule suivante :

$$MC = \frac{M_0 - M_t}{100 - M_t} * 100$$

La dose létale pour 50% de la population d'insectes ( $DL_{50}$ ) et la dose létale pour 100% de la population d'insectes ( $DL_{100}$ ) sont calculées par la méthode de Probits (Finney, 1971 ; Fokialakis et *al.*, 2006 ; Sen-Sung et *al.*, 2008).



A : Prélèvement des larves de *T. absoluta*

B : Observation microscopique

C : Comptage des larves mortes de *T. absoluta*.

**Figure 17:** Différentes étapes du test d'évaluation de l'activité larvicide de l'huile essentielle vis-à-vis de *Tuta absoluta*

## **I-8- Activité antifongique de l'huile essentielle et de l'extrait méthanolique des trois espèces étudiées**

### **I-8-1- Activité antifongique de l'huile essentielle des trois espèces étudiées**

Après stérilisation et répartition des milieux dans des boîtes de Pétri à raison de 15 ml par boîte, l'extrait de l'huile essentielle est dilués avec le D.M.S.O (diméthyle sulfoxyde) (v : v) jusqu'à l'obtention des concentrations désirées (0, 0,25%, 0,5%, 1%, 2% et 3%). Une quantité de 1ml de chaque concentration sont rajoutées à chaque boîte de Pétri contenant le milieu de culture en surfusion. Après solidification du milieu, l'ensemencement se réalise avec des explants de 5 mm de diamètre prélevés d'une culture âgée de sept jours, à l'aide d'un emporte pièce stérile. Ces explants sont déposés dans un puit creusé préalablement avec une pipete pasteur stérile au centre de la boîte de Pétri, contenant des doses croissantes d'huile essentielle. Trois répétitions sont retenues pour chaque concentration (Chang *et al.*, 2000 ; Kordali, *et al.*, 2003 ; Kolai *et al.*, 2012 ).

Des mesures de diamètre des colonies ont été faites à la fin d'incubation, pour chaque concentration, afin d'évaluer la croissance mycélienne et le taux d'inhibition.

### **I-8-2- Activité antifongique de l'extrait méthanolique des trois espèces étudiées**

#### **I-8-2-3- Evaluation de la croissance mycélienne**

La technique utilisée est celle décrite par Brewer (1960) et Leach (1962), qui consiste à mesurer la croissance linéaire et diamétrale en utilisant la formule suivante :

$$L = D - d / 2$$

Ou :

**L** : Croissance mycélienne ;

**D** : Diamètre de la colonie ;

**d** : Diamètre de l'explant.

#### **I-8-2-4- Evaluation du taux d'inhibition de la croissance mycélienne**

L'action antifongique a été déterminée par la mesure de l'inhibition de la croissance de la colonie fongique, en utilisant la formule décrite par Leroux et Credet (2003).

$$T\% = \frac{L-I}{L} \times 100$$

**T** : Taux d'inhibition de la croissance du mycélium en pourcentage ;

**L** : Diamètre de la colonie mycélienne témoin, en centimètre ;

**I** : Diamètre de la colonie mycélienne dans l'expérience.

#### **I-8-2-5- Analyse par HPLC-UV des extraits méthanoliques**

L'analyse a été réalisée au centre technologique des résidus industriels (Université à Rouyn-Noranda, Canada). L'identification de chaque composé est établie en comparant les temps de rétention et les spectres UV des pics de l'échantillon avec ceux obtenus par l'injection des standards.

#### **I-9- Activité antibactérienne de *Pectobacterium carotovorum***

##### **I-9-1-Test de confirmation de la souche bactérienne**

L'identification de la souche bactérienne a été confirmée au préalable par le laboratoire de Microbiologie de l'Université de Mostaganem. La pureté de la souche a été vérifiée par une étude microscopique (Coloration de Gram) et des tests biochimiques (Galerie API20E).

##### **I-9-2- Conservation de la souche bactérienne**

Des repiquages successifs dans des tubes de gélose ont été effectués par piqure centrale. Les tubes sont ensuite incubés à 37° C pendant 24 heures, puis conservés dans le réfrigérateur à 4° C.

##### **I-9-3- Test « *in-vitro* » de l'activité antibactérienne des extraits (huile essentielle et de l'extrait méthanolique)**

###### **I-9-3-1-Préparation de la préculture**

L'activité antibactérienne a été réalisée sur une souche bactérienne jeune en phase de croissance exponentielle. La réactivation des cultures est effectuée par repiquage sur milieu Mueller-Hinton puis incubée à 37° C pendant 18 à 24h.

### **I-9-3-2- Préparation de la suspension bactérienne**

Dans 5 ml de bouillon nutritif, 3 à 5 colonies similaires bien isolées sont déchargées. Après homogénéisation de la suspension bactérienne à l'aide d'un vortex, la standardisation à 0,5 Mc Ferland est réalisée par spectrophotomètre réglé à une longueur d'onde de 600 nm. La densité optique obtenue doit être comprise entre 0,08 et 0,1, ce qui correspond à une concentration de  $10^7$  à  $10^8$  UFC/ml (Rasooli et *al.*, 2006).

### **I-9-3-3- Méthodes utilisées pour l'évaluation de l'activité antibactérienne**

L'évaluation des deux extraits (huiles essentielles et extraits méthanoliques) a été réalisée par deux méthodes :

#### **I-9-3-3-1- Méthode des disques**

L'aromatogramme est basé sur une technique utilisée en bactériologie appelée antibiogramme ou aromatochrome. La méthode des disques est une méthode décrite par Vincent (1991). Le principe de l'aromatogramme est inspiré de l'antibiogramme, il consiste à tester la sensibilité des souches bactériennes par la diffusion de l'extrait sur le milieu solide dans une boîte de Pétri, avec la création d'un gradient de concentration entre le disque et la distance de migration du composé. L'apparition et l'importance du diamètre de la zone d'inhibition reflète l'impact des huiles essentielles et des extraits méthanoliques sur la croissance des souches bactériennes. Ainsi, ces dernières seront qualifiées de sensibles, très sensibles, ou résistantes (Shryock et *al.*, 2002).

#### **I-9-3-3-2- Méthodes des puits**

Méthode proposée par Cooper et Woodman en 1946 et, reprise par Shroeder et Messing en 1949. Elle assure une diffusion radiale de l'extrait à partir d'un puit en donnant une zone d'inhibition claire facilement mesurable. La méthode consiste à découper un trou circulaire dans la gélose et y verser une solution de l'extrait de concentration connue. L'extrait diffus radialement en donnant une zone d'inhibition circulaire à la surface de la gélose préalablementensemencée avec la suspension bactérienne (Eymard, 2003).

### **I-9-4- Préparation des dilutions**

Une série de dilution des extraits a été réalisée allant de 1/2, 1/4, 1/8, 1/16 avec un solvant organique (DMSO) (Rasooli et *al.*, 2006).

On a opté pour le DMSO pour son innocuité vis-à-vis des microorganismes, et pour l'absence d'interférence avec l'extrait.

### **I-9-5- Étalement**

Dans des boîtes de Pétri, on coule aseptiquement le milieu de culture « Mueller Hinton » à raison de 15ml par boîte. Après solidification, un écouvillon stérile a été imbibé dans la suspension bactérienne et étalé à la surface du milieu à trois reprises, en tournant la boîte à environ 60° C après chaque application, dans le but d'avoir une distribution égale à l'inoculum.

### **I-9-6- Application des disques et expression des résultats**

Les disques stériles (ANTBIO006, Filtres RS), de 6 mm de diamètre imprégnés de différentes dilutions d'extraits à raison de 10 µl par disque, ont été déposés à l'aide d'une pince stérile sur la surface du milieu. Des disques témoins imbibés seulement par le DMSO ont été réalisés. Les boîtes ont été incubées 24 h à 37° C (Shryock et *al.*, 2002).

L'effet de l'huile essentielle et des extraits méthanoliques sur la bactérie est apprécié par la mesure du diamètre de la zone d'inhibition (Parada et *al.*, 2009). Chaque essai a été répété trois fois dans les mêmes conditions expérimentales.

### **I-9-7- Analyse statistique des données**

Les résultats obtenus ont subi une analyse de variance par le logiciel statistique Stat box (version 6,4), ils sont représentés sous forme de moyenne ± Ecart type. Les résultats sont considérés non significatifs lorsque  $p > 0,05$  et significatif quand  $p < 0,05$ .

**RESULTATS ET  
DISCUSSION**

## II-1- Composition chimique

Les résultats des taux d'humidité, sont résumés dans les figures 18, 19 et 20. Les espèces étudiées présentent des teneurs importantes en humidité. Les données relevées sont incluses dans une gamme comprise entre  $29,00\% \pm 2,51$  et  $78,08\% \pm 2,89$ . La valeur la plus importante a été enregistrée chez *Ruta chalepensis* avec une valeur de  $78,08\% \pm 2,89$ , ce qui signifie que plus de la moitié du poids de la plante fraîche est constitué d'eau. Ceci concorde les résultats de Daoudi et al. (2016), où le taux d'humidité prélevé sur cette espèce en provenance de la région de Zerhoun (Maroc) a été de 66,34%.

Selon Paris et Moysse (1965), les végétaux sont riches en eau, les plantes fraîches renferment 60 à 80 % d'eau. Pour assurer une bonne conservation, la teneur en eau doit être inférieure ou égale à 10 %.

Les espèces récoltées dans le Sud et l'Est Algérien (*Ruta angustifolia* et *Haplophyllum tuberculatum*) ne renferment qu'une faible proportion en eau, les taux d'humidité étant de 29 % et 31,08 %, respectivement. Néanmoins, les taux obtenus sont relativement importants par rapport à ceux rapportés par Bouzidi et al. (2012) sur *Ruta chalepensis* récoltées dans le Nord-Ouest Algérien soit, 19,01%.

Le taux élevé en humidité des plantes peut être lié au climat de leurs habitats. En effet, les plantes choisies, pour cette étude, proviennent des régions où les conditions climatiques sont différentes (Tab. 3) En plus, la teneur faible en eau enregistrée peut être expliquée par la stratégie adaptative de l'espèce. Selon Quézel et Santa (1963), les plantes xérophytes qui vivent dans les milieux aride et semi-aride s'adaptent à la sécheresse par la réduction de la surface foliaire (feuilles réduites), l'évaporation de l'eau et la production des huiles essentielles.

L'analyse statistique montre des différences significatives entre les moyennes d'humidités des espèces étudiées ( $F_2=27,168$  ;  $P = 0$ ) (Annexe 1, Tab. 5).

Il en est de même pour le taux de la matière sèche. Les taux en matière sèche sont compris entre  $21,91\% \pm 2,89$  et  $71,00\% \pm 2,51$ . La teneur la plus élevée est observée dans les échantillons d'*Haplophyllum tuberculatum*  $71\% \pm 2,51$  et la plus faible sur *Ruta chalepensis*  $21,91\% \pm 2,89$ . Une teneur intermédiaire est notée pour *Ruta angustifolia*  $68,08\% \pm 1,01$ . La variabilité de la teneur en matière sèche peut être expliquée par le stade de développement des plantes lors de la collecte. Selon Vitti et al. (2005), les plantes collectées au stade de maturation renferment des teneurs très importantes en matière sèche, par rapport à celles qui sont collectées au début de la floraison.

Selon les résultats enregistrés, les teneurs en matière sèche des trois espèces diffèrent significativement ( $F_2=3072,625$  ;  $P < 0,05$ ) (Annexe 1, Tab. 4).

Les espèces du Sud et de l'Est Algérien (*H. tuberculatum* et *R. angustifolia*) renferment un taux relativement élevé en matière organique avec  $62,08\% \pm 1,12$  et  $64,00\% \pm 3,05$ , respectivement. La plus faible est enregistrée pour *R. chalepensis* (régions de Mostaganem) et contient  $18,66\% \pm 3,39$ .

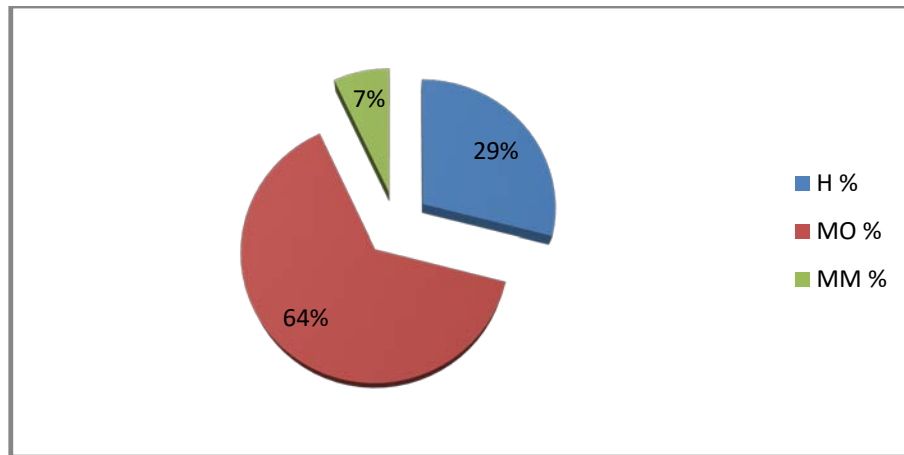
La variabilité observée peut être en partie attribuée aux conditions climatiques et surtout aux variations saisonnières de température et de pluviométrie qui déterminent la composition chimique de la plante. Le stade végétatif au moment de la récolte, le type de sol semble aussi influencer la teneur en matière organique de chaque plante (Pouget, 1980 ; Mucciarelli, 1985 ; Kamalak et al., 2005 ; Chehma et al., 2010) .

Les résultats de l'analyse statistique ont montré des différences significatives entre les taux de la matière organiques des espèces étudiées ( $F_2=8100,956$  ;  $P < 0,05$ ) (Annexe 1, Tab. 2).

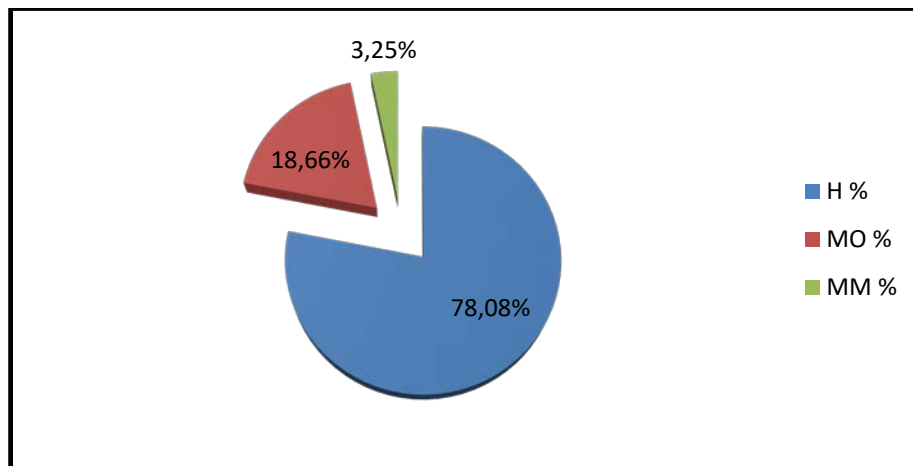
Comparativement à la matière organique, les analyses de la matière minérale ont révélé des proportions faibles. C'est les plantes cueillies dans la région de Mostaganem (*R. chalepensis*) qui ont enregistré un taux faible avec une valeur de l'ordre de  $3,25\% \pm 0,5$ , par rapport à celle de *Ruta angustifolia* (Bordj Bouarridj) et *Haplophyllum tuberculatum* (Adrar) avec un taux de 7%. Des facteurs tels que le type de sol, le climat, le stade de maturité et la saison contribuent à la variation de la concentration des éléments minéraux.

Statistiquement, une différence significative entre les moyennes des taux de la matière minérale a été observée ( $F_2=2039,107$  ;  $P < 0,05$ ) (Annexe 1, Tab. 3).

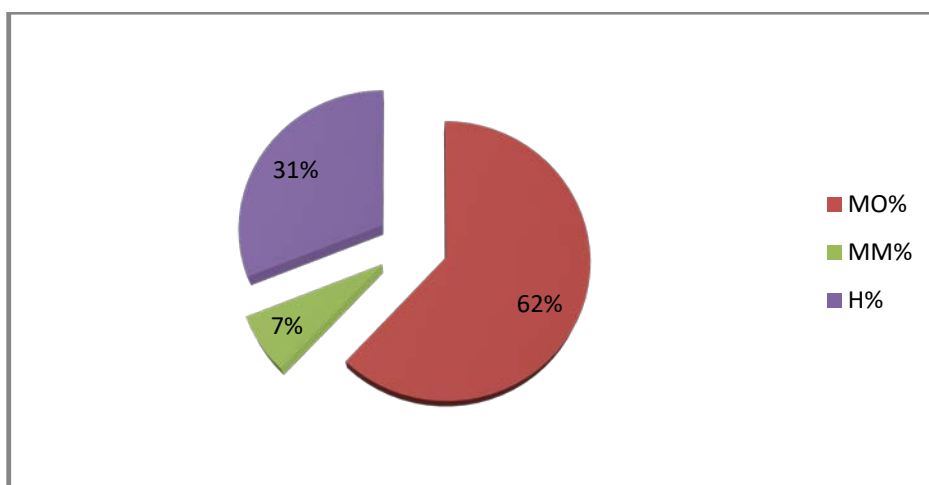
Le Houerou (1980) affirme que les variations rencontrées dans la teneur en eau, la matière minérale et organique, peuvent être dues à certains facteurs climatiques, écologiques, l'âge de la plante, le stade de maturité, lieux de récolte ou même à des facteurs génétiques.



**Figure 18 :** Taux d'humidité, matière organique et minérale d'*Haplophyllum tuberculatum* (Forsk) A.Juss. (Région d'Adrar).



**Figure 19 :** Taux d'humidité, matière organique et minérale de *Ruta chalepensis* L (Région de Mostaganem).



**Figure 20:** Taux d'humidité, matière organique et minérale de *Ruta angustifolia* Pers. (Région de Bordj bou arreridj).

## II-2- Screening phytochimique

Afin de détecter les différentes familles de métabolites secondaires existants dans la partie aérienne des trois plantes étudiées, un criblage phytochimique a été nécessaire.

Les tests phytochimiques consistent à détecter les différentes familles de composés chimiques par des réactions qualitatives de caractérisation. La détection de ces composés chimiques est basée sur des essais de solubilité des constituants, des réactions de précipitation et de turbidité, un changement de couleur spécifique ou un examen sous la lumière ultraviolette.

Les résultats des tests phytochimiques des tiges et des feuilles des trois espèces : *Ruta chalepensis* (Mostaganem), *Ruta angustifolia* (Bordj Bou Arreridj) et *Haplophylum tuberculatum* (Adrar) sont regroupés dans le Tableau 4.

**Tableau 4** : Résultat du criblage phytochimique.

		Mostaganem		Adrar		Bordj Bou Arreridj	
		feuilles	tiges	feuilles	tiges	feuilles	tiges
<b>Saponosides</b>		++	+	+	-	-	+
<b>Tanins</b>	<b>T. catéchique</b>	+++	+++	-	+++	-	+++
	<b>T. gallique</b>	-	-	+++	-	+++	-
<b>Sucres Réducteurs</b>		+++	+++	+++	+++	+++	+++
<b>Flavonoïdes</b>		+++ <b>Flavanones</b>	+++ <b>Flavanoles</b>	+++ <b>Flavanones</b> <b>Flavanoles</b>	+++ <b>Flavanoles</b>	+++ <b>Flavanoles</b>	+++ <b>Flavanoles</b>
<b>Alcaloïdes</b>	Réactif de <b>Bouchardât</b>	+++	+++	+++	+++	+++	+++
	Réactif de <b>Dragendorff</b>	+++	+++	+++	+++	+++	+++
	Réactif de <b>Mayer.</b>	+++	-	+++	-	+++	-
<b>Anthocyanes</b>		-	-	-	-	-	-
<b>Polyphénols</b>		+++	+++	+++	+++	+++	+++
<b>Coumarines</b>		+++	+++	+++	+++	+++	+++

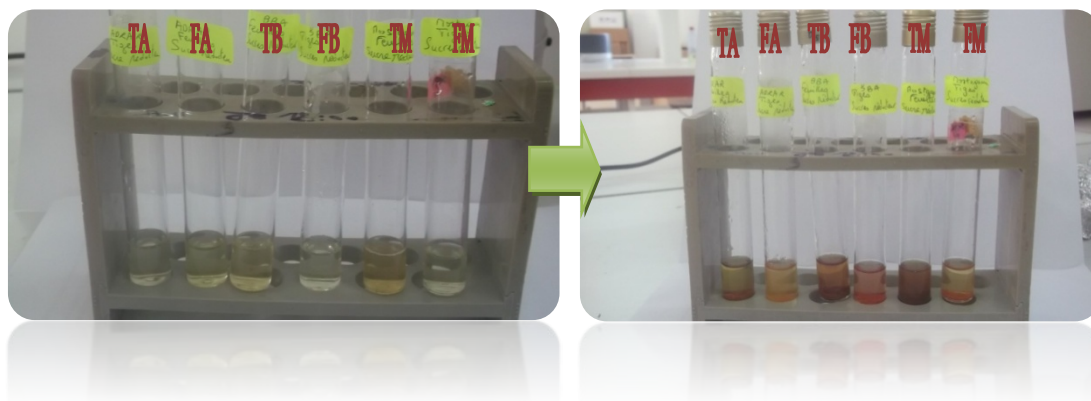
+++ : Réaction très positive

++ : Réaction moyennement positive

+ : Réaction faiblement positive

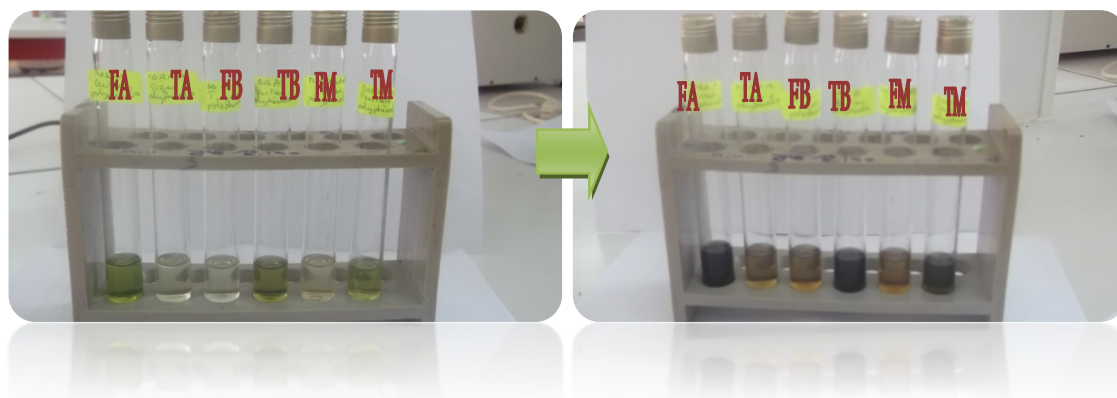
- : Absence

Ces essais phytochimiques indiquent que les espèces choisies pour cette étude sont riches en métabolites secondaires : elles renferment des polyphénols totaux, flavonoïdes, alcaloïdes, sucres réducteurs, tanins, et des coumarines (Fig. 21 et 22). Ces tests ont également décelé une réaction sensible à la présence des saponosides et une absence totale des anthocyanes.



**Figure 21** : Caractérisation des sucres réducteurs.

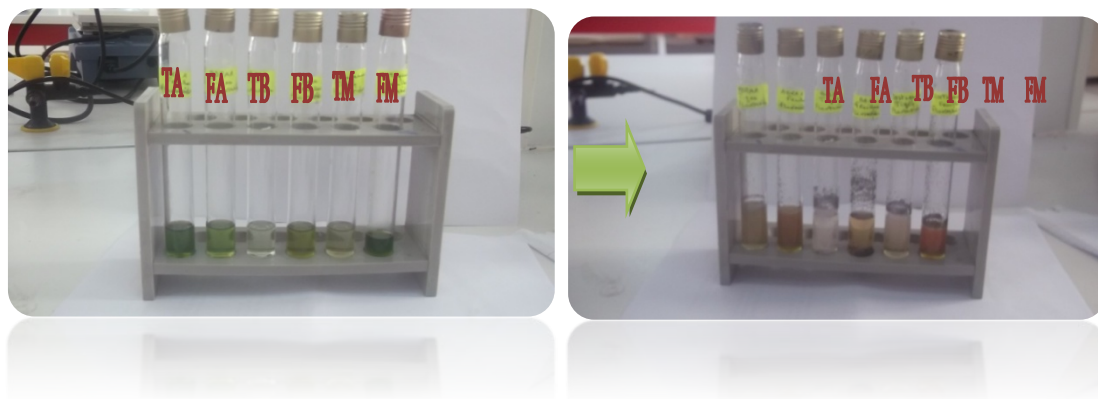
**FA** : Feuilles de *Haplophyllum tuberculatum* (Adrar) ; **TA** : Tiges de *Haplophyllum tuberculatum* (Adrar) ; **FB** : Feuilles de *Ruta angustifolia* (Bordj bou arriridj) ; **TB** : Tiges de *Ruta angustifolia* (Bordj bou arriridj) ; **FM** : Feuilles de *Ruta chalepensis* (Mostaganem) ; **TM** : Tiges de *Ruta chalepensis* (Mostaganem).



**Figure 22** : Caractérisation des polyphénols totaux.

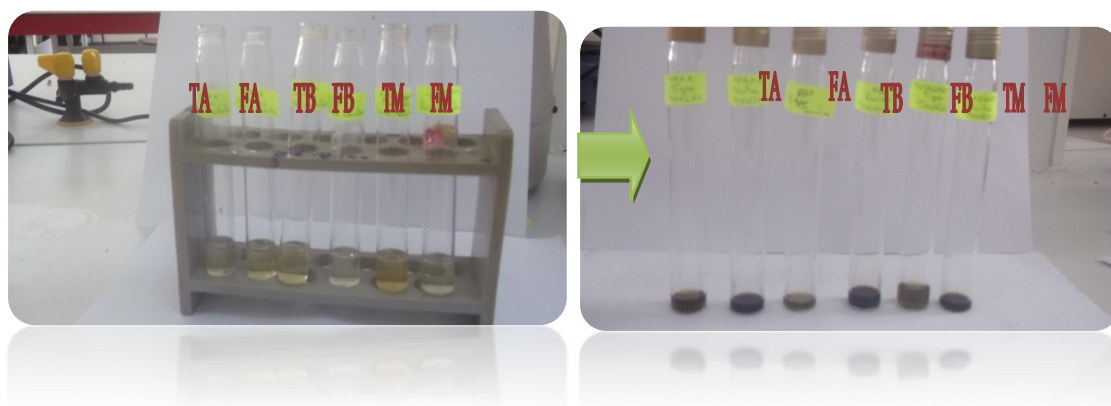
La présence des flavonoïdes est confirmée par l'apparition d'une couleur rouge intense en contact avec la tournure de Magnésium. Ce test a dévoilé leurs présences dans les tiges et les feuilles des trois plantes. La réaction de cyanidine confirme la présence de flavanones, flavanonols dans les feuilles d' *H. tuberculatum*, de flavanones dans les feuilles de

*R. chalepensis* et *H. tuberculatum* ; et de flavanols dans les tiges et feuilles de *R. angustifolia* et *H. tuberculatum* ainsi que dans les tiges de *R. chalepensis* (Fig. 23).



**Figure 23** : Caractérisation des Flavonoïdes.

Les tanins sont présents avec une intensité importante dans les extraits méthanoliques, leurs présences est confirmées par une réaction positive avec la solution de chlorure ferrique, en donnant une coloration bleu verdâtre pour les feuilles et tiges de *R. chalepensis* ainsi que les tiges de *R. angustifolia* et *H. tuberculatum* ; il s'agit donc des tanins catéchiques. La coloration noir obtenue avec les feuilles de *R. angustifolia* et *H. tuberculatum* confirme la présence des tanins galliques (Fig. 24).



**Figure 24** : Caractérisation des Tannins.

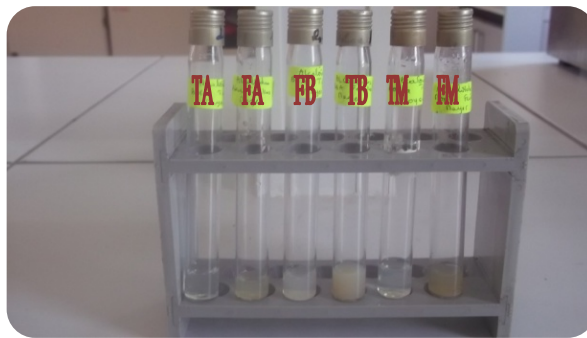
La présence des alcaloïdes a été confirmée par l'utilisation de trois réactifs (Bouchardât et Dragondorf et Mayer). Le réactif de Mayer n'a pas détecté nettement leurs présences dans les tiges qui peut être insignifiante (Fig. 25).



Test de Mayer



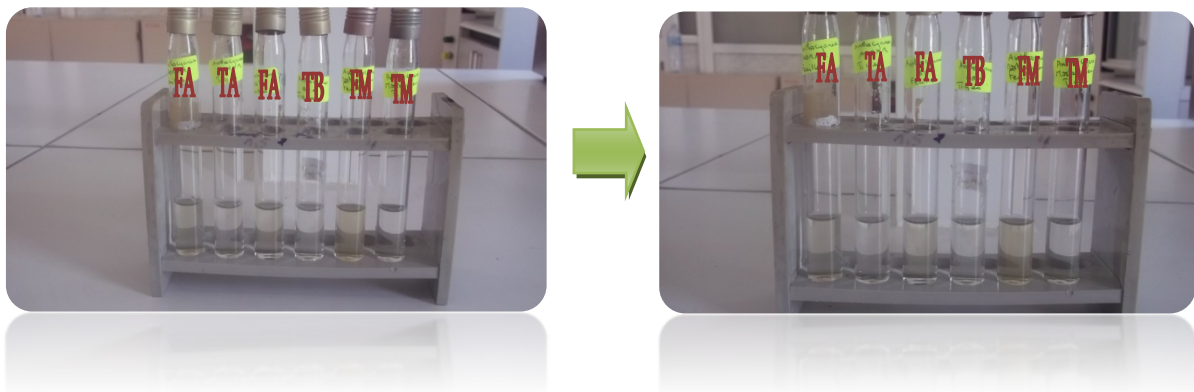
Test de Bouchardât

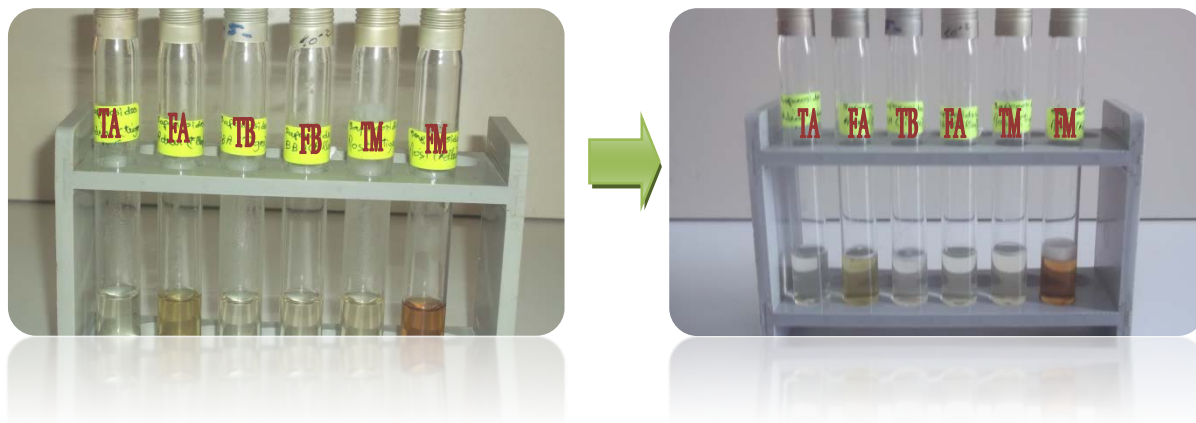


Test de Dragendorff

**Figure 25** : Caractérisation des alcaloïdes.

On constate également l'absence totale des anthocyanes (Fig. 26) et la présence des saponosides (Fig. 27) dans les feuilles d'*H. tuberculatum*, les feuilles et tiges de *R. chalepensis* et les tiges de *R. angustifolia*, avec des quantités moins importantes.

**Figure 26** : Caractérisation des Anthraquinone.



**Figure 27** : Caractérisation des Saponosides.

Cependant, l'apparition d'une fluorescence bleue sous une lumière ultra-violette indique clairement la présence des coumarines dans la partie aérienne des trois espèces (Fig. 28).



*Haplophyllum tuberculatum*-tiges



*Ruta chalepensis*.L-feuilles

**Figure 28** : Caractérisations des coumarines sous UV à 254 nm.

D'après plusieurs auteurs, les trois espèces renferment des acides aminés, saponines, alcaloïdes, flavonoïdes, coumarines et furocoumarines, tannins, huiles essentielles, glycosides, stérols et les triterpènes (Hnatyszyn et *al.*, 1974 ; Chen et *al.*, 2001 ).

Hnatyszyn et *al.* (1974) ont également rapportés que les feuilles et les tiges de *Ruta chalepensis* L. contiennent des polyphénols. Par ailleurs les tests phytochimiques effectuées par Hammiche et Azzouz (2013) sur *Ruta chalepensis* L. ont confirmé la présence des huiles essentielles (cétones aliphatiques), coumarines (rutarine, furanocoumarines : psoralène, bergaptène, etc., alcaloïdes (essentiellement : furoquinoléines et dérivés de l'acridone) et flavonoïdes (rutoside).

L'étude menée par Attou (2013) sur *Ruta chalepensis* L., récoltée à « Ain Temouchent » (Ouest Algérien), affirme également sa richesse en coumarines, flavonoïdes, alcaloïdes, tanins, stérols et triterpènes. De même, Babu Kasimala et al. (2014) ont démontré la présence des flavonoïdes, des alcaloïdes, des tannins, des sucres réducteurs et des coumarines, ce qui est en accord avec nos résultats.

De même, les travaux réalisés par Chaibeddra et al. (2016) sur *H. tuberculatum* ont démontré la présence des huiles essentielles, flavonoïdes, triterpènes, coumarines, alcaloïdes, tannins, caroténoïdes et saponines.

D'une façon générale, les familles chimiques détectées dans notre expérimentation viennent confirmer les travaux menés sur les espèces de provenances diverses (Arabie saoudite, Turquie, Jordanie, Algérie, Inde, Maroc et du Oman) (Al-Sayed et al., 2000 ; Gunaydin and Savci., 2005 ; Shehadeh et al., 2007 ; Haddouchi et al., 2013 ; Raaman et al., 2014 ; Al-Brashdi et al., 2016 ; Daoudi et al., 2016 ). En effet, la présence de ces métabolites secondaires peut expliquer diverses activités biologiques: protectrice contre les agressions biotiques et abiotiques, antifongique , antioxydante, phytotoxique, abortive, anti-allergiques, anti-tumorales, anticancéreuses, neuroprotective, anti-spasmodiques, cytotoxique, antibactérienne, anti-inflammatoire, antivirale, insecticides (Zeichen et al., 2000; Iauk et al., 2004; Gonzalez-Trujano et al., 2006; Raghav et al., 2006., Conti et al., 2013 ; Nur Azfa Shuib et al., 2013 ; Chaibeddra et al., 2016 ; Daoudi et al., 2016 ).

### II-3- Etude quantitative des composés phénoliques

L'étude quantitative des extraits méthanoliques au moyen des dosages spectrophotométriques, avait pour objectif la détermination de la teneur des polyphénols totaux, des flavonoïdes et des furocoumarines. Le choix de ces substances réside dans le fait que la majorité des propriétés antioxydantes et antimicrobiennes leurs sont attribués.

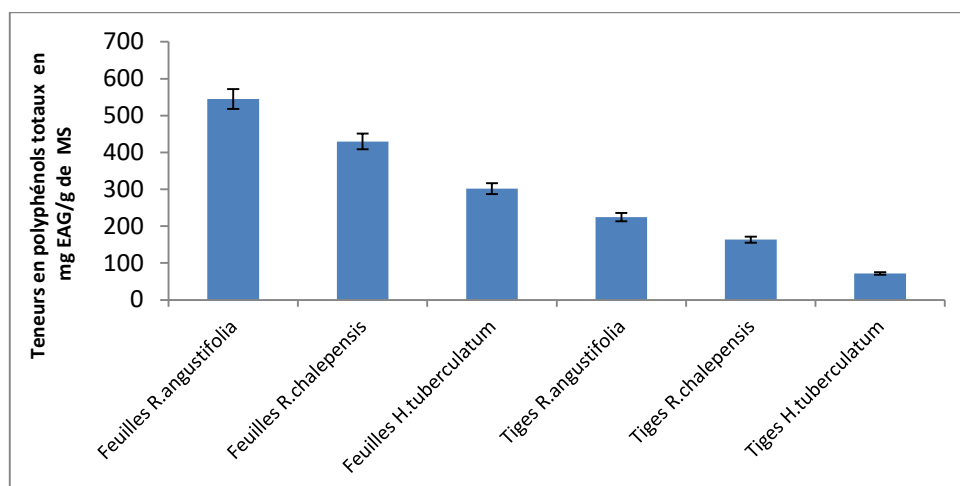
#### II-3-1- Dosage des polyphénols

Les polyphénols produits par les végétaux en tant que métabolites secondaires constituent une large gamme de molécules chimiques, dont leurs natures et teneurs sont extrêmement variables d'une espèce à l'autre. Plusieurs méthodes analytiques peuvent être utilisées pour la quantification des polyphénols totaux. L'analyse par le réactif de Folin-Ciocalteu est la plus utilisée, elle est considérée comme la meilleure pour le dosage des polyphénols totaux des extraits de plantes (Djeridane et *al.*, 2010), car elle est simple, standardisée, reproductible et les interférences avec la matrice de l'échantillon qui est souvent colorée sont minimisés à la grande longueur d'onde d'absorption (760 nm) utilisée (Huang et *al.*, 2005, Portes, 2008).

Le dosage des polyphénols totaux a été effectué selon la méthode de Folin-Ciocalteu (méthode de microplaque). La teneur en composés phénoliques dans les différentes espèces est déterminée à partir de l'équation de la courbe d'étalonnage de la régression de l'acide Gallique ( $y = 22,834 x + 0,3615$ ;  $R^2 = 0,952$ ) (Annexe 4, Fig.1).

Les valeurs obtenus montrent que les teneurs en polyphénols totaux varient considérablement entre les différentes espèces ( $F_2 = 946,734$ ;  $P < 0,05$ ) et les organes ( $F_2 = 4536,921$ ;  $P < 0,05$ ) des trois plantes étudiées (Annexe 2, Tab.1). Concernant les organes, les feuilles accusent les teneurs les plus importantes (Fig. 29). La concentration des polyphénols s'est échelonnée entre 2,72 à 1,50 dans la partie feuilles et 1,12 à 0,35 mg GAE/g de MS dans la partie tige. La répartition inégale des polyphénols a été rapporté par plusieurs auteurs (El Hacı et *al.*, 2012).

La grande distinction dans les quantités des polyphénols apparait également entre les trois espèces. *R. chalepensis* et *R. angustifolia* ont enregistré un maximum de polyphénols par rapport à l'espèce de *H. tuberculatum*.



**Figure 29:** Dosage des polyphénols par mg/g de matière sèche (tiges, feuilles) des trois espèces.

En effet, Bettaieb et *al.* (2012) ont montré que la teneur des phénols totaux dans la partie aérienne de *Ruta chalepensis* obtenu à partir d'un extrait méthanolique a été de l'ordre de 13,7 mg GAE/g de matière sèche, alors que Ghazghazia et *al.* (2013) ont rapporté que les teneurs en polyphénols dans les feuilles et les tiges de *R. chalepensis* sont 12,82 et 10,6 mg GAE/g de matière sèche, respectivement. Tandis qu'El Abed et *al.* (2014) ont remarqué que la partie aérienne d'*Haplophillum tuberculatum* contient une teneur en polyphénols estimée à 30 mg GAE/g. Dans une autre étude réalisée par Nur Azfa Shuib et *al.* (2015), l'espèce *Ruta angustifolia* a enregistré une teneur de 18,89 mg GAE/g.

D'après Bentabet et *al.* (2007), le contenu polyphénolique varie qualitativement et quantitativement d'une plante à une autre, cela peut être attribué à plusieurs facteurs tels que les facteurs climatiques et environnementaux, le patrimoine génétique, la période de la récolte et le stade de développement de la plante, les concentrations de l'extrait, la méthode d'extraction utilisée, ...etc.

### II-3-2- Dosage des flavonoïdes

Les flavonoïdes totaux des feuilles et des tiges des trois plantes ont été quantifiés par la méthode de trichlorure d'Aluminium ( $AlCl_3$ ) (Sombié et *al.*, 2011). Celle-ci est basée sur la formation de complexes entre les composés phénoliques et le trichlorure d'Aluminium. Les complexes produits sont de couleur jaune qui absorbe la lumière dans le visible à 415 nm (Alzhri, 2007).

Les résultats obtenus sont exprimés en mg équivalent quercétine par 100 gramme de matière sèche (mg EQ/g MS). L'évaluation quantitative des flavonoïdes montre une corrélation positive entre le taux des flavonoïdes et l'absorbance avec un coefficient de corrélation  $R^2 = 0,9134$  et une formule de régression :  $y = 0,0949 x$  (Annexe 4, Fig. 2).

L'analyse statistique décèle une différence significative en flavonoïdes entre organes (tiges et feuilles) ( $F_2=812,676$  ;  $P < 0,05$ ) et entre espèces ( $F_2= 1175,358$  ;  $P < 0,05$ ) (Annexe 2, Tab. 7).

Pour les trois espèces de Rutacées, les teneurs en flavonoïdes des six extraits varient entre  $0,006 \pm 0,06$  et  $0,04 \pm 0,03$  mg EQ/g dont les plus élevées ont été détectées dans l'extrait méthanolique des feuilles et des tiges de *R. chalepensis* et *R. angustifolia* (Fig. 30).

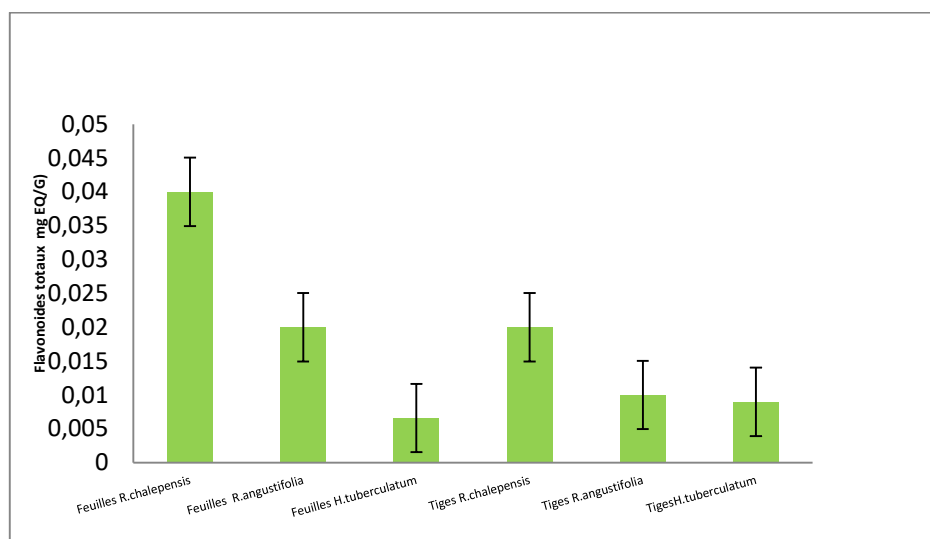
La teneur en flavonoïdes a été plus importante dans les feuilles, soient des teneurs de l'ordre de  $0,04 \pm 0,03$  et  $0,02 \pm 0,004$  mg EAG/g MS, dans les extraits méthanoliques respectifs des feuilles de *R. chalepensis* et *R. angustifolia* et ce contrairement aux extraits méthanolique des tiges, tandis que les plus faibles sont remarquées dans l'extrait méthanolique des feuilles de *H. tuberculatum* ( $0,009 \pm 0,06$ ) (mg EAG/g MS). Ces résultats confirment ceux rapportés par (Hudaib et al., 2008 ; Zaoual et al, 2013) qui ont démontré que la feuille est l'organe le plus riche qualitativement et quantitativement en métabolites secondaires.

Dans l'ensemble, pour les mêmes espèces, la teneur semblent très inférieures à celles rapportées par d'autres auteurs. C'est ainsi que dans une étude faite sur trois plantes médicinales dont *Ruta chalepensis*, Khlifi et al. (2013) ont rapporté des teneurs en flavonoïdes de la partie aérienne de l'extrait méthanolique de l'ordre de  $12,78 \pm 0,08$  mg EAG/g de MS.

Selon Fakhfakh et al. (2012), la teneur des flavonoïdes dans l'extrait aqueux avoisine  $87,12$  mg EAG/g MS. Celle-ci peut atteindre plus de  $149,09 \pm 4,93$  mg EAG/g d'extrait sec quand l'extraction est réalisée avec une solution éthanolique. Alors que Bettaieb et al. (2012) ont enregistré une teneur de  $6,50$  mg EQ/g d'extrait hydro-méthanolique (80 :20) (V : V). Ceci signifie que la teneur en flavonoïdes varie en fonction du solvant d'extraction utilisé.

La teneur trouvée dans la partie aérienne de l'extrait méthanolique est moins importante à celle enregistrée par Nur Azfa Shuib et al. (2015). De même, pour l'espèce *H. tuberculatum*, les valeurs notées dans la présente étude sont beaucoup plus inférieures à celles enregistrées par Abou-Zeid et al. (2014) qui est de l'ordre de  $15,59$  mg EAG/g de MS.

La variabilité des teneurs en flavonoïdes chez ces espèces végétales est du essentiellement à la méthode d'extraction, au solvant utilisé lors de l'extraction (Hayouni *et al.*, 2007), aux facteurs génotypiques (El-Waziry, 2007), aux conditions biotiques (espèce, organe et l'étape physiologique) et abiotiques (facteurs édaphiques) (Ksouri *et al.*, 2008), la nature du sol et le type du microclimat (Atmani *et al.*, 2009) et aussi aux étages bioclimatiques où poussent ces plantes.



**Figure 30:** Teneurs en flavonoïdes des extraits méthanoliques des tiges et feuilles des trois espèces.

### II-3-3- Identification et quantification des coumarines et furocoumarines

Les résultats obtenus, décrits dans le tableau 5, correspondent à un dosage de la teneur en coumarines et furocoumarines. Ces dernières ont été analysées, quantifiées et comparées.

L'analyse de la composition chimique par chromatographie liquide à haute pression (UPLC/ MS) de la partie aérienne (tiges, feuilles), pour chacune des plantes sèches a permis d'identifier plusieurs composés et en quantités variables. Il s'agit essentiellement de : psoralène, xanthotoxines, 6-7 Dihydroxy, bergaptène, phellopterine, isoimperatorine, epoxybergamottin, byakangelicine, Oxypeuce.

Les différentes molécules détectées sont des dérivés du 5-méthoxypsoralène sauf exception (xanthotoxine) et les isoimperatorine qui sont des dérivés méthoxylés du 8-méthoxypsoralène. Ceci a été affirmé par les résultats obtenus par Dugrand-Judek et *al.* (2015) ou l'analyse par UPLC/MS a pu repérer 5 coumarines et 21 furocoumarines dans 61 espèces de *Citrus*, ceci approuve la richesse des *Citrus* en coumarines et en furocoumarines.

Les deux espèces *R. angustifolia* et *R. chalepensis* présentent des concentrations nettement bien supérieures en coumarines et furocoumarines par rapport à celles de *H. tuberculatum*. Nos résultats sont en accord avec ceux d'Arif et *al.* (2005) qui ont constatés, d'après les analyses phytochimique réalisées sur *Haplophyllum tuberculatum*, que cette dernière ne contenant que très peu de psoralène.

Les résultats obtenus confirment la capacité des organes végétatifs à synthétiser des furocoumarines en quantités importantes et variables. Les teneurs en furocoumarines obtenus montrent bien une différence, elle semble donc dépendante de l'état de la plante (sèche ou fraîche), de l'organe végétal (tiges ou feuilles) et de l'espèce.

La quantité des coumarines et furocoumarines repérées dans les trois espèces étudiées est impressionnante, notamment celle de l'Est et l'Ouest. C'est la première fois que l'on détecte autant de molécules dans ce type de plante.

**Tableau 5 :** Quantités des coumarines et furocoumarines dans les espèces étudiées (nmol / g matières sèche).

Quantité des coumarines et furo coumarines (nmol / g matières sèche)	<i>R.angustifolia</i>		<i>R.chalepensis</i>		<i>H.tuberculatum</i>	
	Tiges	Feuilles	Tiges	Feuilles	Tiges	Feuilles
umb	127,37 ± 121,958	60,24 ± 26,65	432,75 ± 159,21	211,21 ± 78,53	ND	NQ
pso	445,28 ± 196,242	112,65 ± 36,461	4034,91 ± 5281,86	609,8 ± 184,74	0,1597 ± 0,07	0,69 ± 0,30
xanthotoxol	ND	ND	44,7 ± 40,32	37,46 ± 8,70	ND	ND
bergaptol	ND	ND	36,72 ± 22,96	42,36 ± 32,72	ND	ND
citroptene	14,53 ± 9,444	15,59 ± 4,632	78,98 ± 58,78	59,33 ± 19,05	ND	ND
xanthotoxine	851,2 ± 1151,72	491,06 ± 308,06	3050,21 ± 3342,15	1156,13 ± 551,40	ND	ND
bergaptene	963,82 ± 386,533	1332,67 ± 326,67	4978,46 ± 4687,15	4262,17 ± 55,10	NQ	NQ
osthol	9,74 ± 4,064	18,77 ± 4,33	90,65 ± 105,49	62,7 ± 12,96	0,06 ± 0,03	0,08 ± 0,02
isopimpinellin	66,09 ± 64,37	37,92 ± 13,718	265,16 ± 173,69	109,18 ± 35,27	ND	ND
imperatorine	ND	ND	382,52 ± 606,52	91,15 ± 53,23	NQ	NQ
isoimperatorine	191,64 ± 75,588	471,21 ± 143,5	1640,95 ± 2579,17	2208,93 ± 746,42	ND	ND
heraclenine	NQ	NQ	314,95 ± 280,07	44,76 ± 64,19	0,7428 ± 0,22	0,70 ± 0,40
oxypeuce	253,53 ± 75,8	452,84 ± 152,315	1889,38 ± 2227,54	1863,89 ± 573,14	ND	ND
auraptene	253,53 ± 75,807	5,38 ± 2,564	16,6 ± 15,78	14,19 ± 3,26	0,973 ± 0,73	1,38 ± 0,75
phellopterine	ND	ND	2291,86 ± 2830,70	ND	ND	ND
cnidiline	ND	ND	ND	ND	NQ	ND
heraclenol	178 ± 110,595	225,31 ± 73,907	637,53 ± 499,88	481,09 ± 142,11	2,99 ± 0,67	ND
oxypeuce hydrate	45 ± 17,90	110,28 ± 29,50	609,27 ± 852,64	520,18 ± 188,53	ND	NQ
epoxyauraptene	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Byakangelicol	ND	ND	31,48 ± 26,59	12,29 ± 3,94	ND	ND
5G7M	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Byakangelicine	NQ	ND	1046,21 ± 815,73	801,5 ± 175,79	ND	ND
Geranyloxyppo	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Bergamottine	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Epoxyberga	285,65 ± 104,92	563,31 ± 160,146	1954,1 ± 1944,62	1976,72 ± 500,08	ND	ND
Cnidicine	NQ	NQ	127,42 ± 168,02	69,22 ± 19,77	NQ	27,84 ± 16,19
6 - 7 DHB	NQ	NQ	876,05 ± 948,97	1071,97 ± 417,66	ND	ND

### II-3-3-1- Comparaison de la production des coumarines et furocoumarines

Si l'on compare les teneurs en furocoumarines d'une espèce à une autre, on constate que les plus fortes concentrations sont obtenues dans le cas de *R. angustifolia* et *R. chalepensis*. D'après les résultats obtenus, les tiges et les feuilles de la plante sèche présentent des concentrations importantes respectivement pour le bergaptène et le psoralène (4978,46 et 4034,91 nmol / g de matières sèche). Cependant, les taux les plus élevés en coumarines et furocoumarines sont ceux obtenus par *R. angustifolia* avec 24830 nmol / g pour les tiges et 15706 nmol / g pour les feuilles (Tab. 6).

**Tableau 6:** Quantification des coumarines et furocoumarines par UPLC/MS des tiges et des feuilles des trois espèces étudiées (en nmol / g de matières sèche).

Regions Organes	<i>R. chalepensis</i> (Region Ouest)		<i>R. angustifolia</i> (Region Est)		<i>H. tuberculatum</i> (Region Sud)	
	Tiges	Feuilles	Tiges	Feuilles	Tiges	Feuilles
<b>Quantités des coumarines et furocoumarines (nmol/g de MS)</b>	3685,38 ±184,22	3897,23 ±98,64	24830,86± 1257,62	15706,23± 192,26	4,9255± 3,344	30,69± 3,53

Ces résultats corroborent ceux de Stek et Bailey (1969), démontrent que plusieurs furocoumarines pouvaient se former dans les feuilles d'*Angelica archangelica*.

Les travaux effectués par Garabeth et *al.* (2007) ont montré que les sommités fleuries de *Prangos asperula* extraites avec du méthanol présentent des teneurs importantes en psoralène avec une quantité estimée à  $121,301 \pm 0,028 \mu\text{g} / \text{g}$ . Ceci confirme que : l'organe de la plante, la méthode d'extraction utilisée et la variabilité génétique sont des facteurs qui peuvent varier les teneurs des coumarines et furocoumarines. Bourgaud (1990) a prouvé également dans ses travaux que la concentration en furocoumarines est étroitement dépendante d'un ensemble de paramètres intrinsèques (espèce, organe végétal) ou de facteurs extrinsèques (température, condition de la nutrition azoté). D'autres facteurs pouvant avoir une influence également sur le taux de furocoumarines comme par exemple la méthode d'extraction, le solvant utilisé, etc...).

#### **II-4- Cinétique d'extraction des huiles essentielles**

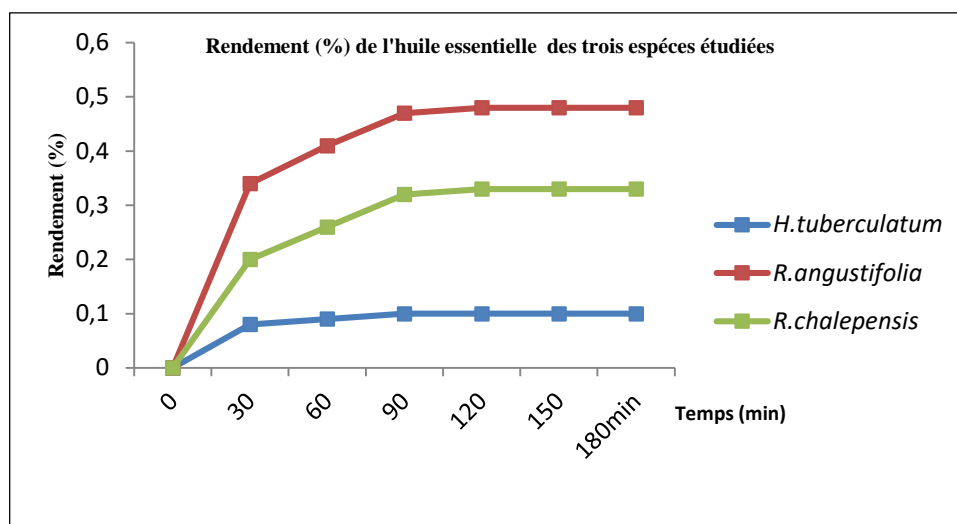
La durée d'extraction est théoriquement le temps nécessaire à la récupération de la totalité de l'huile contenue dans la matière végétale. Or en pratique, il est difficile de récupérer toute l'huile. Ce temps correspond alors au moment pour lequel nous n'observons plus d'huile dans le distillat. Il détermine la fin du processus.

Dans un premier temps et dans le but d'optimiser la durée d'extraction, des essais sur la cinétique du rendement en huile essentielle par hydrodistillation par rapport à la matière sèche ont été effectués.

La figure 31 illustrant l'évolution du taux de rendement de l'huile essentielle en fonction du temps montrent clairement que les courbes des trois espèces étudiées ont la même allure. Plus nous augmentons le temps d'extraction plus le rendement augmente jusqu'à obtention d'un palier. Cette augmentation progressive est observée dès la première minute. Au delà de 120 minutes, le rendement stagne.

Les trois courbes de la cinétique d'extraction de l'huile essentielle se décomposent en deux parties :

- Dans la première partie, pendant la première heure d'extraction de l'huile essentielle située à la surface de la matière végétale appelé « l'huile superficielle » il y a ce qu'on appelle (phénomène de diffusion des huiles essentielles à partir des poches sécrétrices de la matière végétale c'est-à-dire un dépôt exogène de l'huile essentielle, ou la vitesse d'extraction est élevée puis elle est constante jusqu'à l'épuisement de l'huile superficielle.
- La seconde partie pendant la deuxième heure où la vitesse d'extraction est relativement lente et l'extraction des huiles essentielles serait due au phénomène d'osmose des huiles essentielles à l'intérieur des cellules de la matière végétale (les tissus endogènes de la plante). Après l'écoulement des deux premières heures d'entraînement à la vapeur d'eau, le rendement atteint un palier où l'augmentation est négligeable ; c'est l'épuisement de l'huile essentielle de la matière végétale (Bendriss, 2003). Une augmentation de la durée d'extraction peut engendrer des pertes de composés qui sont sensibles à la température (Alillou, 2012).



**Figure 31** : Cinétique d'extraction par hydrodistillation de l'huile essentielle des trois espèces étudiées.

La cinétique d'extraction, à l'aide du Clevenger, durant 240 min d'extraction, a montré que le temps optimum de l'hydrodistillation est estimé à 120 minutes avec un rendement de 0,48% pour *R. angustifolia*, 0,33% pour *R. chalepensis* et 0,10% pour *H. tuberculatum*. Au-delà de ce maximum le rendement reste constant.

D'après ces résultats, une relation étroite entre la région de la récolte et le rendement a été notée. En effet, les rendements des huiles essentielles sont meilleurs dans les régions des hauts plateaux (Bordj Bou Arreridj) situées à 906 m et dans la côte Méditerranéenne (Mostaganem) situées à 102 m par rapport à ceux d'Adrar (Sud Algérien) situées à 257 m d'altitude. Les deux facteurs, zone géographique et altitude jouent un rôle important dans la variation des rendements entre les trois espèces. Ceci a été confirmé par l'étude faite par Merghache et al. (2009) sur la partie aérienne de *Ruta chalepensis* récoltée dans différentes régions de la wilaya de Tlemcen situées dans le Nord-Ouest Algérien. Les résultats obtenus confirment que la composition chimique, les propriétés physico-chimiques, ainsi que le rendement des huiles essentielles varient en fonction du lieu de récolte.

#### II-4-1- Comparaison du rendement d'extraction des huiles essentielles avec la littérature

Les résultats obtenus sont dans l'ensemble conformes aux données de la littérature. Les rendements en huile essentielle de *Ruta chalepensis* cités dans la littérature sont compris entre 0,1% et 1,13% (Merdji et al., 2010 ; Daoudi et al., 2016).

Les données confirment également celles de Tounsi et al. (2011) et Tampe et al. (2016) qui ont rapporté que l'huile essentielle de *Ruta chalepensis* obtenu par

hydrodistillation de provenance de Chili et de la Tunisie sont de l'ordre de 0,3 et 0,39%, respectivement.

L'étude menée par Hadouchi *et al.* (2013) sur la composition chimique de quatre espèces de *Ruta* dont *Ruta angustifolia* prélevée de Tlemcen (Ouest Algérien) et *Haplophyllum tuberculatum* de Béchar (Sud Algérien) a quantifié les rendements à raison de  $1,49 \pm 0,36$  et  $0,11 \pm 0,01\%$ , respectivement.

Les rendements des l'huiles essentielles estimés dans nos échantillons de *Ruta chalepensis* sont moins importants que ceux rapportés par Merghache *et al.* (2009) (0,82%) à Tlemcen (Ouest Algérien), Bouzidi *et al.* (2012) (1,13%) à Sidi Bel Abbes (Nord-Ouest Algérien), Mejri *et al.* (2010) (5,51%) en Tunisie et également (0,85%) Chedia *et al.* (2013) dans le nord de la Tunisie, Bendriss (2003) (0,80%) provenant de la région de Boukadir (wilaya de Chlef) dans l'Ouest Algérien, Daoudi *et al.* (2016) (1%) (Région de Zerhoun) au Maroc et semblable aux résultats de Attou (2011) (0,48 %) à Beni Rhanane (wilaya d'Ain Temouchent) (Ouest Algérien).

Cette différence peut être liée à de nombreux facteurs, notamment : la situation géographique le stade de croissance, les conditions pédoclimatiques et édaphiques de la région, le lieu de séchage, la température et la durée de séchage, la technique et le temps d'extraction...ect. (Mejri *et al.*, 2010; Tounsi *et al.*, 2011; Regnault-Roger *et al.*, 2012 ; Haddouchi *et al.*, 2013).

## II-4-2- Facteurs influençant la composition chimique des huiles essentielles

### II-4-2-1- Influence du volume d'eau

On remarque d'après les figures 32, 33 et 34, que le meilleur rendement est obtenu en utilisant une quantité plus importante d'eau. Le volume optimal donnant le meilleur rendement pour les trois espèces est égal à 1000 ml.

Dans une étude réalisée par Attou (2011) portant sur l'influence du volume du solvant rapporte que le volume optimal donnant le meilleur rendement pour la Rue d'Alep est égal à 130 ml. D'après Bendriss (2003), le phénomène de solubilité intervient comme un facteur essentiel, du fait que les principes actifs seront beaucoup plus solubles dans des volumes importants, ce qui retardera la saturation. Toutefois, il est utile de noter qu'une augmentation excessive du volume peut prolonger la durée de traitement.

Plusieurs auteurs ont confirmé que le volume d'eau utilisé et la durée d'extraction sont deux facteurs qui affectent la composition chimique des huiles essentielles. La proportion d'eau utilisée et le temps d'extraction influencent le contenu des composés oxygénés dans l'huile essentielle, car l'eau affecte l'oxydation ou l'hydrolyse de ces composés (Stashenko et *al.*, 2000 ; Mejri et *al.*, 2012).

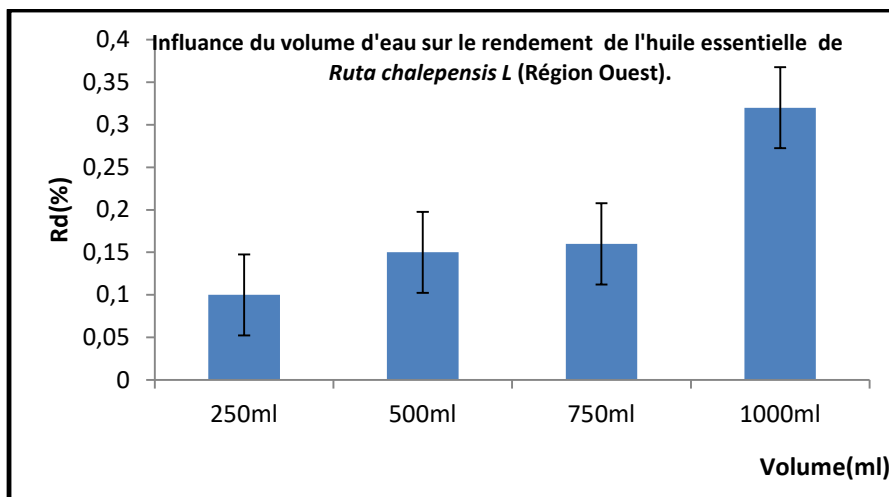


Figure 32: Influence du volume d'eau sur le rendement de l'huile essentielle de *Ruta chalepensis* (région Ouest).

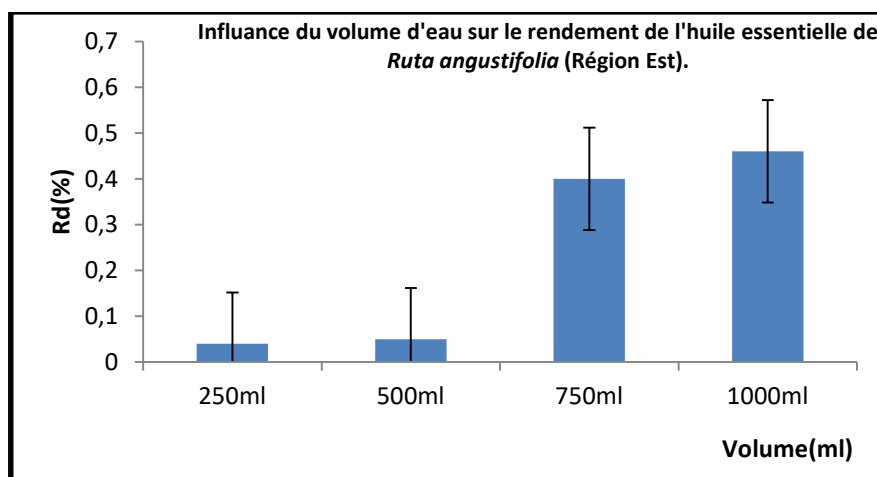


Figure 33 : Influence du volume d'eau sur le rendement de l'huile essentielle de *Ruta angustifolia* (région Est).

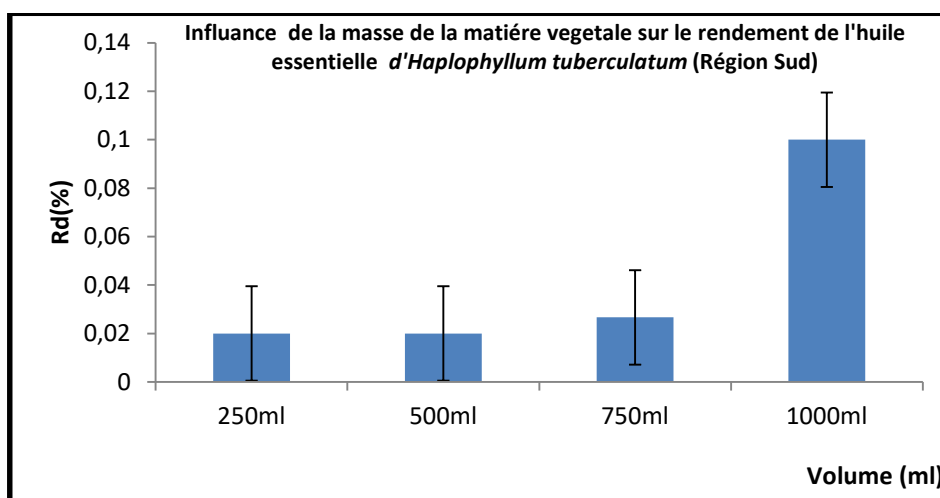


Figure 34 : Influence du volume d'eau sur le rendement de l'huile essentielle d'*Haplophyllum tuberculatum* (région Sud).

**II-4-2-2- Influence de la masse de la matière végétale**

Selon les figures 35, 36 et 37, on constate que le meilleur rendement est obtenu pour une masse égale à 100 g. Plus nous augmentons la masse de la matière végétale plus le rendement en huile augmente, puis il atteint un maximum qui correspond à la masse optimale.

Ces masses optimales donnent des rendements maximaux puisque le lit de la masse végétale est expansé et l'écoulement de l'eau est facilité, ce qui permet un meilleur contact entre la plante et l'eau, par conséquent la quantité de l'huile est plus importante. Mais lorsque nous augmentons la masse végétale le contact entre les deux phases est alors amoindri ce qui explique la diminution des rendements en huile essentielle (Bendriss, 2003).

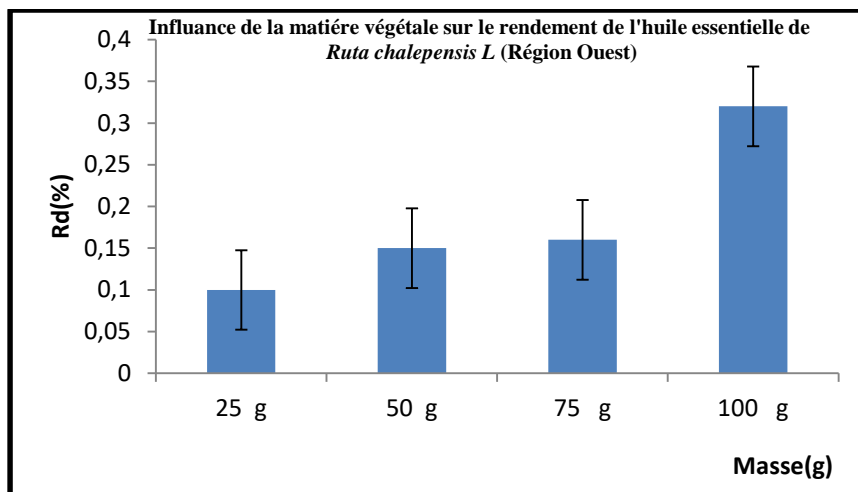


Figure 35: Influence de la masse de la matière végétale sur le rendement de l'huile essentielle de *Ruta chalepensis* (région Ouest).

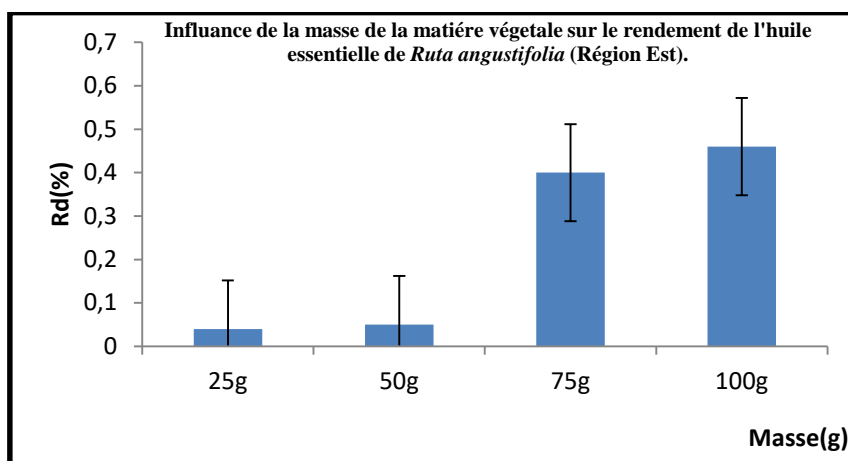


Figure 36 : Influence de la masse de la matière végétale sur le rendement de l'huile essentielle de *Ruta angustifolia* (région Est).

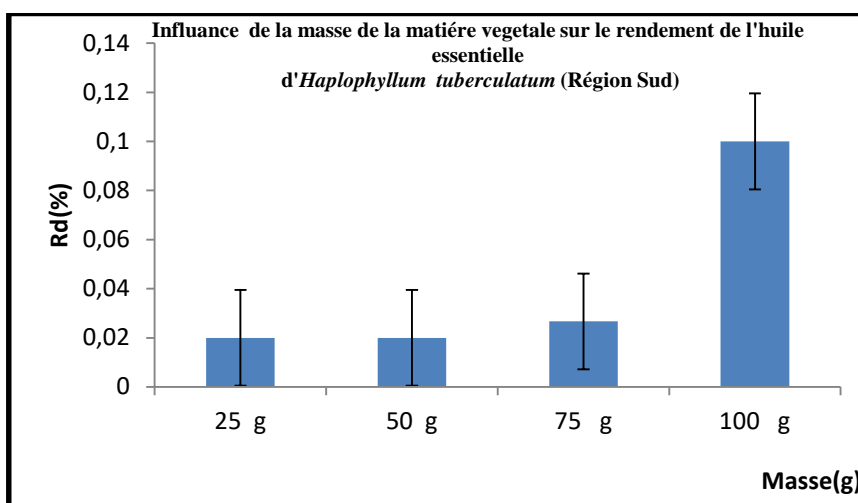
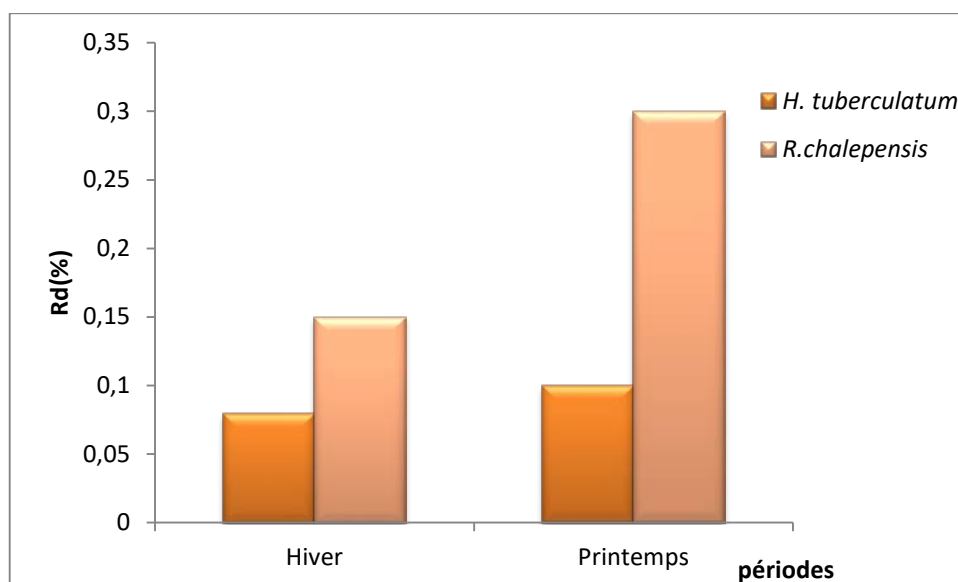


Figure 37 : Influence de la masse de la matière végétale sur le rendement de l'huile essentielle d'*Haplophyllum tuberculatum* (région Sud).

### II-4-2-3- Evolution du rendement en fonction de la période de récolte

D'après la figure 38, il apparaît clairement que le rendement des huiles essentielles le plus important est obtenu en printemps avec un taux de 0,33% pour *Ruta chalepensis* et 0,10% pour *Haplophyllum tuberculatum*. Ceci est dû au fait que la plante est plus jeune et donc plus productrice. Au contraire, en automne, les fleurs tombent, les feuilles jaunissent, la plante vieillit et la production de l'huile diminue (Mejri *et al.*, 2010)

Sur le plan quantitatif, le meilleur rendement est obtenu durant la période de floraison. La récolte des plantes en vue de l'extraction de leurs huiles essentielles doit se faire pendant une période bien précise de sa végétation, selon la qualité recherchée (Merghache *et al.*, 2009).



**Figure 38:** Rendement de l'huile essentielle de *R. chalepensis* et *H. tuberculatum* en fonction de la période de récolte.

### II-4-3- Analyses des huiles essentielles

#### II-4-3-1- Caractéristiques organoleptiques et physico-chimiques des huiles essentielles

Les caractéristiques organoleptiques et physico-chimiques de *H. tuberculatum* sont différentes à celles de *R. chalepensis* et *R. angustifolia*.

Les huiles extraites apparaissent sous forme liquide, avec un aspect huileux de couleur jaune verdâtre pour *R. chalepensis* et *R. angustifolia* et jaune foncée pour *H. tuberculatum* (Tab. 7). Concernant la saveur, elle semble être amère et les trois espèces dégagent une désagréable odeur.

L'indice de réfraction qui est définie par le rapport entre le sinus des angles d'incidence et de réfraction d'un rayon lumineux de longueur d'onde déterminée, passant de l'air dans l'huile essentielle maintenue à une température constante a enregistré, d'après le tableau 11, une valeur de l'ordre de 1,48 pour *H. tuberculatum* comparativement à celles de *R. chalepensis* et *R. angustifolia* qui sont de l'ordre de 1,43. D'après Kanko et al. (2004), un indice de réfraction varie essentiellement avec la teneur en monoterpènes et en dérivés oxygénés. Une forte teneur en monoterpènes donnera un indice élevé. Ces résultats sont dans l'ensemble conformes à la littérature, où les propriétés physicochimiques déterminée par Baser et al. (1996) est cité par Merghache et al. (2009) sont les mêmes que la nôtre.

**Tableau 7 :** Caractéristiques organoleptiques des huiles essentielles des trois taxons.

Régions	Aspect	Couleur	Odeur	Saveur	Indice de réfraction à 20°C
<i>Ruta chalepensis</i> L.	liquide	Jaune verdâtre	Forte	amère	1,43
<i>Ruta angustifolia</i> Pers.	liquide	Jaune verdâtre	Forte	amère	1,43
<i>Haplophyllum tuberculatum</i> (Forsk.) Juss.	liquide	Jaune foncé	Très forte	amère	1,48

### II-4-3-2- Analyses des huiles essentielles par GC/FID

Les huiles essentielles ont été analysées par chromatographie en phase gazeuse couplée à un détecteur à ionisation de flamme (CG-FID). Les résultats obtenus sont regroupés dans le Tableau 8, 9 et 10. L'analyse de la composition chimique montre une variation quantitative et qualitative du profil chimique des huiles étudiées. Vingt-Quatre, Vingt-Neuf et Trente-Sept constituants sont détectés respectivement pour les régions de Mostaganem, Bordj Bou Arreridj et Adrar.

Quatre constituants chimiques dominant l'huile essentielle de la région de Mostaganem, il s'agit de : 2-undécanone (35,38%), le 2-nonanone (20,111%), d'autres constituants avec des pourcentages moins importants : Béta-copaéne (6,211%), Ipsdiénol (2,062%). Quant à l'huile essentielle de la région de Bordj Bou Arreridj, elle renferme principalement le 2-undécanone (45,49 %), le 2-nonanone (22,29 %), D'autres composés sont également présents dans cette essence, mais à des teneurs relativement faibles, à savoir : le limonène (3,305 %), Geijéréne (3,118%), et le Béta-copaéne (2,009%). En revanche, l'huile essentielle de la région d'Adrar a une composition totalement différentes des autres espèces, elle est composée de deux composants majoritaires, il s'agit de : Pipéritone (13,35%), Germacrène-B (12,304%). D'autres composés ont été également identifiés à des pourcentages relativement faibles, tels que : Béta-Phellandréne (5,052%), Bétacaryophylléne (4,146%), Gamma-Eleméne (2,910%), Alpha-Phellandréne (2,763%). On note aussi que certains composés sont présents en forte teneur tels que : 2-nonanol et le 2-undécanone pour *R. chalepensis* (région Ouest) et *Ruta angustifolia* (région Est), donc on peut classer les deux plantes comme chemotypes à 2- Undécanone et le 2-nonanol, respectivement. Pour l'huile essentielle de *H. tuberculatum* (région Sud), on détecte la prédominance du Germacrène-B et du Pipéritone qui sont des chémotypes de cette dernière.

Enfin, il est important de noter la grande richesse de l'huile essentielle des trois plantes en Cétones, d'autres constituants intermédiaires qui appartiennent aux classes des sesquiterpènes, alcool sesquiterpéniques et des monoterpènes.

Des travaux antérieurs à la présente étude ont porté sur la variation de la composition chimique des huiles essentielles de *Ruta chalepensis* et ont révélé l'existence de deux composés majoritaires : 2-undécanone et le 2-nonanone mais avec des taux différents.

D'après l'étude de Merghache et al. (2009), l'analyse par CG et CG/SM des constituants volatils des différentes parties de *Ruta chalepensis* de la région de Sebdo

(Tlemcen, Algérie) montre que les fleurs possèdent deux constituants majoritaires : le 2-undécane (34,71 %) et le 2-nonane (22,89 %).

Nos résultats confirment ceux présentés par Dob et al. (2008); Da Silva et al. (2014) et Tampe et al. (2016), qui rapportent la dominance du 2-undécane et le 2-nonane mais avec des proportions différentes.

Dans une étude comparative sur la composition chimique des huiles essentielles de trois espèces de *Ruta* : *Ruta chalepensis*, *Ruta montana* et *Ruta graveolens* croissant dans différents pays du monde, Ferhat et al. (2014) ont dévoilé la richesse de *Ruta chalepensis* en 2-undécane, 2-décane, 2-nonane et le 2-nonanylacétate.

D'autres études ont indiqué que l'huile essentielle extraite de *H. tuberculatum* originaire d'Égypte est caractérisée par l'abondance des monoterpènes représentés par Trans-p-Menth-2-ène-1-ol (11,1 %) (El-Naggaret al., 2014). Cependant, les travaux d'Al-Rehaily et al. (2014) sur la même plante d'origine d'Arabie Saoudite ont signalé la présence de deux constituants majeurs : trans-p-menth-2-en-1-ol (19,2%) et cis-p-menth-2-en-1-ol (13,2%).

Les huiles essentielles de *Ruta chalepensis* de provenance d'Argentine, la Turquie, l'Iran, et l'Inde possèdent le 2-undécane comme constituant majoritaire (38,1%, 66,5%, 52,5% et 41,3 – 67,8%, respectivement) (Inigo et al., 1981 ; Baser et al., 1996 ; Rustaiyan et al., 2002 ; Bagchi et al., 2003 ). Les huiles essentielles de *Ruta chalepensis* de l'Italie possèdent un autre constituant majoritaire : le 2-nonane (49,9%) et le 2-undécane (30%) (Baser et al., 1996 ; Verzera et al., 2000 ; Bagchi et al., 2003). En revanche, l'huile essentielle de cette plante d'origine Tunisienne contient deux constituants majeurs : le 2-undécane (44%) et 2-nonanol (40%) (Aouadhi et al., 2013), tandis que l'huile essentielle de *Ruta chalepensis* de Grèce possède plusieurs constituants majoritaires : le 2-méthyl octyl acétate (44,0%) et le  $\beta$ - phellandréne (10,7%).

Dans la partie aérienne de *Ruta angustifolia* récoltées dans la région de GRAREM (Est Algérien), Chibani et al. (2013) ont identifiés seize composés, dont les composés majeurs étaient : 2- acétoxytridécanone (58,44%), 2-acétoxytridécanone (19,07%).

Les résultats acquis s'accordent avec ceux de Hadouchi et al. (2013), qui dévoilent que la composition chimique des huiles essentielles de *R. chalepensis*, *R. angustifolia* et *R. graveolens* sont similaires pour les trois espèces, avec une prédominance du 2- undécane et 2 – décane, mais avec des proportions différentes. En revanche, *H. tuberculatum* a permis d'avoir une composition totalement différente des deux autres espèces. L'huile essentielle de cette dernière est composée de piperitone ( 13,62 % ) , trans -p- Menth-2-én- 1 -

ol ( 13,14 %) , le cis -p- Menth - 2- én- 1 -ol ( 11,22 %) , et le cis -p- Menth - 1 -en- 3-ol ( 12,31% ) ,B – Phellandrène (10,9%).

La différence constatée pourrait être expliquée par l'impact de nombreux facteurs biotiques tels que: les régions de provenance des échantillons, les facteurs géographiques l'altitude et la nature du sol, les conditions environnementales (température, luminosité, pluviométrie), le stade végétative de la plante. D'autres facteurs abiotiques, tels que les conditions culturales (dates de semis et de récolte), les traitements phytosanitaires, l'emploi d'engrais, ainsi que les techniques de récolte et d'extraction, influencent aussi la composition chimique des plantes aromatiques et ainsi des huiles essentielles qui en dérivent (Scora, 1973 ; Ntalli et *al.*, 2011 ; Fahlen et *al.*, 1997 ; Figueiredo et *al.*, 2008 ; Chauhan et *al.*, 2009 ; Merghache., 2009 ; Ghazghazi et *al.*, 2016).

**Tableau 8** : Composition chimique de l'huile essentielle de *Haplophyllum tuberculatum* analysé par chromatographie par GC/FID.

Tr	Composés	% Fid
5.25	Alpha-Thujène	0.179
5.39	Alpha-Pinène	1.299
5.72	Camphène	0.508
6.19	Sabinène	0.45
6.27	Béta-Pinène	0.673
6.53	Myrcène	1.728
6.83	AlphaPhellandrène	2.763
6.87	Delta-3-Carène	1.860
7.03	Alpha-Terpinène	1.204
7.17	1,4-Cinéol	0.204
7.17	Para-Cymène	0.271
7.27	Limonène	1.376
7.29	Béta-Phellandrène	5.052
7.33	Eucalyptol	0.422
7.39	(Z)-Béta-Ocimène	0.135
7.58	(E)-Béta-Ocimène	0.143
7.77	Gamma-Terpinène	0.081
8.05	1-Octanol	0.295
8.24	Terpinolène	0.185
8.36	2-nonanone	0.749
8.62	Cis-Thujone	0.199
8.93	Inconnu idem Beta-phellendrène	10.606
8 9.22	Inconnu idem Beta-phellendrène	6.846
9.80	Terpinène-4-ol	0.241
10.05	Inconnu idem Beta-phellendrène	2.723
10.24	Inconnu idem Beta-phellendrène	5.444
10.91	Pipéritone	13.353
11.31	Acétate de Bornyle	1.235
11.41	2-Undécanone	0.304
12.00	Inconnu idem Gamma-Terpinène	6.167
12.65	Béta-Bourbonène	0.320
12.72	Béta-Elémène	0.182
13.12	Béta-Caryophyllène	4.146
13.22	Gamma-Elémène	2.910
13.57	Alpha-Humulène	0.345
13.88	Germacrène-D	1.823
14.82	Germacrène-B	12.304
	Total	88.733

**Tableau 9 :** Composition chimique de l'huile essentielle de *Ruta Chalepensis* analysé par chromatographique par GC/FID.

Tr	Composés	% Fid
5.41	Alpha-Pinène	0.080
6.21	Sabinène	0.119
6.30	Béta-Pinène	0.052
6.55	Myrcène	0.058
6.60	3-Octanol	0.066
6.77	Menthe-1(7),8-Diène-para	0.012
6.85	AlphaPhellandrène	0.041
7.28	Limonène	1.490
7.80	Gamma-Terpinène	0.015
8.41	2-nonanone	20.111
8.58	2-nonanol	1.755
8.62	Nonanal	0.145
9.19	Geijjère	1.790
9.98	2-Décanone	1.066
10.05	Alpha-Terpinéol	0.109
10.60	Inconnu	11.465
11.46	2-Undécanone	35.383
11.94	Tetradécanol	0.144
12.77	Méthyl-Décyl cétone	0.492
13.21	Béta-Copaène	6.211
13.30	2-Méthyl coumarine	0.374
14.66	2-Tridécanone	0.360
17.27	Ipsdiénol	2.062
20.90	Dehydroabiétate de méthyle	1.180
	Total	84.580

**Tableau 10:** Composition chimique de l'huile essentielle de *Ruta angustifolia* analysé par chromatographique par GC/FID.

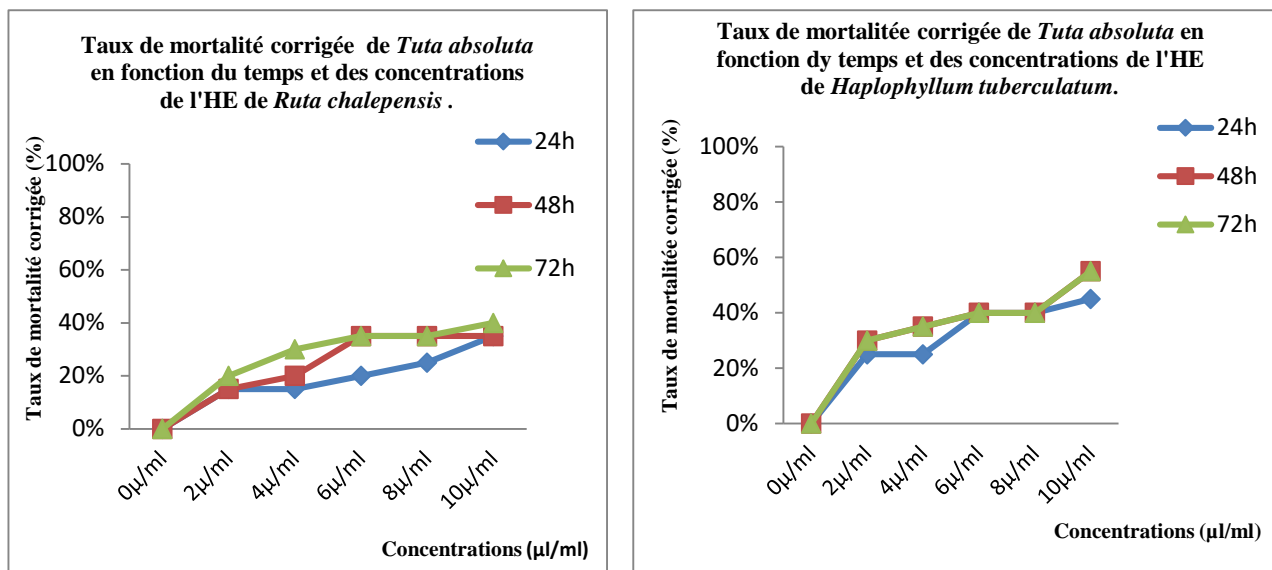
Tr	Composés	% Fid
5.28	Alpha-Thujène	0.021
5.42	Alpha-Pinène	0.241
6.21	Sabinène	0.299
6.30	Béta-Pinène	0.163
6.55	Myrcène	0.177
6.60	3-Octanol	0.054
6.84	AlphaPhellandrène	0.024
7.28	Limonène	3.305
7.35	Eucalyptol	0.031
7.60	(E)-Béta-Ocimène	0.029
7.79	Gamma-Terpinène	0.064
8.25	Terpinolène	0.023
8.40	2-nonanone	22.296
8.57	2-nonanol	0.873
8.61	Nonanal	0.203
5.28	Alpha-Thujène	0.021
5.42	Alpha-Pinène	0.241
6.21	Sabinène	0.299
6.30	Béta-Pinène	0.163
6.55	Myrcène	0.177
6.60	3-Octanol	0.054
6.84	AlphaPhellandrène	0.024
7.28	Limonène	3.305
7.35	Eucalyptol	0.031
7.60	(E)-Béta-Ocimène	0.029
7.79	Gamma-Terpinène	0.064
8.25	Terpinolène	0.023
8.40	2-nonanone	22.296
8.57	2-nonanol	0.873
8.61	Nonanal	0.203
9.18	Geijerène	3.118
9.97	2-Décanone	1.384
10.03	Alpha-Terpinéol	0.120
10.58	Inconnu	8.928
11.45	2-Undécanone	45.490
11.92	Tétradécanol	0.111
12.75	Méthyl-Décyl cétone	0.559
13.10	Béta-Caryophyllène	0.022
13.19	Béta-Copaène	2.009
13.28	2-Méthyl coumarine	0.106
14.65	2-Tridécanone	0.387
17.26	Ipsdiénol	0.403
17.54	Inconnu MW 232	1.641
20.89	Dehydroabiétate de méthyle	0.618
	Total	92.699

## II-5- Activité larvicide

Les bioessais, au laboratoire, ont été effectués selon la méthode de contact direct entre produit et insecte. Les larves des différents stades de *Tuta absoluta* ont été sélectionnées au hasard.

La présentation graphique, si dessous, présente le taux de mortalité des larves de *Tuta absoluta* traitées par les huiles essentielles de *Ruta chalepensis* et *Haplophyllum tuberculatum* pendant trois jours.

En se basant sur les résultats obtenus, *H. tuberculatum* possède une activité larvicide intéressante par rapport à *R. chalepensis*. Il a été remarqué également que la mortalité perçue, en employant l'huile essentielle d'*H. tuberculatum* à faible dose est supérieure à celle observée en utilisant l'huile essentielle de *R. chalepensis*. L'augmentation de la dose à raison de 10 µl/ml des deux plantes, provoquent une augmentation progressive de la mortalité des larves. Après 72 heures d'exposition, les taux de 40 et 55% ont été signalés pour *R. chalepensis* et *H. tuberculatum*, respectivement (Fig. 39).



**Figure 39:** Taux de mortalité corrigée de *Tuta absoluta* en fonction du temps et des Concentrations de l'HE d' *Haplophyllum tuberculatum* et de *Ruta chalepensis*.

L'analyse de la variance menée sur le taux de mortalité des larves de *Tuta absoluta* révèlent une différence significative pour les facteurs espèce ( $P=0,00617$ ), concentration, ( $P=0$ ) et temps ( $P=0,00014$ ).

### II-5-1- Détermination de la DL<sub>50</sub> et la DL<sub>100</sub>

L'analyse des probits (Finney, 1971) réalisée sur les mortalités corrigées affiche une dose létale DL<sub>50</sub> de l'ordre de 3,765 µl/ml avec l'huile essentielle de *H. tuberculatum* et de 4,7 µl/ml avec celle de *R. chalepensis*. Alors que la DL<sub>100</sub> est de 7,53 µl/ml pour *H. tuberculatum* et 9,4 µl/ml pour celle de *R. chalepensis* (Tableau, 11).

**Tableau 11:** DL<sub>50</sub> et la DL<sub>100</sub> des huiles essentielles de *Haplophyllum tuberculatum* et *Ruta.chalepensis*, sur les larves de *Tuta absoluta*.

Doses létales	<i>Haplophyllum tuberculatum</i>	<i>Ruta chalepensis</i>
DL <sub>50</sub> %	3,765 µl/ml	4,7 µl/ml
DL <sub>100</sub> %	7,53 µl/ml	9,4 µl/ml

L'effet insecticide de l'huile essentielle des deux plantes s'est révélé moyennement efficace sur les larves de *Tuta absoluta*. En effet, un taux de mortalité de 55% chez *H. tuberculatum* a été enregistré après 72h de traitement. Une corrélation positive est observée entre le taux de mortalité et la concentration utilisée.

Le caractère insecticide des huiles essentielles contre les larves de *T. absoluta* pourrait également être expliqué par la présence d'une forte teneur à l'un des constituants volatils majoritaire contenu dans l'huile essentielle de la plante. Elles peuvent également être attribuées à certains constituants minoritaires ou à un effet synergique de plusieurs constituants.

En effet, l'huile essentielle des espèces étudiées contiennent principalement des cétones, des sesquiterpènes et des monoterpènes avec des proportions différentes. L'effet insecticide de ces derniers a été déjà démontré par plusieurs études (Hadouchi et al., 2013 ; Ferhat et al., 2014).

Les travaux d'Al-Buratamani et al. (2005) ont signalé que les composés les plus abondants dans l'huile essentielle de *H. tuberculatum* sont des monoterpènes. L'un de ces composés, le limonène qui représente 12,6% de l'huile essentielle, inhibe la reproduction de *Meloidogyne javanica*, *Meloidogyne incognita* et *Heterodera schachtii* (Bauske et al., 1994). D'autres terpénoïdes comme le linalool et le *p*-menth-2-en-1-ol présents dans l'huile

essentielle d'*H. tuberculatum* ont été testés sur *Meloidogyne* sp. Les résultats obtenus ont montré que le menthol inhibe la formation de galles sur coton et le linalool agit sur les juvéniles de *M. javanica* (Bauske *et al.*, 1994) et de *M. incognita* (Leela *et al.*, 1992).

Dans une recherche réalisée par Majdoub *et al.* (2014), une bonne activité insecticide de l'huile essentielle de *Ruta chalepensis* a été montrée contre les adultes et les larves de *Tribolium castaneum*. Cette dernière est plus active contre les adultes que les larves. A une dose de 200 µl / l air, 14% et 60% de mortalité ont été enregistrés chez les larves et les adultes après 24 h d'exposition au traitement. Ce caractère insecticide pourrait être expliqué par l'abondance des cétones, comme composé majoritaire.

Ceci a été confirmé par les travaux de Nadio *et al.* (2013). Dans une autre étude réalisée sur une huile essentielle d'une plante médicinale riche en pépéritone, l'huile essentielle des feuilles de *Cymbopogon schoenanthus* a été testée sur les larves du deuxième stade de *Dysdercus voelkeri*. Le potentiel insecticide du pépéritone qui est le composé majoritaire de l'huile essentielle de la plante a révélé une activité insecticide très importante à la concentration de 1 µl/ml. L'huile essentielle et son composé majoritaire a causé une mortalité de tous les individus soumis au test après 24h d'exposition.

Dans une autre étude, Ali *et al.* (2013) ont étudié le potentiel insecticide de trois composants majoritaires de l'huile essentielle extraite de *Ruta chalepensis* sur les adultes d'*Aedes aegypti* et *Anopheles quadrimaculatus*. Il s'agit de 2-undécanone, 2-nonanone et le 2-nonyl acetate. Les résultats montrent que le composant 2-undécanone est plus actif à une concentration de 108,9µg/cm<sup>2</sup> contre *Aedes aegypti*. En revanche, le 2-nonanone a révélé une activité remarquable contre les larves d'*Anopheles quadrimaculatus*, 24h après le traitement.

De son côté, Conti *et al.* (2013), dans une étude comparative entre l'effet toxique de l'huile essentielle de *Ruta chalepensis* (sauvage et cultivées) vis-à-vis des larves de *Aedes albopictus* ont pu démontrer l'effet insecticide de l'huile essentielle de *R. chalepensis* sauvage avec une DL<sub>50</sub>= 35,66 ppm et un pourcentage de mortalité de 100% à la dose 150 ppm. La composition chimique de l'huile essentielle effectuée par CPG/SM ont montré la richesse de la plante en cétones, composés non terpéniques et les esters.

Les mécanismes d'action des huiles essentielles sont méconnus et relativement peu d'études ont été réalisées à ce sujet. Regnault-Roger et Phillogène (2008) ont révélé que certains alcools, phénols, cétones, aldéhydes et terpènes produits en permanence par des plantes aromatiques et qui peuvent être présents dans une même plante, vont agir sur le

comportement d'un grand nombre d'insectes phytophages par ces processus de répulsion ou d'anti-appétence. Leurs toxicités s'exercent de façon sélective sur le système nerveux (neurotoxique), le système reproduction (neurotoxique) ou le système digestif des bioagresseurs.

Les résultats obtenus par Bodereau-Dubois (2011) ont permis de justifier l'effet direct des composés volatils sur le système nerveux de l'insecte en phase adulte, par contre les insectes en phase larvaire montre une résistance remarquable contre l'effet toxique des cétones.

Selon Ngamo & Hance (2007), comme il existe une grande variation dans la sensibilité des espèces d'insectes pour une même huile essentielle, une huile essentielle n'exerce pas forcément la même activité aux différents stades du cycle biologique d'un insecte. Bostanian et al. (2005) démontrent que les huiles essentielles agissent directement sur la cuticule des insectes et acariens à corps mou, ces derniers sont moins efficaces avec des insectes à carapace dure tels que les coléoptères et hyménoptères adultes.

D'après les analyses obtenus, l'huile essentielle de *H. tuberculatum* est constituée principalement de pépéritone (13,35%) ; un composé cétonique qui agit d'une part par la dégradation des couches cireuses au niveau des téguments ce qui provoquerait la mort des larves suite à une forte déshydratation. Et d'autre part par une perturbation ou un blocage de la respiration, ce qui provoquerait la mort des larves par asphyxie. Dans ce cas les molécules actives de l'huile essentielle interviendraient probablement au niveau des médiateurs chimiques (Dümmler et al., 1993; Nyamador, 2009).

Il a été prouvé par une étude réalisé par Bohbot et Dickens (2010) que les cétones (2 - undécane) peuvent activer ou inhiber les récepteurs odorantes de *Aedes aegypti* (Diptera : Culicidae) ; ces derniers sont situés dans la membrane dendritique du neurone sensoriel olfactif des insectes. Ils déclenchent par la suite une transduction olfactive en changeant les potentiels d'action dans un message envoyé au cerveau.

Selon le même auteur, le 2 – undécane, considéré comme insectifuge active, inhibent les deux récepteurs AaOR<sub>8</sub> et AaOR<sub>2</sub>, respectivement; c'est -à-dire ce composé peut agir comme un agoniste ou antagoniste olfactive chez *A. aegypti*. Cette constatation suggère que l'effet insecticide de l'huile essentielle d'*H. tuberculatum* pourrait être attribué aux cétones qui entrent dans sa composition.

De même, dans une autre étude menée par Nadio et al. (2015) sur les propriétés insecticides de l'huile essentielle de *D'Ocimum sanctum* envers *Dysdercus Voelkeri* (Heteroptera; Pyrrhocoridae), une efficacité a été montrée sur tous les stades de l'insecte. Ainsi à la concentration de 1 µl/l, l'huile essentielle a entraîné 100% de mortalité. Ceci pourrait s'expliquer par la présence des constituants majoritaires dans l'huile essentielle de *Ocimum sanctum* représentées par les sesquiterpènes qui sont des molécules actives et volatiles qui agiraient par contact et qui ont la propriété de dissoudre les téguments protecteurs des insectes.

L'étude menée par Akkari et al. (2015) a prouvé l'action insecticide du 2-undécanone sur les larves du troisième et quatrième stade d'*Orgyia trigotephras*, après huit heures d'exposition. Un taux de 87,5% de mortalité a été signalé à une concentration de 1mg/ml. Selon le même auteur, ce potentiel insecticide est attribué à la distribution facile et rapide de l'huile sur le corps des larves. Cette action toxique conduit à une perturbation du système vital de l'insecte.

Les composés terpéniques présents dans l'huile essentielle des feuilles de thé (terpinène et cinéole) inhibent l'activité d'une enzyme, l'acétylcholinestérase, qui détruit l'acétylcholine après la transmission de l'influx nerveux (Huignard, 2012).

Des études récentes montrent que la plante attaquée est capable de réagir à son agresseur en faisant appel à autre être vivant qui va la défendre. Lorsque les larves de la noctuelle mangent les feuilles de maïs, elles broient les feuilles à l'aide de leurs pièces buccales et déposent sa salive. La plante reconnaît alors, grâce à des récepteurs situés au niveau des membranes des cellules végétales, une substance appelée volicitine contenue dans la salive de l'insecte et réagit à la présence de cette substance. La volicitine active certains gènes dans les cellules végétales qui vont déclencher toute une série de réactions chimiques se traduisant par la synthèse puis par la libération des composés volatils de nature terpénique. Ceux-ci diffusent dans l'atmosphère et attirent les guêpes parasitoïdes *Cotesia marginiventris* (Hym. Braconidé). Ces guêpes vont attaquer les larves de *S. exigua*, injectant un venin paralysant à l'intérieur de leur corps, puis y déposent des œufs. Le parasitoïde se développe aux dépens de la larve de noctuelle et provoque sa mort. Toutes les feuilles d'un même végétal attaqué par une larve de *S. exigua* répondent à l'attaque en émettant des terpènes (Huignard, 2013).

Des travaux récents ont montré également que les monoterpènes inhibent la cholinestérase, enzyme responsable de l'hydrolyse de l'acétylcholine, un neurotransmetteur excitateur le plus répandu chez les insectes. La non hydrolyse de l'acétylcholine entraîne

l'augmentation de sa concentration qui induit une hyperactivité aboutissant à la mort de l'insecte (López and Pascual-Villalobos, 2010). En effet, d'après les travaux d'Obeng-Ofori et *al.* (1997), le 1,8-cinéole en contact avec les insectes agit en bloquant la synthèse de l'hormone juvénile, il inhibe l'acétyl-cholinestérase en occupant le site hydrophobique de cet enzyme qui est très actif. Il inhibe également le développement des œufs, des larves et de la nymphe.

## II-6- Activité antioxydante

L'activité antioxydante des extraits méthanoliques des tiges et des feuilles a été évaluée par la méthode du piégeage du radical DPPH, selon le protocole décrit par Kouamé et *al.* (2009). Le DPPH, radical libre de couleur violette est réduit en un composé de couleur jaune en présence de composés anti-radicalaires. L'intensité de la coloration, mesurée au spectrophotomètre est inversement proportionnelle à l'activité antioxydante des composés dont on souhaite déterminer leurs activités.

Le pouvoir antioxydant de la partie aérienne (tiges et feuilles) est déterminé à partir des IC50. C'est la concentration du substrat qui cause une inhibition de 50 % de l'activité de DPPH. La valeur de l'IC50 et l'activité antioxydante de l'extrait testé sont inversement proportionnelles. Selon Kadri et *al.* (2011), une valeur plus faible de l'IC50 indique une activité antioxydante plus élevée. L'IC50 pour chaque extrait est calculée à partir de l'équation logarithmique de la courbe tracée (Annexe 6, Fig. 6).

Les valeurs obtenues ont permis de tracer des courbes ayant une allure exponentielle avec présence d'une phase stationnaire qui signifie la réduction presque totale du DPPH· en sa forme non radicalaire. A partir de ces courbes nous pouvons déterminer les pourcentages d'inhibition obtenus en fonction des concentrations utilisées ainsi la valeur d'IC50 de chaque extrait. Les valeurs des IC50 trouvées pour tous les extraits testés sont représentées dans le tableau 12.

**Tableau 12:** Valeurs des IC50 des différents espèces étudiées (en mg/ml).

Espèces	Organes	DPPH (IC <sub>50</sub> )
<i>Mostaganem</i> (Région Ouest)	Feuilles	0,0042 ± 0,00044
	Tiges	0,0104 ± 0,00113
<i>Bordj Bou Arreridj</i> (Région Est)	Feuilles	0,0018 ± 0,00027
	Tiges	0,0197 ± 0,00851
Adrar (Région Sud)	Feuilles	0,0134 ± 0,00214
	Tiges	0,0169 ± 0,0121
Ascorbic acid		0,0094 ± 0,0037

L'examen du tableau 12 laisse constater que les feuilles de *R.chalepensis* et *R.angustifolia* possèdent un pouvoir antioxydant très important car la concentration qui

permet d'inhiber les 50% des radicaux libres est égale à 0,0042 mg/ml et 0,0018 mg/ml pour *R.chalepensis* et *R.angustifolia*, respectivement. Cette activité est nettement plus importante que celle de la substance de référence avec une concentration égale à 0,0094 mg/ml. En revanche, l'activité antioxydante la moins élevée est enregistrée sur les feuilles et les tiges d'*Haplophyllum tuberculatum* dont les valeurs IC50 égalent à 0,01346 mg/ml et 0,0169mg/ml respectivement.

L'efficacité de la réduction du DPPH est inversement proportionnelle à la valeur d'IC50, elle est de l'ordre croissant selon le classement suivant :

Feuilles de *R.angustifolia*> feuilles de *R.chalepensis*>Ac ascorbique>tiges *R.chalepensis*> feuilles de *H.tuberculatum*> tiges de *R.angustifolia*>tiges de *H.tuberculatum*

On pourra dire que tous les extraits des feuilles sont les plus actifs comparativement à ceux des tiges, pour chaque espèce (sauf exception pour les extraits des tiges et des feuilles de *H.tuberculatum*). Les extraits des trois plantes testées s'avèrent presque tous actifs.

L'étude effectuée par Attou (2011) sur l'activité antioxydante de *Ruta chalepensis* récolté de quatre stations différentes de la région d'Ain Temouchent (Ouest Algérien) révèle aussi une activité antioxydante importante, où les IC50 sont comprises entre 1,16591mg/ml et 7,78526 mg/ml par rapport à l'IC 50 de l'acide ascorbique (0,06822 mg/ml).

Des travaux similaires réalisés par El abed *et al.*, (2013) portés sur la partie aérienne d'*Haplophyllum tuberculatum* récoltée dans le sud de la Tunisie, ont démontré que l'extrait méthanolique de la plante avait une meilleur efficacité antioxydante avec un IC50 de l'ordre de 0,0253 mg/ml.

Dans une récente étude, Nur Azfa Shuib *et al.*(2015) dévoilent que *Ruta angustifolia* exerce un pouvoir antioxydant important avec un IC50 de l'ordre de 2,04mg/ml comparativement à celui de l'acide ascorbique (0,22 mg/ml).

Les travaux de Kacem *et al.* (2015) ont montré également que *R. chalepensis* possède un potentiel antioxydant assez important. En effet, à une concentration de l'ordre de 500 mg/ml, l'extrait éthanolique décolore le DPPH et piège les radicaux libres avec un taux d'inhibition de l'ordre de 84%.

L'étude réalisée par Ghazghazi *et al.* (2013) sur l'activité antioxydante de *Ruta chalepensis* a révélé un pouvoir antioxydant remarquable ; IC50 des feuilles sont estimées à 35 µg/ml.

De même, les études d'Ouerghemm *et al.* (2016), réalisées sur l'extrait méthanolique des fleurs de *R. chalepensis* de deux provenances différentes (sauvages et cultivées), ont révélé que le potentiel antioxydant est assez important dans la partie aérienne de la plante,

avec un IC<sub>50</sub> de l'ordre de 23,73µg/ml pour les fleurs sauvages et 28,48µg/ml pour les fleurs de *R. chalepensis* cultivées. Les analyses chimiques de l'extrait méthanolique effectuées par RP-HPLC ont permis d'identifier 20 composés phénoliques avec une prédominance de l'acide vanillique et des coumarines.

Selon Turkmen *et al.* (2007) les polyphénols semblent être des donneurs efficaces d'hydrogène au radical DPPH, en raison de leur structure chimique idéale.

Les travaux réalisés par Kang *et al.* (2003) ont suggéré que les molécules polaires présentes dans les extraits végétaux contribuent à l'augmentation de l'activité antioxydant. Cela est dû généralement à la synergie entre les différents composés antioxydants existants. Les phénols sont des composés organiques qui contiennent un groupe hydroxyle directement lié au cycle aromatique, l'atome d'hydrogène du groupe hydroxyle ayant la capacité de piéger les radicaux peroxydes, empêchant ainsi d'autres composés à s'oxyder (Nguyen *et al.*, 2003).

D'après les résultats obtenus et en se référant à la littérature, on remarque que les deux espèces (*Ruta chalepensis* et *Ruta angustifolia*) sont riches en composés phénoliques totaux. Selon Abou-Zeid *et al.* (2014), la présence des composés phénoliques, alcaloïdes et terpénoïdes seraient probablement à l'origine de l'activité antioxydante des espèces de *Ruta.sp.* Ces composés sont en outre connus pour d'autres propriétés biologiques.

Il est bien connu que les substances phénoliques comme les flavonoïdes, les acides phénoliques, les tanins et les furocoumarines contribuent directement à la capacité antioxydante des plantes (Abou Zeid *et al.*, 2014). Selon Turkmen *et al.* (2007) les polyphénols semblent être des donneurs efficaces d'hydrogène au radical DPPH, en raison de leur structure chimique.

Ces conclusions viennent confirmer nos résultats. Le taux des polyphénols pour la partie feuille de *R.chalepensis* et *R.angustifolia* a été plus important comparativement à *H.tuberculatum*, il en est de même pour le pouvoir antioxydant. Ces résultats sont en accord avec ceux de plusieurs groupes de recherche, qui ont rapporté une corrélation positive entre tout le contenu phénolique et l'activité antioxydante (Pukalskas *et al.* , 2012).

En combinant les résultats des trois espèces étudiées, on a pu mettre en évidence l'existence d'une relation étroite entre la teneur en composé phénolique et leurs activités antioxydantes (Tab. 13). La capacité antioxydant semble être influencée par les teneurs des polyphénols totaux. Ces dernier ont montré une corrélation significative avec  $R^2=0,754$  ;  $P=0,01$ .

L'activité antioxydante des autres composés phénoliques mineurs ne devrait pas être négligée, du fait de la synergie entre les différents constituants chimiques (Bourgou *et al.*, 2008). Selon Kadri (2011) et Pukalskas (2012), l'activité antioxydante dépend de plusieurs facteurs, telles que : la concentration des extraits, la méthode d'évaluation, la sensibilité des antioxydants à la température de l'essai, la nature hydrosoluble ou liposoluble de l'antioxydant ...ect

## II-7- Rendements des extraits bruts

Les extraits méthanoliques obtenus présentent généralement, après évaporation sous rotavapor, un aspect pâteux et parfois visqueux, de couleur verte ou marron.

Le rendement a été déterminé par rapport au poids du matériel végétal sec rendu en poudre, les résultats ont été exprimés en pourcentage. Les proportions obtenues montrent que les rendements en extraits bruts sont variables selon l'espèce et la partie de la plante (Tab. 14).

Il est à constater que l'extrait brut des feuilles de *R. chalepensis* enregistre un fort rendement ( $1,85 \% \pm 0,09$ ), suivi par l'extrait des feuilles de *R. angustifolia* ( $1,51 \% \pm 0,16$ ). D'autres rendements plus au moins considérables ont été observés dans les extraits de feuilles d' *H. tuberculatum* ( $1,19 \% \pm 0,18$ ). En ce qui concerne les extraits méthanolique des tiges, les valeurs varient entre  $1,32 \% \pm 0,15$  et  $1,11\% \pm 0,098$ . Le rendement le plus élevé en substances solubles dans le méthanol est estimé à  $1,32 \% \pm 0,15$  pour les tiges de *R. chalepensis* suivi des tiges de *R. angustifolia* ( $1,30 \% \pm 0,052$ ). La valeur la plus faible est celle obtenue avec les tiges de *H. tuberculatum* ( $1,11 \% \pm 0,098$ ).

Ces rendements sont d'autant plus élevés dans les feuilles par rapport aux tiges, cela est prouvé par la plupart des études sur les extraits méthanoliques des plantes aromatiques. Khosravi et al. (2013) et Kheyer et al. (2014) ont démontré que les métabolites secondaires se concentrent au niveau des feuilles et des racines beaucoup plus que les tiges.

**Tableau 14:** Caractéristiques organoleptiques et rendements des extraits obtenus.

Espèces	Organes	Couleur de l'extrait méthanoïque	Aspect	Durée d'extraction	Nombre de cycles	Rd(%)
<i>Ruta angustifolia</i> (région BBA)	Tiges	Vert claire	Pâteux	45 mn	6	1,30 ± 0,052%
	Feuilles	Vert foncé	Pâteux	1 h 30 mn	6	1,51 ± 0,16%
<i>Happlophylum tuberculatum</i> (Région d'ADRAR)	Tiges	Vert claire	Pâteux	2 h 45 mn	6	1,11 ± 0,098%
	Feuilles	Vert foncé	Pâteux	2 h 20 mn	6	1,19 ± 0,18%
<i>Ruta chalepensis</i> (Région de Mostaganem)	Tiges	Vert claire	Pâteux	2 h	6	1,32 ± 0,15%
	Feuilles	Vert foncé	Pâteux	2 h 30 mn	6	1,85 ± 0,09%

Des teneurs notables sont signalées dans les travaux menés par El-Said et *al.* (1990) sur la même espèce, où le rendement en extrait brut de la partie aérienne entière est de 3,75%. En revanche, ces résultats sont nettement inférieurs à ceux obtenus par Attou (2011) qui sont de l'ordre de 19,81% pour les feuilles et 5,75% pour les tiges de *Ruta chalepensis*. Cela est probablement dû à la méthode d'extraction utilisée.

Selon Andersen et Markham (2006), la méthode d'extraction utilisée peut faire varier les rendements des extraits obtenus. Dans le cas de l'extracteur « soxhlet », différentes facteurs interviennent, à savoir : la nature du solvant, le temps d'extraction, le nombre de cycles nécessaires, le débit de condensation, le rapport solvant/ matière végétale et le taux de remplissage de la cartouche. En effet, Cowan (1999) attribue cette différence entre tiges et feuilles à la capacité d'extraction du solvant utilisé lors de l'extraction. Chaque solvant peut extraire des familles bien définies de métabolites secondaires existants dans les différentes parties de la plante étudiée. Le méthanol, solvant le plus polaire permet l'extraction des tanins, des saponines, des terpenoïdes, des anthocyanines, des xanthoxylines, des quasinoïdes, des lactones, des flavones, des phénones et des polyphénols. Il a l'aptitude à fixer plus de composés, ce qui augmente conséquemment le rendement d'extraction (Ciulei, 1980 ; Al-Brashdi et *al.*, 2016).

D'après plusieurs recherches, le mélange hydro- méthanolique (70% ou à 80 %) est très recommandé et fréquemment employé pour l'extraction des principes actifs et surtout les composés phénoliques et donne un meilleur rendement (Falleh et *al.*, 2008). Le méthanol peut empêcher l'oxydation enzymatique des composés phénoliques. En revanche, l'éthanol et l'acétone sont utilisés pour une meilleure extraction des flavonoïdes. Selon (Mohammedi et Atik, 2011), l'addition de l'eau aux solvants organiques augmente la solubilité des polyphénols par modulation de la polarité du solvant organique.

D'une manière générale, le rendement de l'extraction varie en fonction de l'espèce végétale, les propriétés génétiques des plantes, l'origine géographique des plantes, l'organe utilisé dans l'extraction, les conditions de séchage, la durée d'extraction, le pH, la température du solvant, la nature et la concentration du solvant utilisé dans l'extraction ou le fractionnement et de sa polarité (Djeugap et *al.*, 2011).

### **II-7-1- Activité antifongique des extraits méthanoliques**

C'est dans la perspective de l'exploration d'un éventuel potentiel antifongique qu'on a testé les extraits de *R. chalepensis*, *R. angustifolia* et *H. tuberculatum* sur la croissance mycélienne de trois champignons phytopathogènes: *Botrytis cinerea*, *Alternaria solani* et *FORL*. Ceci s'inscrit également dans le cadre de la recherche d'une démarche préventive de lutte intégrée visant à la réduction de l'utilisation des pesticides et en particulier les fongicides. L'exploration de leurs compositions phytochimiques riches et variées nous a encouragés à réaliser cette démarche.

#### **II-7-1-1- Croissance mycélienne de *FORL* vis-à-vis des extraits méthanoliques**

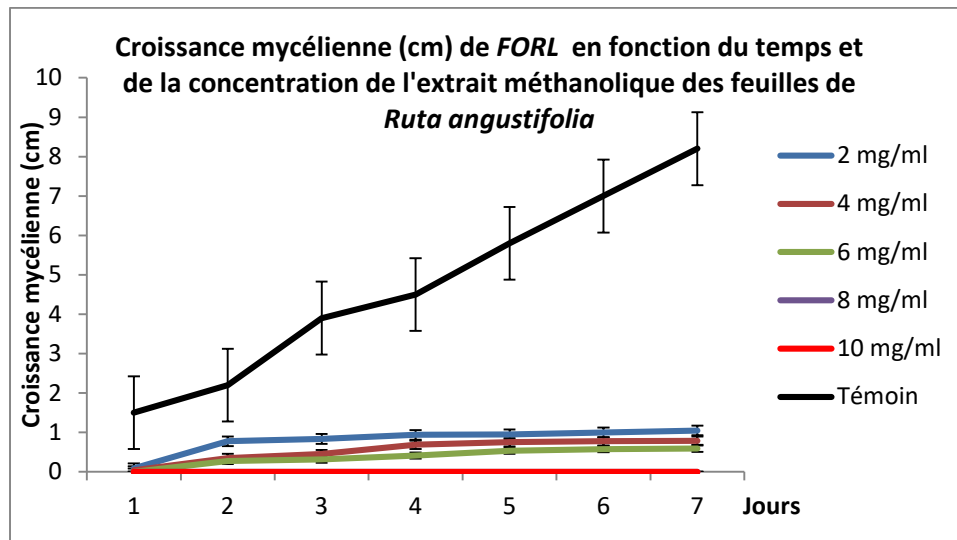
D'après les essais antifongiques *in-vitro*, tous les extraits des plantes utilisés possèdent une activité antifongique, dont l'intensité varie non seulement en fonction de l'espèce végétale, l'organe mais aussi de la dose testée.

L'activité antifongique est proportionnelle à la concentration. Plus l'extrait méthanolique est concentré, moins le diamètre de la colonie fongique est étendu.

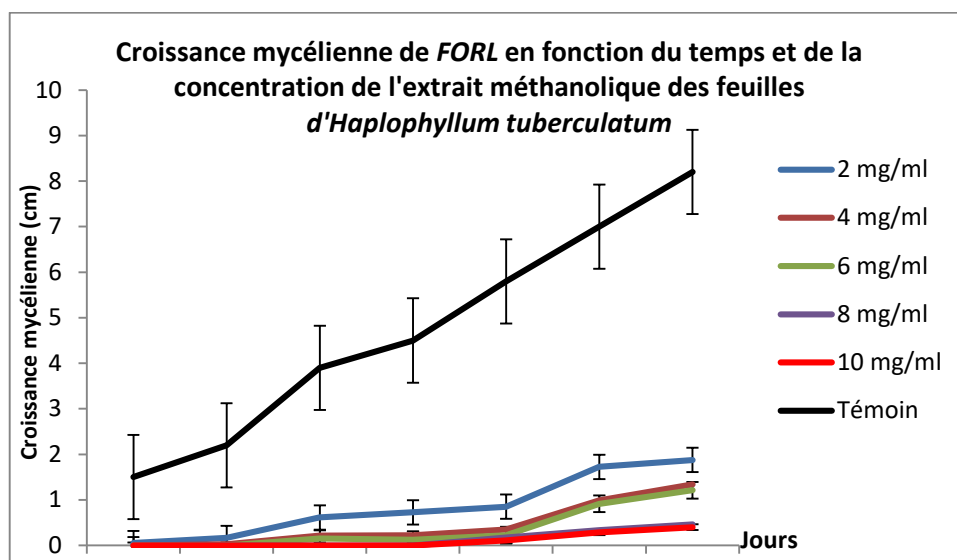
La figure 40 indique une croissance mycélienne quasi nulle à la concentration 10 mg/ml. A partir du quatrième jour, la croissance se déclenche modestement pour arriver à une valeur maximale de  $1,05 \pm 1,21$ cm, très moindre par rapport à celle du témoin.

Une croissance approximativement stable en fonction du temps. A partir du deuxième jour la croissance mycélienne progresse progressivement et atteint une valeur maximale estimée à  $1,87 \pm 0,22$  cm. En présence de la plus forte concentration, une croissance de  $0,40 \pm 0,18$ cm a été enregistrée (Fig. 41).

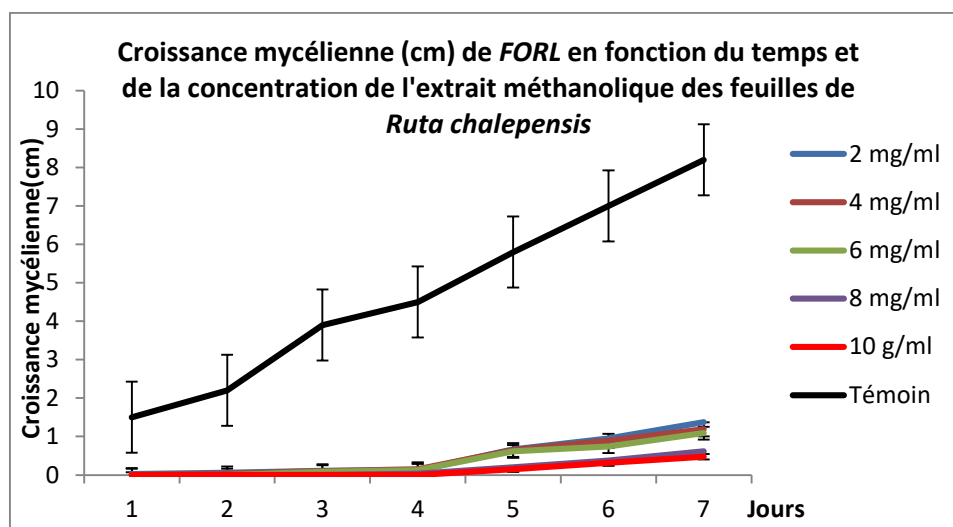
La figure 42 est pratiquement la plus fluctuante. La croissance mycélienne évolue lentement pendant la plupart du temps, puis augmente d'une manière spectaculaire les deux derniers jours suivants, pour atteindre un maximum de  $1,18 \pm 0,93$ cm, à la concentration de 2 mg/ml.



**Figure 40:** Croissance mycélienne (cm) de *FORL* en fonction du temps et de la concentration de l'extrait méthanolique des feuilles de *Ruta angustifolia*



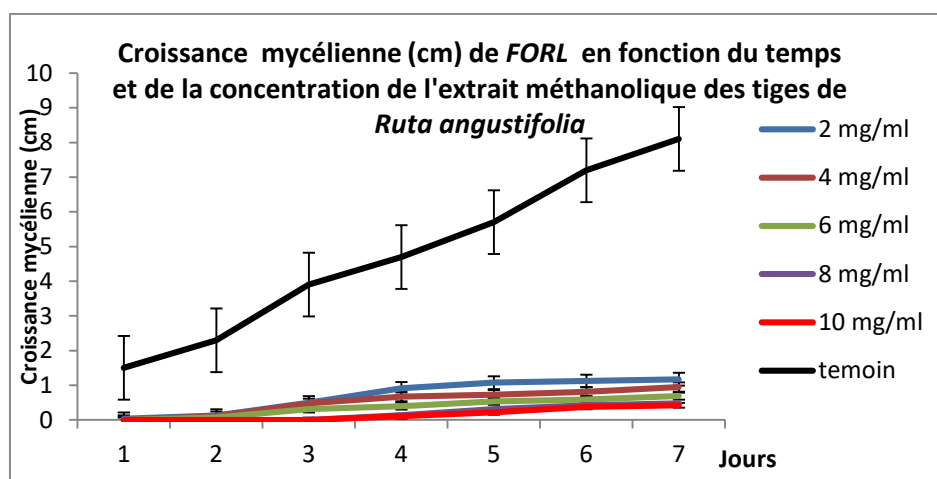
**Figure 41 :** Croissance mycélienne (cm) de *FORL* en fonction du temps et de la concentration de l'extrait méthanolique des feuilles d'*Haplophyllum tuberculatum*



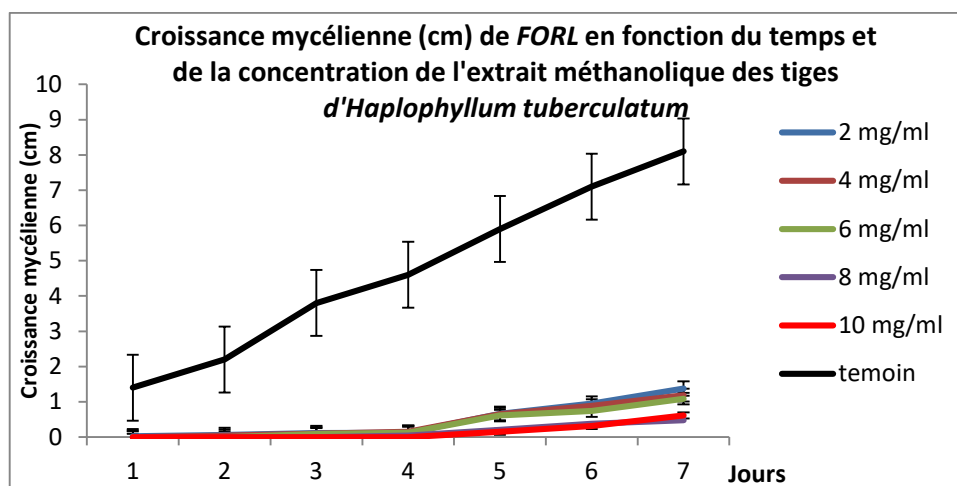
**Figure 42 :** Croissance mycélienne (cm) de *FORL* en fonction du temps et de la concentration de l'extrait méthanolique des feuilles de *Ruta chalepensis*.

Une distribution linéaire assez proche l'une de l'autre a été remarquée dans les figures 43 et 44 ; la croissance mycélienne augmente très modestement dès les premiers jours du test. Les valeurs maximales atteintes sont de  $0,95 \pm 0,1\text{cm}$  et  $1,37 \pm 0,47\text{cm}$ , en testant la dose de 2 mg/ml.

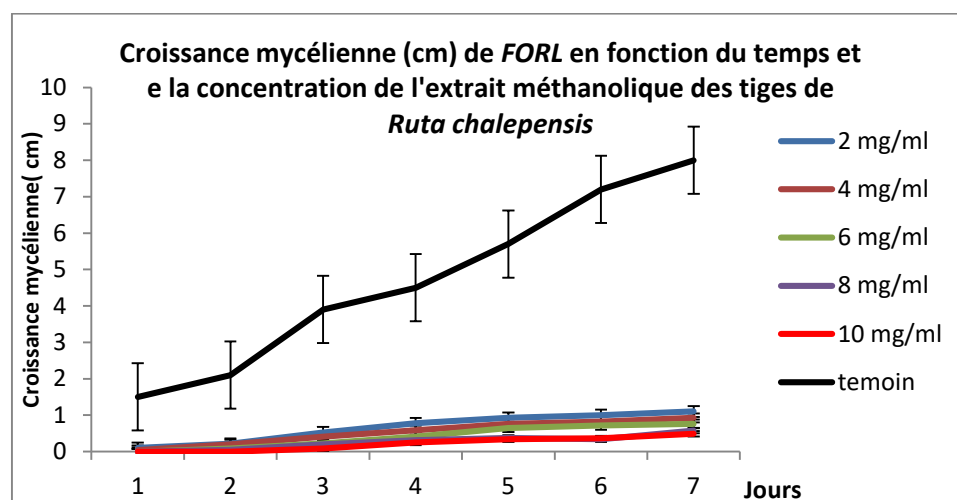
La figure 45 montre une croissance quasi-nulle pour la plupart des concentrations, elle se déclenche à partir du quatrième jour et atteint un maximum de  $1,1 \pm 0,44\text{ cm}$  pour la concentration la plus faible.



**Figures 43:** Croissance mycélienne (cm) de *FORL* en fonction du temps et de la concentration de l'extrait méthanolique des tiges de *Ruta angustifolia*



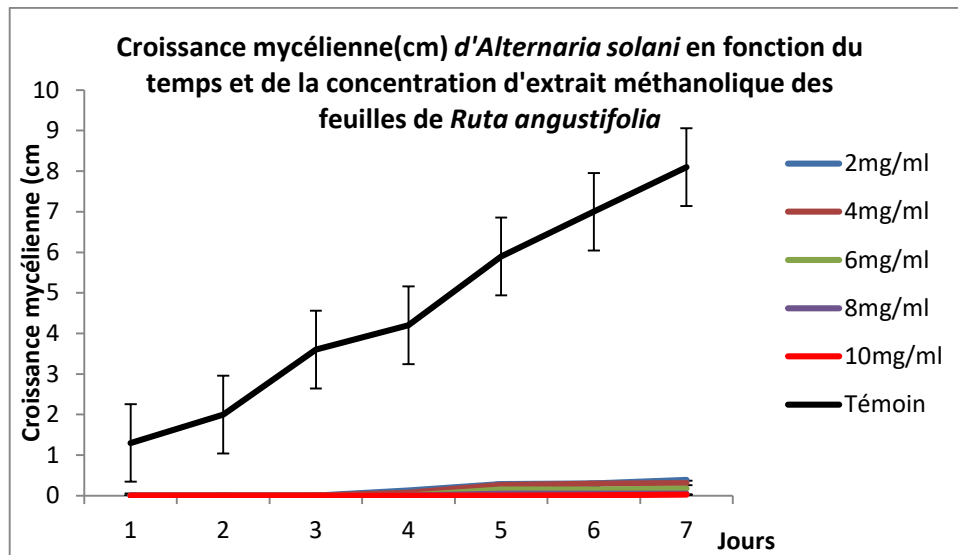
**Figures 44:** Croissance mycélienne (cm) de *FORL* en fonction du temps et de la concentration de l'extrait méthanolique des tiges d'*Haplophyllum tuberculatum*



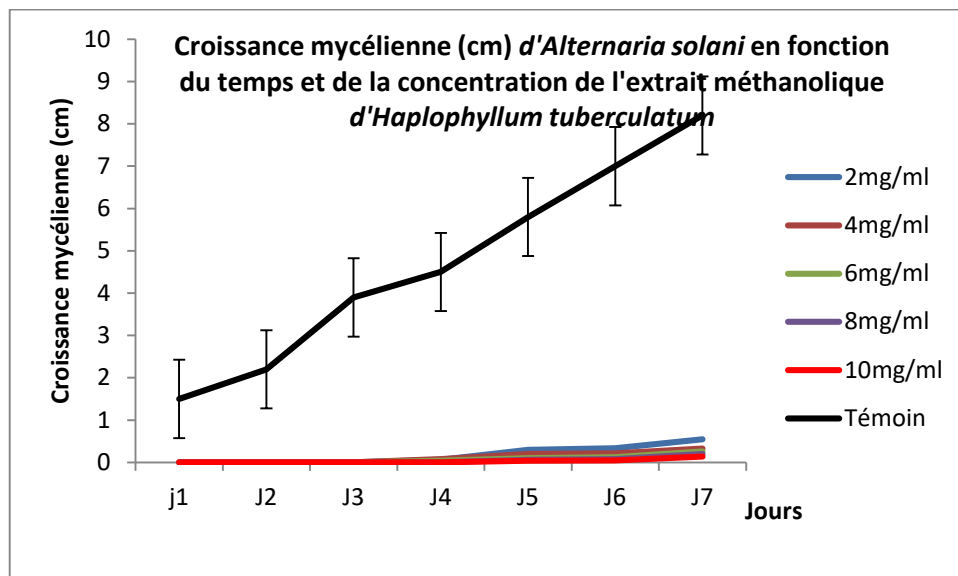
**Figures 45 :** Croissance mycélienne (cm) de *FORL* en fonction du temps et de la concentration de l'extrait méthanolique des tiges de *Ruta chalepensis*

### II-7-1-2- Croissance mycélienne d'*Alternaria solani*

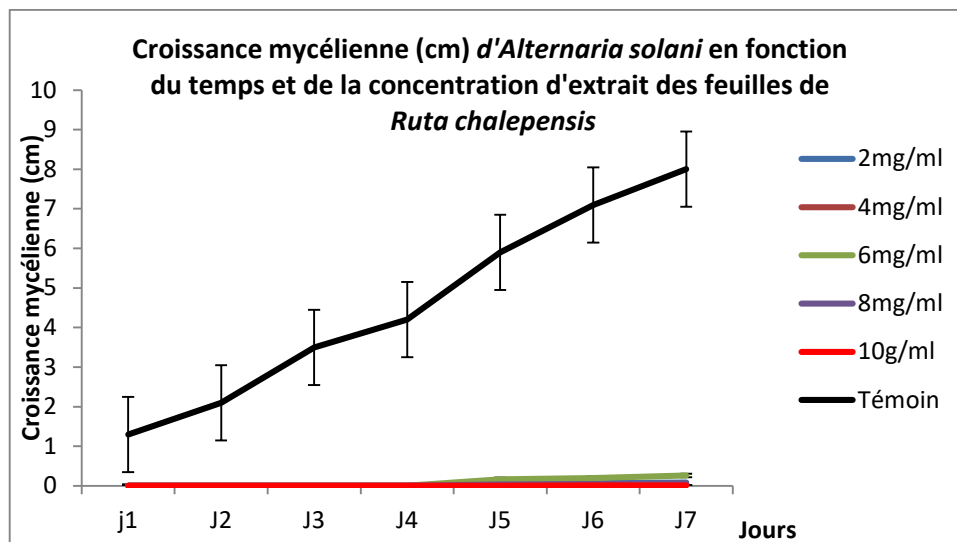
Concernant les figures 46, 47 et 48, les valeurs obtenues sont très faibles ne dépassant pas les 0,5 cm. Pour les tiges de *R. chalepensis* et *R. angustifolia*, la croissance mycélienne est quasi nulle à partir de la concentration 8mg/ml. Même avec les plus faibles concentrations, *A.solani* manifeste une grande sensibilité dont la croissance mycélienne estimée à  $0.01 \pm 0.8$  cm pour les feuilles de *R. chalepensis*,  $0,02 \pm 0,4$  cm pour *R. angustifolia*, et  $0,13 \pm 0.53$  cm pour *H. tuberculatum*.



**Figure 46:** Croissance mycélienne (cm) d'*Alternaria solani* en fonction du temps et de la concentration de l'extrait méthanolique des feuilles de *Ruta angustifolia*



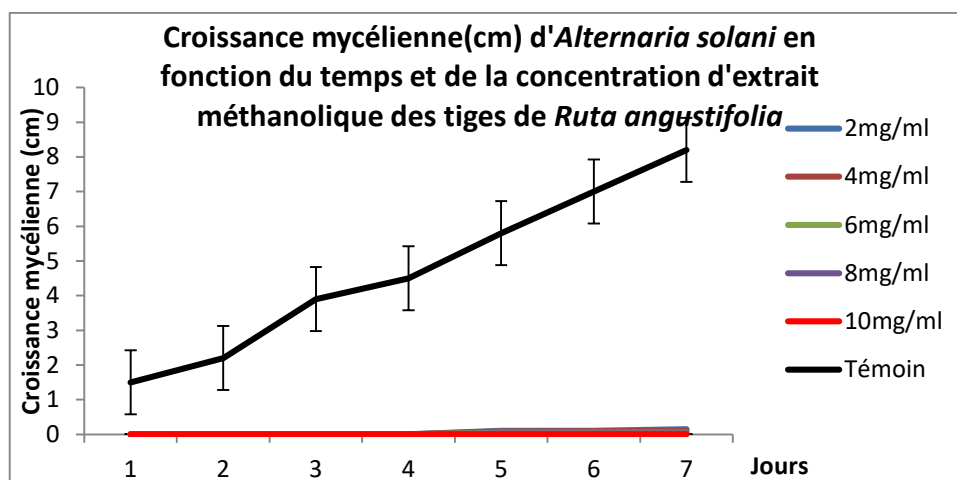
**Figure 47 :** Croissance mycélienne (cm) d'*Alternaria solani* en fonction du temps et de la concentration de l'extrait méthanolique des feuilles d'*Haplophyllum tuberculatum*



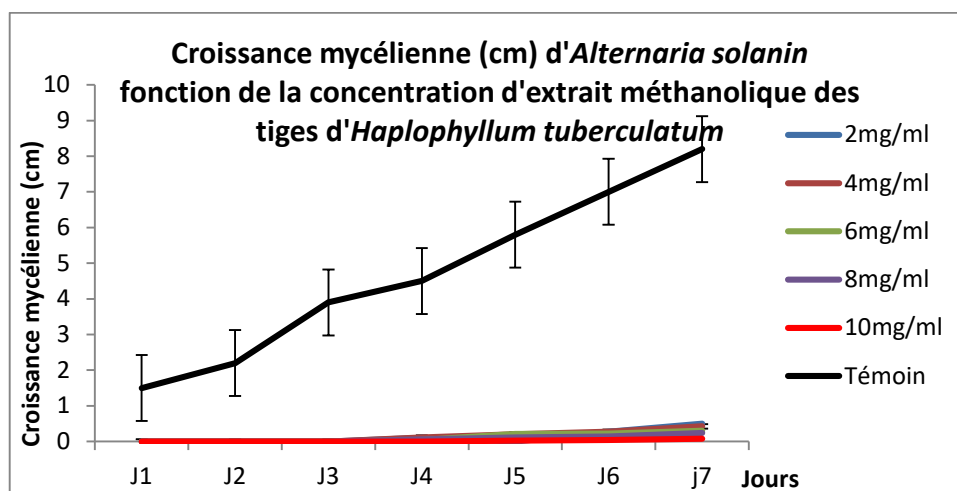
**Figure 48:** Croissance mycélienne (cm) d'*Alternaria solani* en fonction du temps et de la concentration de l'extrait méthanolique des feuilles de *Ruta chalepensis*

Les résultats de l'évaluation de l'activité antifongique ont démontré un pouvoir antifongique élevé dans la majorité des tests (Fig. 49, 50 et 51). Toutefois, le mode d'action s'est montré différent chez les trois espèces de plantes étudiées. En effet, ce dernier dépend non seulement du type et des caractéristiques de leurs composants actifs, mais aussi du type de microorganismes cibles (Mlecky, 2008). Ce principe s'applique pratiquement sur l'ensemble des résultats notés.

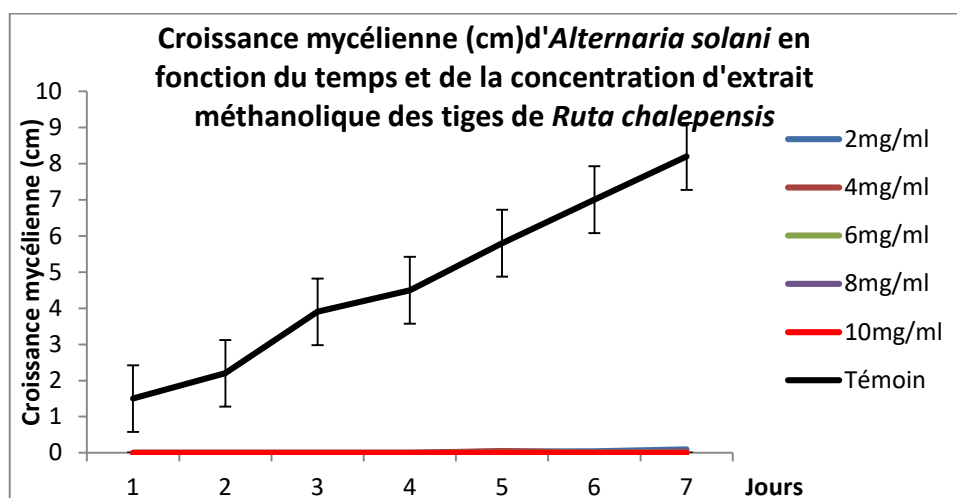
Une étude sur l'activité antimicrobienne des Rues sur un ensemble de microorganismes a démontré que les espèces de *Ruta* notamment *R. chalepensis*, *R. angustifolia* et *H. tuberculatum* n'ont pas le même mode d'action antifongique (Haddouchi *et al.*, 2013). L'auteur rapporte, dans ce sens que *R. chalepensis* révèle un effet tardif contrairement à *R. angustifolia* où l'action a été immédiate. Ces estimations sont similaires aux résultats obtenus, ce qui renforce donc notre supposition.



**Figure 49** : Croissance mycélienne (cm) d'*Alternaria solani* en fonction du temps et de la concentration de l'extrait méthanolique des tiges de *Ruta angustifolia*.



**Figure 50** : Croissance mycélienne (cm) d'*Alternaria solani* en fonction du temps et de la concentration de l'extrait méthanolique des tiges d'*Haplophyllum tuberculatum*.



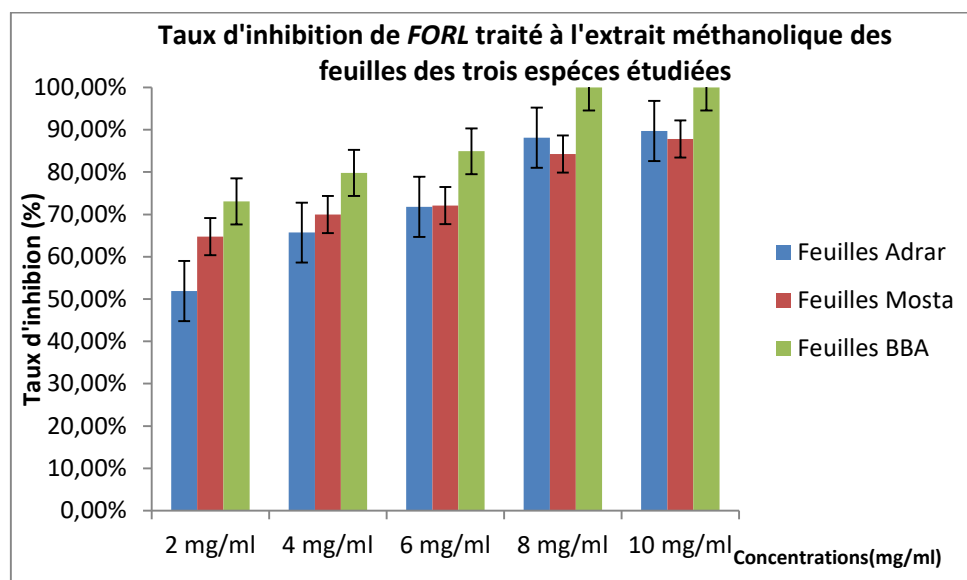
**Figure 51** : Croissance mycélienne (cm) d'*Alternaria solani* en fonction du temps et de la concentration de l'extrait méthanolique des tiges de *Ruta chalepensis*

En observant les courbes de la croissance mycélienne des pathogènes, une distribution linéaire différente l'une de l'autre a été signalée, ce qui reflète formellement la nature des interactions (pathogène/substance végétale) qui se sont produites au cours de l'incubation.

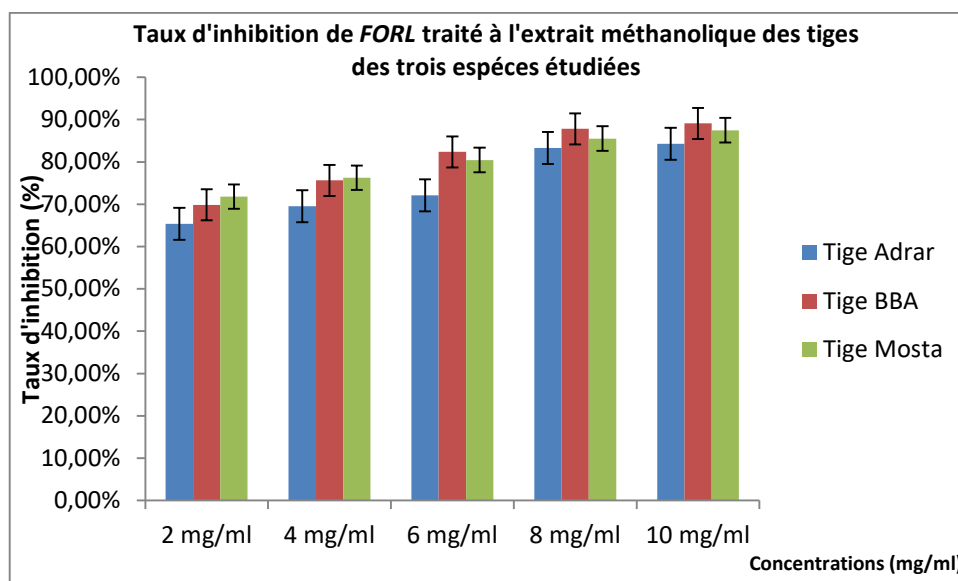
### II-7-1-3- Taux d'inhibition de *FORL* et *Alternaria solani* vis-à-vis des extraits méthanolique

L'extrait de *R. angustifolia* s'est révélé le plus efficace contre *FORL*, celui des feuilles a atteint une inhibition de 100% à une CMI de 8 mg/ml (Fig. 52). *FORL* est l'un des champignons vasculaires les plus difficiles à traiter, la littérature rédige que même avec des traitements chimiques parfois intenses, ce champignon résiste d'une façon étonnante. Les essais *in-vitro* effectués par Gholampour Azizi (2012) sur le même champignon sont parmi les rares cas où le champignon s'est montré hautement sensible vis-à-vis des extraits méthanoliques.

L'extrait méthanolique des feuilles a montré un effet antifongique remarquable comparativement à celui des tiges. A la concentration 10 mg/ml l'extrait méthanolique des tiges de *R.angustifolia* ont pu inhiber *FORL* à 87,50% (Fig. 53) et 100% pour l'extrait méthanolique de la même plante (Fig. 52) à la dose de 10 mg/ml et 8 mg/ml, respectivement.

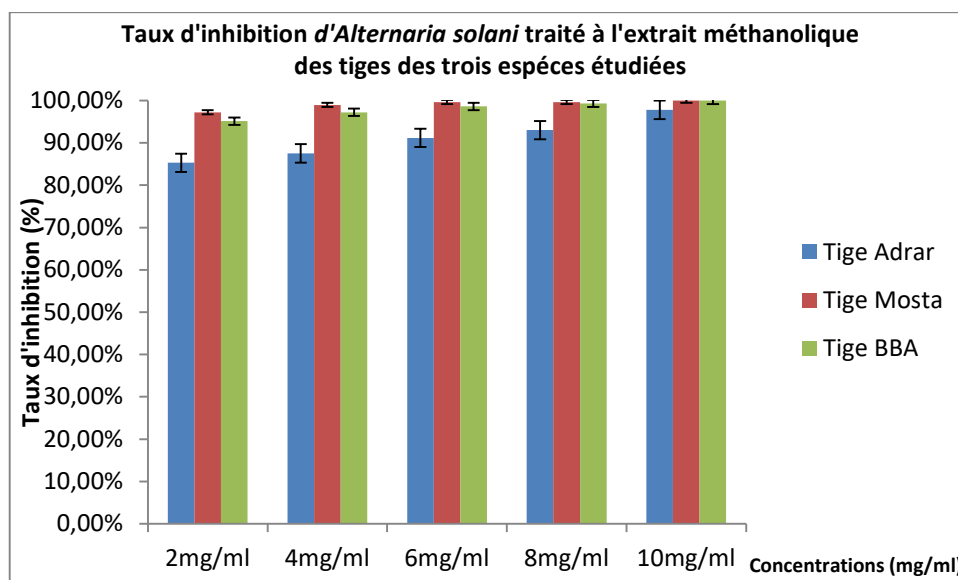


**Figure 52 :** Taux d'inhibition (%) de *FORL* traité à l'extrait méthanolique des feuilles des trois espèces étudiées.

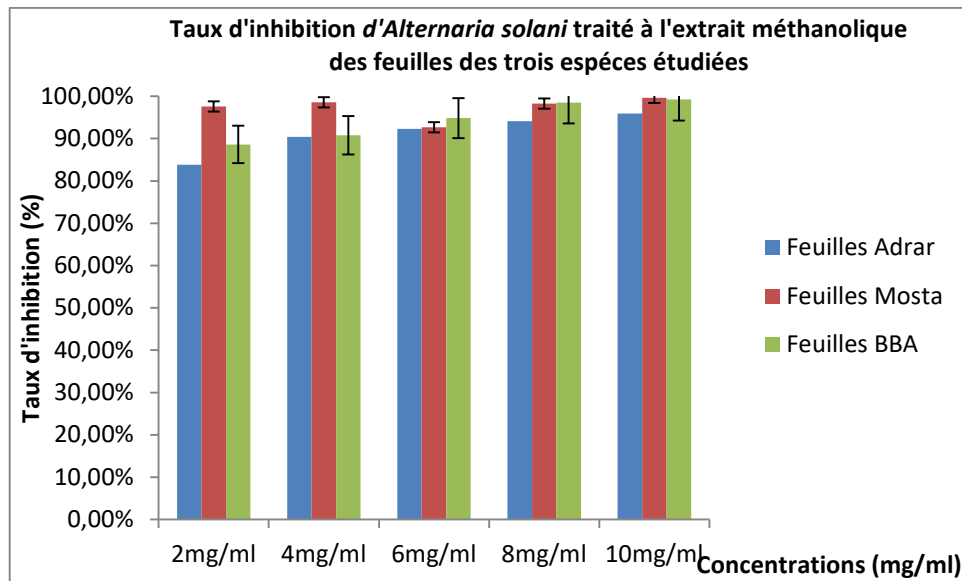


**Figure 53 :** Taux d'inhibition (%) de *FORL* traité à l'extrait méthanolique des tiges des trois espèces étudiées.

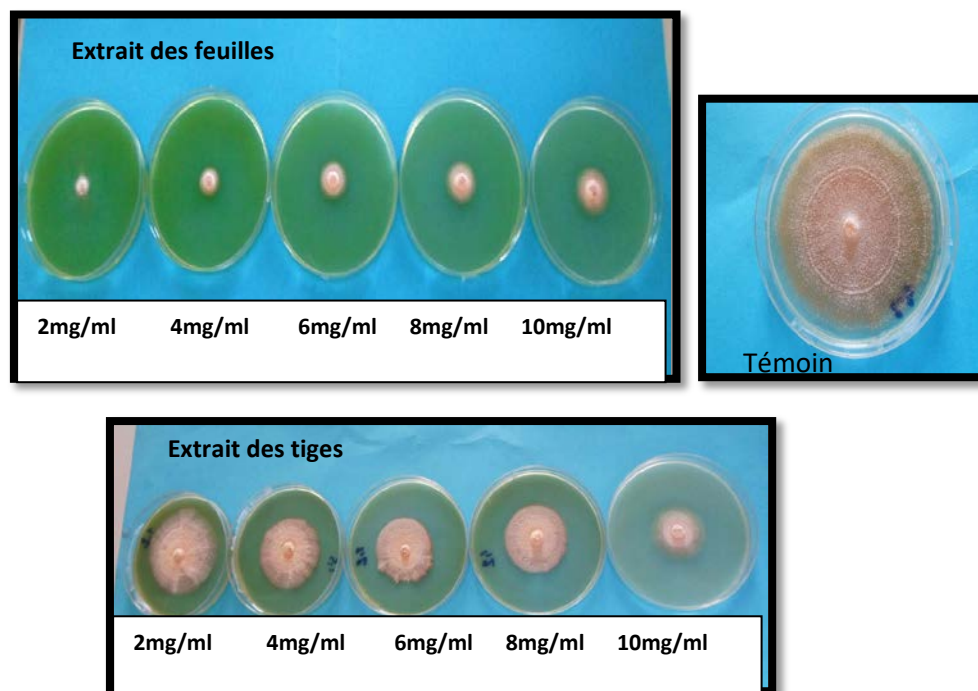
Les résultats qu'a révélés *A. solani* paraissent également intéressants du point de vue efficacité des extraits. Le champignon s'est montré hautement sensible à des concentrations de 10 mg/ml (CMI) pour les extraits des tiges de *R. angustifolia* et *R. chalepensis* dont le taux d'inhibition à atteint les 100% (Fig. 54).



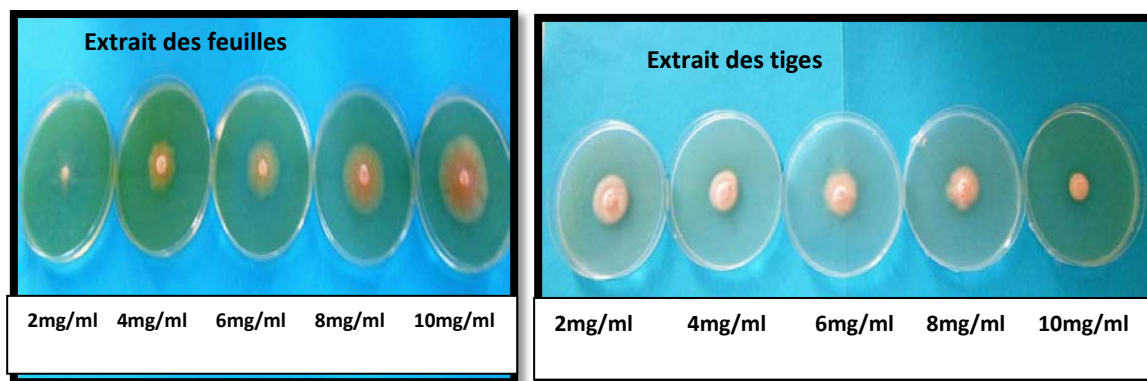
**Figure 54:** Taux d'inhibition (%) d'*Alternaria solani* traité à l'extrait méthanolique des tiges des trois espèces étudiées.



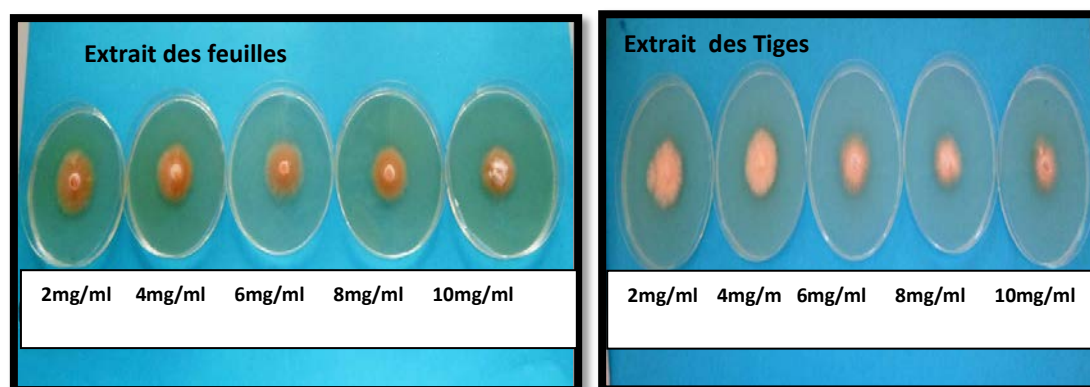
**Figure 55 :** Taux d'inhibition (%) d'*Alternaria solani* traité à l'extrait méthanolique des feuilles des trois espèces étudiées.



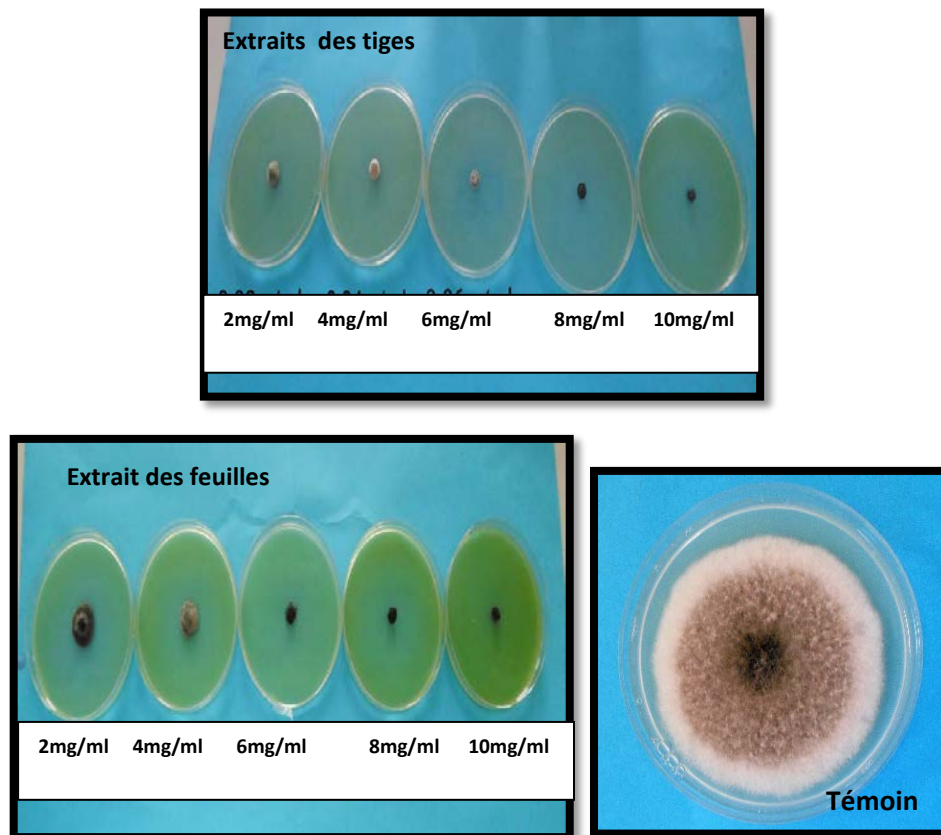
**Figure 56:** Résultat du test antifongique de l'extrait méthanolique des feuilles et des tiges de *R. chalepensis* sur FORL.



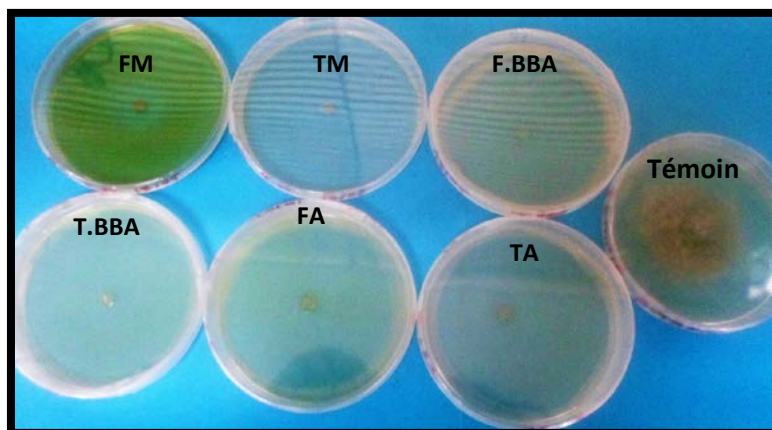
**Figure 57 :** Résultat du test antifongique de l'extrait méthanolique des feuilles et des tiges de *R. angustifolia* sur *FORL*.



**Figure 58:** Résultat du test antifongique de l'extrait méthanolique des feuilles et des tiges de *H. tuberculatum* sur *FORL*.



**Figure 59** : Résultat du test antifongique de l'extrait méthanolique des feuilles et des tiges de *R. angustifolia* sur *Alternaria solani*.



**Figure 60** : Résultat du test antifongique de l'ensemble des extraits méthanoliques sur *Botrytis cinerea*. FM : feuilles de *R. chalepensis*, TM : tiges de *R. chalepensis*, F.BBA : feuilles de *R. angustifolia*, T.BBA : tiges de *R. angustifolia*, FA : feuilles de *H. tuberculatum*, TA : tiges de *H. tuberculatum*.

D'après les analyses statistiques (Annexe7, Tab. 16 et 17), une différence significative a été notée entre les différentes espèces ( $F_2=31,68$  pour *A.solani* et  $F_2=51,35$  pour *FORL*;  $P<0,05$ ) et les concentrations utilisées ( $F_2=11,99$  pour *A.solani* et  $F_2=121,41$  pour *FORL*;  $P<0,05$ ). En revanche, le facteur organe n'a pas enregistré une différence significative pour *A.solani* ( $F_2=4,95$ ;  $P<0,05$ ), contrairement à *FORL*, où une différence significative a été notée ( $F_2=0,04$ ;  $P<0,05$ ).

Si on établit une vue d'ensemble sur les résultats obtenus, les six extraits testés ont présenté un large spectre d'action ; agissant aussi bien sur les champignons aériens (*B.cinerea*) que sur les champignons telluriques (*FORL*).

Plusieurs auteurs dans la littérature, ont montré que les champignons aériens sont plus sensibles *vis-à-vis* des traitements antifongiques que les champignons telluriques et notamment vasculaires (Alilou *et al.*, 2011).

Les résultats d'inhibition de la croissance de *Botrytis cinerea* s'accordent avec ceux trouvées par Oliva *et al.* (2003), où les extraits méthanoliques des tiges et des feuilles de *Ruta chalepensis* réduisent de façon significative la croissance de *FORL* à différentes concentrations graduelles. Par ailleurs, beaucoup de substances naturelles se sont montrées efficaces contre *B.cinerea*, telle que la propolis et l'extrait des feuilles de la renouée (*Fallopia japonica*). En effet, La concentration de 4% de la propolis dans l'eau distillée inhibe la croissance mycélienne de *B. cinerea* de plus de 50% (Ozcan, 1999).

#### **II-7-1-4- Concentrations minimales inhibitrices (CMI)**

Les essais permettent d'évaluer de façon quantitative l'activité antifongique exprimée en  $\mu\text{g/ml}$ . Cette valeur correspond à la concentration minimale qui permet l'inhibition de la croissance fongique observée à l'œil nu par l'absence de croissance mycélienne. Ainsi, plus la valeur de CMI est faible, plus la capacité antifongique de l'extrait est élevée. D'après le tableau 15, une activité antifongique remarquable a été observée pour tous les extraits des trois espèces testées sur les souches fongiques choisies, mais avec des degrés différents, ce qui s'est traduit par la différence des CMI.

**Tableau 15:** CMI en mg/ml des extraits de feuilles et tiges des trois espèces vis-à-vis des trois souches fongiques testées

CMI <sub>100</sub>	<i>R. chalepensis</i>		<i>R. angustifolia</i>		<i>H. tuberculatum</i>	
	Feuilles	Tiges	Feuilles	Tiges	Feuilles	Tiges
<i>FORL</i>	-	-	8	-	-	-
<i>Botrytis cinerea</i>	-	-	-	-	-	-
<i>Alternaria solani</i>	-	10	-	10	-	-

Une classification des extraits végétaux, sur la base des résultats des CMI, a été proposée par Aligiannis et ses collaborateurs (2001) :

- Forte inhibition : CMI inférieure à 50µg/ml ;
- Inhibition modérée : CMI varie de 600µg/ml à 1500µg/ml ;
- Faible inhibition : CMI supérieure à 1600µg/ml.

Selon cette classification, tous les extraits des trois espèces étudiées exercent une forte inhibition sur les souches fongiques testées.

Lors du repiquage sur un milieu sans extrait des champignons qui ne se sont pas développés, il a été observé que :

- Les champignons *A. solani* et *B. cinerea* n'ont pas repris leur croissance ce qui indique que l'effet des extraits utilisés est fongicide et le champignon est complètement détruit.
- Il y a une reprise de la croissance du champignon *FORL*, ce qui indique que l'extrait n'a fait qu'inhiber le développement du mycélium. L'extrait aurait donc un effet fongistatique.

L'inhibition de la croissance du pathogène par l'extraits serait dû au fait que ces extraits posséderaient des composés organiques naturels ayant des activités antimicrobiennes. Les auteurs les attribuent aux furanocoumarines et aux alcaloïdes de type quinoléine et quinolone avec une activité fongicide très importante vis-à-vis de *Botrytis cinerea*, parasite de la vigne (Oliva et al., 2003). Petit-Paly et al. (1982) rapportent également que l'activité inhibitrice de la croissance végétale d'extraits de *Ruta graveolens* est partiellement due aux furocoumarines (psoralène, bergaptène, xanthotoxine, isopimpinelline).

Les extraits sont préparés dans un solvant qui permet d'extraire les composés bioactifs parmi eux « les polyphénols » qui sont des substances phytochimiques hydrophiles. les solvants d'extraction hydrophiles sont de meilleurs solvants pour leurs récupérations à partir des différentes parties de la plante (Negi et Jayaprakasha, 2003 ; Alzoreky et Nakahara, 2003). Le mécanisme responsable de l'effet inhibiteur des composés phénoliques vis-à-vis des microorganismes phytopatogènes a été liée à une réaction avec les groupements sulfhydryles des protéines suivie d'une indisponibilité de substrats aux agents phytopatogènes

(Naz et *al.*, 2007), les sites et le nombre des groupements hydroxyles sur les composants phénoliques peuvent augmenter l'effet antimicrobien contre ces derniers (Cowan, 1999).

L'analyse chimique par HPLC réalisées par Ouerghemmi et ses collaborateurs (2016) à permis l'identification de Vingt composés phénoliques dans les différentes parties des deux provenances de *Ruta* (sauvages et cultivées) à savoir : Acide caféique, Acide trans-hydroxycinnamique, et l'acide férulique, et neuf acides hydroxybenzoïques (l'acide protocatechuic, l'acide 3,4-dihydroxybenzoïque, le 2,5-dihydroxybenzoïque, l'acide gallique, l'acide chlorogénique, acide syringique, l'acide carnosique, l'acide salicylique et l'acide vanillique). En outre, sept flavonoïdes ont été identifiés: l'apigénine, la catéchine hydrate, flavone, la lutéoline, de la naringine, le kaempférol et naphthoresorcinol. Les acides phénoliques et les coumarines représentent une importante portion dans la classe des phénols tandis que les flavonoïdes étaient faiblement représentés avec des pourcentages qui ne dépassaient pas 10% du total des phénols. Une comparaison des deux provenances a révélé que les tiges et les feuilles de *Ruta* « cultivées » présentaient significativement un pourcentage élevé en acides phénoliques que *Ruta* « sauvage ».

Par ailleurs, les extraits des tiges et des fleurs de *Ruta* « spontanée et cultivée » ont été particulièrement riche en coumarine. Dans ce sens, une étude publiée par Al-Said et *al.* (1990) ont montré que l'extrait des parties aériennes de *R. chalepensis* contient une grande quantité de coumarines, flavonoïdes et tannins.

Conformément à nos résultats, l'effet antifongique est dû à la présence des composés phénoliques et en particulier la rutine, ceci a été confirmé par les analyses UPLC (Ultra Performance Liquid Chromatography) réalisée au laboratoire des résidus industriels (Québec, CANADA). Les analyses ont été effectuées sur les tiges et les feuilles de *Ruta chalepensis* et *Ruta angustifolia* ou une richesse particulière de « la rutine » a été détectée pour les deux espèces : *R. angustifolia* et *R. chalepensis* (Tab. 16).

**Tableau 16** : Résultats du dosage des polyphénols par UPLC.

Echantillons	Concentration en mg/l des polyphénols									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Feuilles <i>R.angustifolia</i>	0,29	0,30	<LD	0,41	<LD	1,21	0,33	<LD	<b>114,88</b>	0,67
Tiges <i>R.angustifolia</i>	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	0,11	0,05	<LD	<b>21,92</b>	0,22
Tiges <i>R.chalepensis</i>	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	0,17	<LD	<b>13,50</b>	1,74

1 :Qercetin ; 2 :Ac.éllagique ; 3 : Catéchine ; 4 : Epicatéchine ; 5 :Ac.caféique ; 6 :Ac.gallique ; 7 :Ac.p-coumarique ; 8 : Catéchol ; **9 : Rutine** ; 10 :3-4 Dihydroxybenzaldehyde.

## II-7-2- Activité antifongique des huiles essentielles

Dans le but d'évaluer l'effet antifongique des huiles essentielles des trois espèces, un test antifongique a été mené également contre les trois champignons phytopathogènes choisis : *FORL*, *Botrytis cinerea* et *Alternaria solani*.

### II-7-2-1- Evaluation de la croissance mycélienne

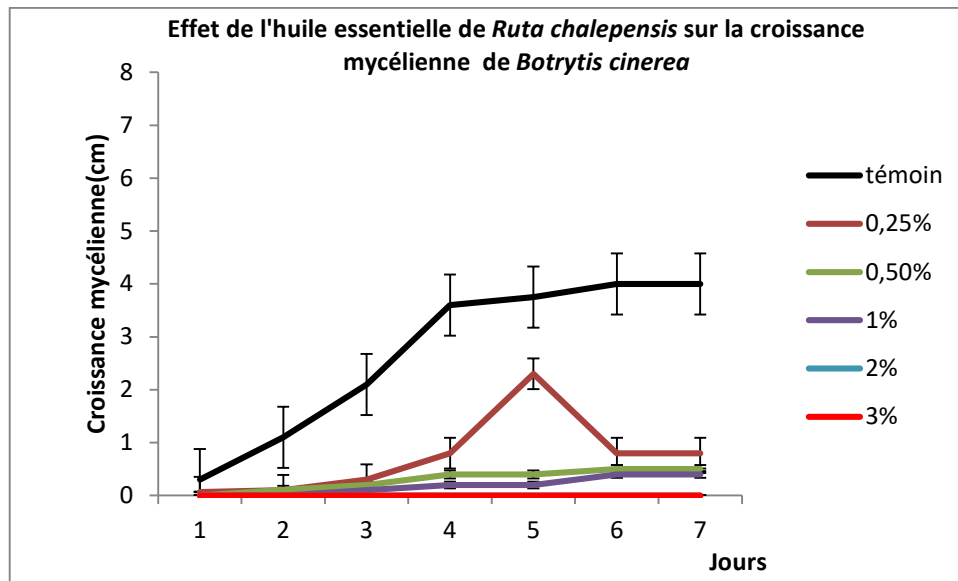
L'activité antifongique des huiles essentielles a été révélée par la méthode du contact direct, celle-ci consiste à mettre en contact l'huile essentielle et la souche fongique, puis à observer l'absence ou la présence de la croissance mycélienne.

A travers cette technique, il était possible de calculer la croissance mycélienne (cm), le taux d'inhibition des champignons testés et la concentration minimale inhibitrice (CMI).

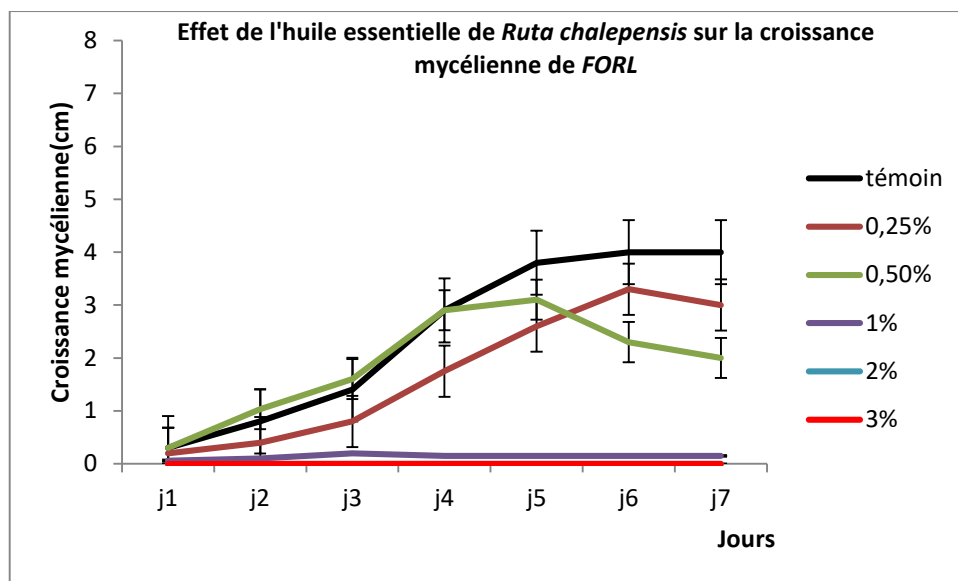
Les huiles essentielles des trois espèces (*R. chalepensis*, *R. angustifolia*, *H. tuberculatum*) ont été testées dans le but de mesurer la croissance mycélienne des souches fongiques, et ceci par l'utilisation de cinq concentrations croissantes allant de 0,25% à 3%.

A la lumière des résultats, les huiles essentielles ont révélé une efficacité antifongique remarquable sur l'ensemble des champignons.

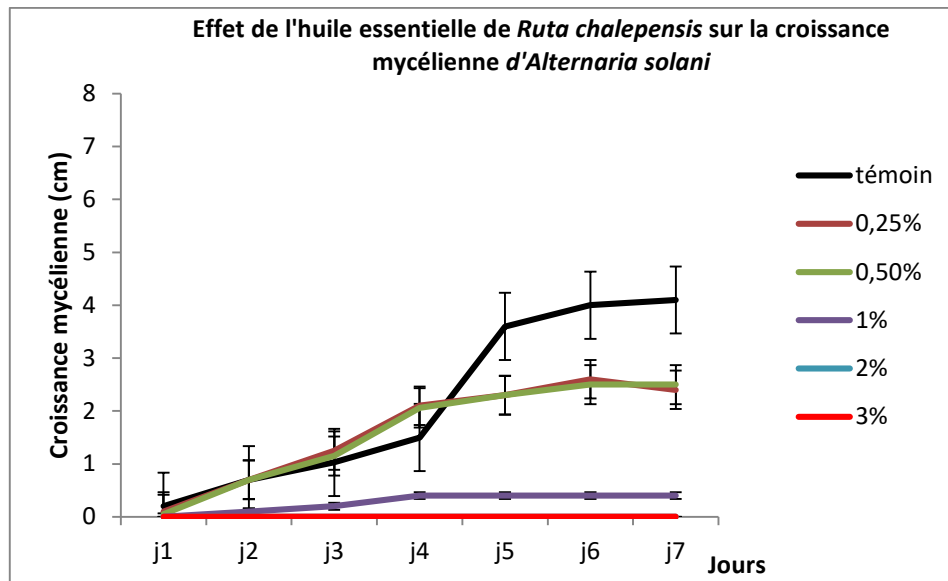
Les graphes obtenus, après sept jours de suivi, présentent la même allure (Fig. 61, 62, 63). En effet, l'évaluation de la croissance mycélienne des souches indique clairement une relation inversement proportionnelle entre la croissance mycélienne et la concentration des huiles essentielles. Au fur et à mesure que la concentration augmente, la croissance mycélienne diminue.



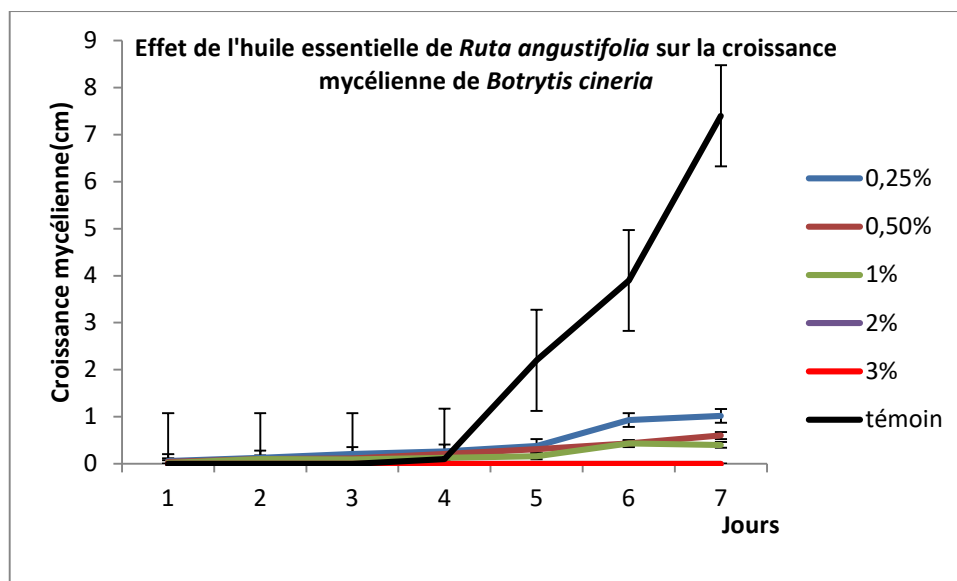
**Figure 61** : Evolution de la croissance mycélienne de *Botrytis cinerea* en fonction des différentes concentrations de l'huile essentielle de *Ruta chalepensis* durant sept jours d'incubation.



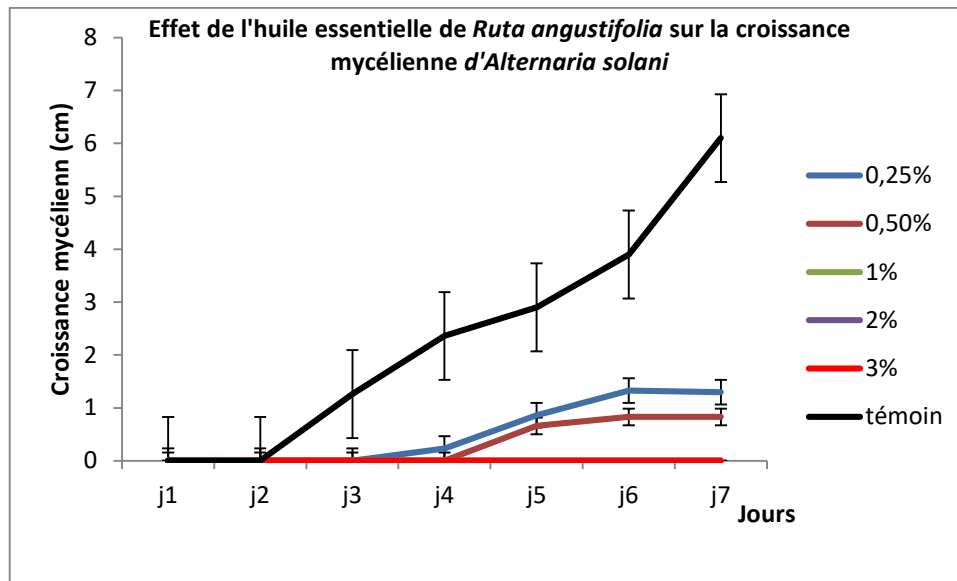
**Figure 62** : Evolution de la croissance mycélienne de FORL en fonction des différentes concentrations de l'huile essentielle de *Ruta chalepensis* durant sept jours d'incubation.



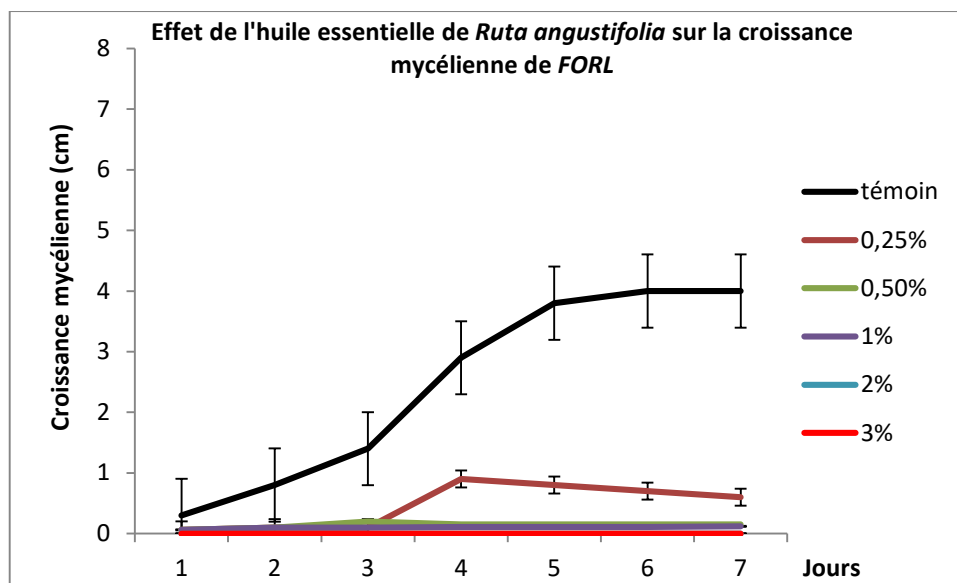
**Figure 63 :** Evolution de la croissance mycélienne d'*Alternaria solani* en fonction de différentes concentrations de l'huile essentielle de *Ruta chalepensis* durant sept jours d'incubation.



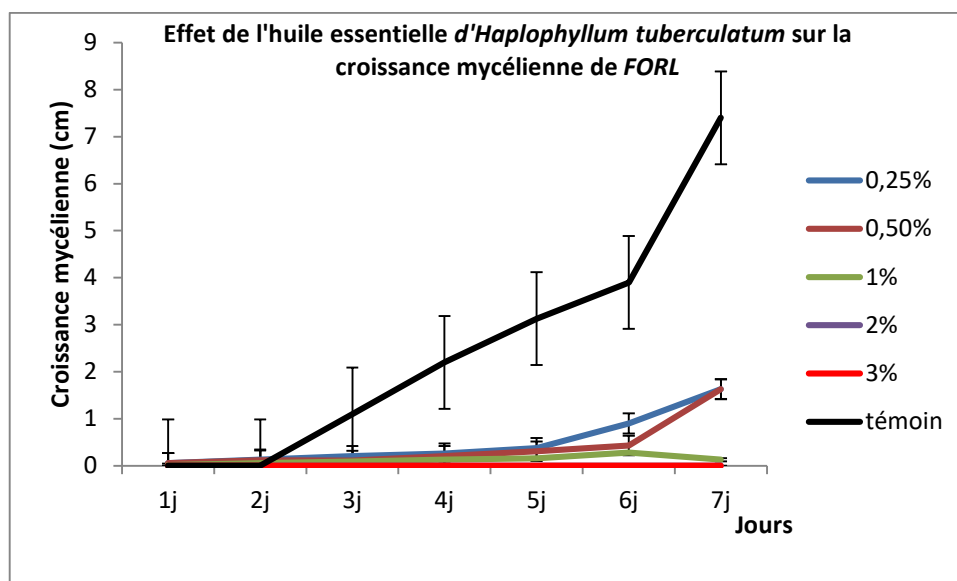
**Figure 64 :** Evolution de la croissance mycélienne de *Botrytis cinerea* en fonction des différentes concentrations de l'huile essentielle de *Ruta angustifolia* durant sept jours d'incubation.



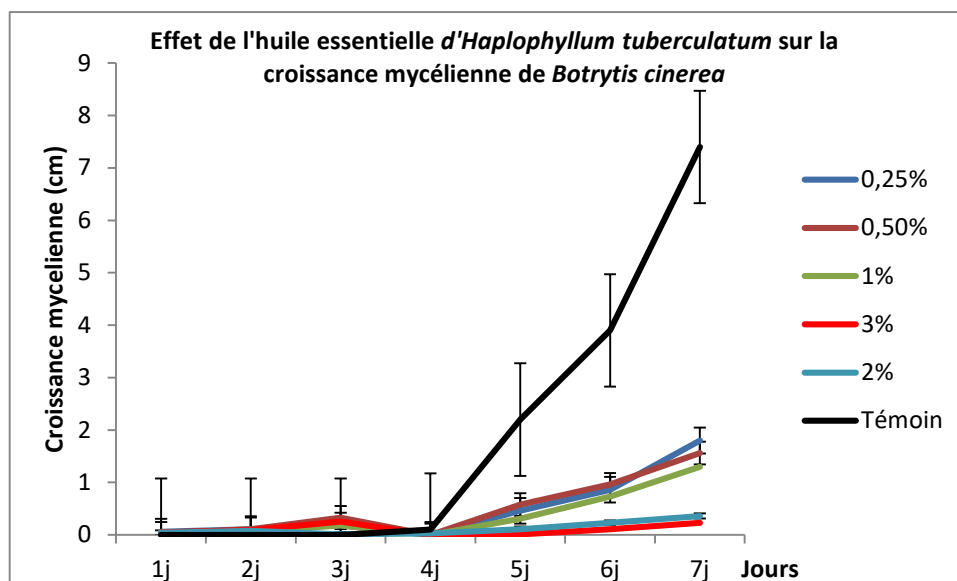
**Figure 65** : Evolution de la croissance mycélienne d'*Alternaria solani* en fonction des différentes concentrations de l'huile essentielle de *Ruta angustifolia* durant sept jours d'incubation.



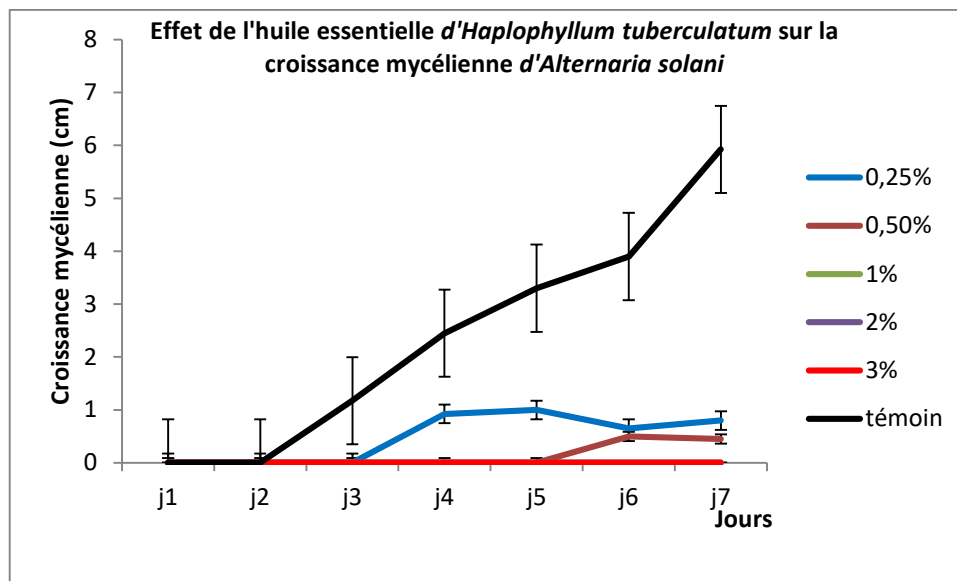
**Figure 66** : Evolution de la croissance mycélienne de FORL en fonction des différentes concentrations de l'huile essentielle de *Ruta angustifolia* durant sept jours d'incubation.



**Figure 67** : Evolution de la croissance mycélienne de *FORL* en fonction des différentes concentrations de l'huile essentielle d'*Haplophyllum tuberculatum* durant sept jours d'incubation.



**Figure 68**: Evolution de la croissance mycélienne de *Botrytis cinerea* en fonction des différentes concentrations de l'huile essentielle d'*Haplophyllum tuberculatum* durant sept jours d'incubation.



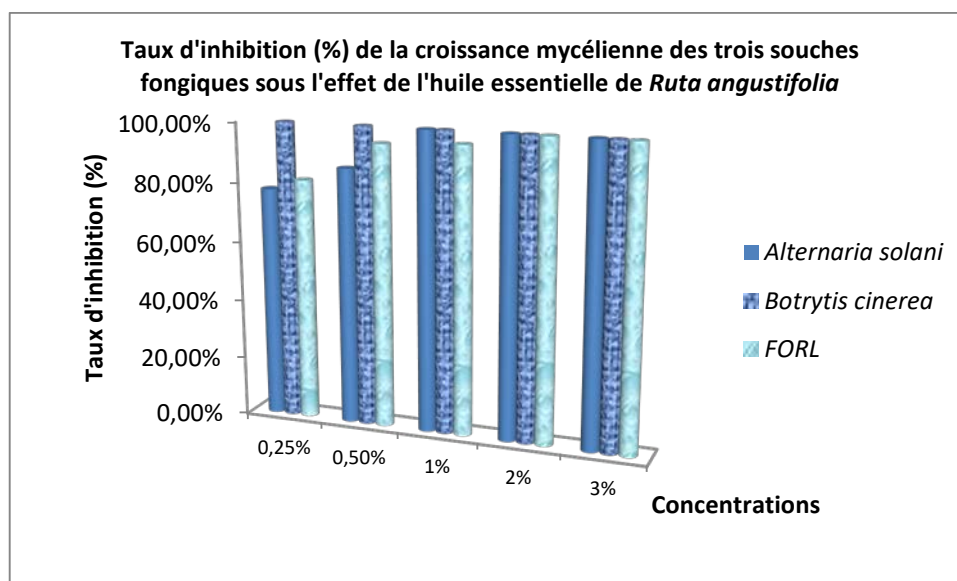
**Figure 69:** Evolution de la croissance mycélienne d'*Alternaria solani* en fonction des différentes concentrations de l'huile essentielle d'*Haplophyllum tuberculatum* durant sept jours d'incubation.

#### II-7-2-2- Taux d'inhibition

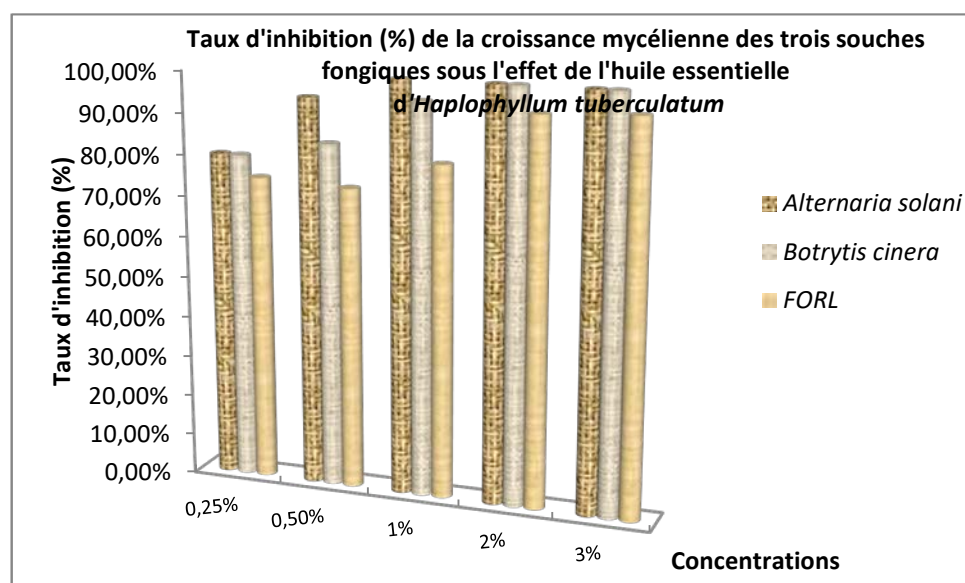
Les huiles essentielles des trois plantes possèdent un pouvoir antifongique très puissant sur les trois souches testées (Fig. 70, 71 et 72), ceci a été confirmé par les résultats obtenus où une inhibition totale de 100 % a été observée à la concentration de 2 et 3 % pour *R. chalepensis* et *R. angustifolia*, sauf exception pour *FORL* où une inhibition de 94,84 % a été signalée. Par contre, l'huile essentielle de *H. tuberculatum* a inhibé *Alternaria solani* à une concentration de 1%.

Une relation inversement proportionnelle est observé entre les deux facteurs : taux d'inhibition et concentrations des huiles essentielles. En effet, les doses de 0,25 et 0,5 % présentent une faible inhibition contre les trois souches. Quant aux doses de 2 et 3%, elles affichent une inhibition complète de *FORL* et *Alternari solani*, pour les trois espèces étudiées et une inhibition totale de l'huile essentielle de *H. tuberculatum* contre *Alternaria solani* à la concentration 1%. En outre, en termes d'efficacité, *Botrytis cinerea* reste le plus sensible aux différentes concentrations de l'huile essentielle des trois espèces.

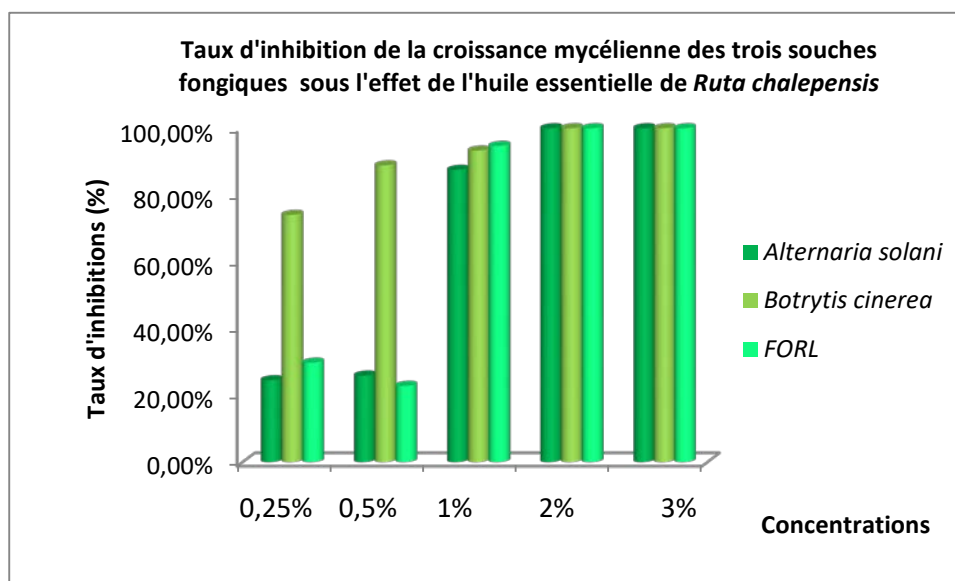
Le test de l'analyse de Variance (Tab. 14, Annexe 7) a montré que l'effet de la souche fongique et de l'espèce végétale ont une différence très hautement significative ( $P \leq 0.001$ ) sur la croissance mycélienne des trois champignons.



**Figure 70** : Taux d'inhibition de la croissance mycélienne des trois souches fongiques vis-à-vis de l'effet de l'huile essentielle de *Ruta angustifolia*.



**Figure 71**: Taux d'inhibition de la croissance mycélienne des trois souches fongiques vis-à-vis de l'effet de l'huile essentielle d'*Haplophyllum tuberculatum*.



**Figure 72** : Taux d'inhibition de la croissance mycélienne des trois souches fongiques *vis-à-vis* de l'effet de l'huile essentielle de *Ruta chalepensis*.

### II-7-2-3- Concentrations minimales inhibitrices (CMI)

Cette valeur correspond à la concentration minimale qui permet l'inhibition de la croissance fongique observée à l'œil nu par l'absence de croissance mycélienne. Sa détermination a été faite par observation de l'absence totale de la croissance des souches dans les différentes concentrations utilisées. Ainsi, plus la valeur de CMI est faible, plus la capacité antifongique de l'huile essentielle est élevée. D'après les résultats enregistrés, une activité inhibitrice de 100% a été remarquée par l'application des concentrations de 1, 2 et 3%. Les valeurs obtenues sont regroupées dans le tableau 20.

Vu cette inhibition totale des trois souches fongiques, il était important de savoir si l'huile essentielle était fongistatique ou fongicide à ces concentrations. En effet, le transfert de disque des champignons, totalement inhibé, vers un autre milieu de culture PDA a été nécessaire pour évaluer la viabilité de ces champignons.

Les résultats des essais obtenus, *in vitro* (Tab. 17), ont montré que la croissance mycélienne réapparaît après que le disque ait été exposé à l'huile essentielle pendant 1, 3, 6 et 12 jours. Ainsi, les résultats obtenus dévoilent que l'effet représenté par l'huile essentielle des trois espèces exerce un effet fongistatique envers les champignons testés (Fig. 52, 53 et 54).

**Tableau 17:** CMI<sub>100</sub> en % des trois espèces de *Ruta vis-à-vis* de *FORL*, *Botrytis cinerea* et *Alternaria solani*.

CMI <sub>100</sub>	<i>R. chalepensis</i>	<i>R. angustifolia</i>	<i>H. tuberculatum</i>
<i>FORL</i>	2	2	-
<i>Botrytis cinerea</i>	2	0,25	2
<i>Alternaria solani</i>	2	2	1

L'évaluation de l'activité antifongique par la méthode de dilution en milieu solide a révélé l'inhibition de croissance des filaments mycéliens pour la plupart des souches testées.

La plupart des études sur le mécanisme d'action des huiles essentielles se sont accentuées sur leurs effets sur les membranes cellulaires.

Jusqu'à ce jour, le mécanisme d'action des huiles essentielles contre les champignons n'est pas totalement compris, mais quelques suppositions ont été données par plusieurs auteurs. En fait, les composés actifs attaquent la paroi et la membrane cellulaire, affectant de ce fait la perméabilité et le dégagement des constituants intracellulaires, en interférant également avec la fonction de la membrane (Bajpai & Kang, 2010). La perturbation de cette matrice peut avoir comme conséquence une paroi défectueuse, qui devient sensible à la lyse osmotique qui est due aux agents antifongiques (Yen & Chang, 2008).

D'après les observations de Fiori *et al.* (2000), l'huile essentielle de *Foeniculum vulgare* Mill. a entraîné des détériorations de la morphologie des thalles, ils ont observé également des grandes vésicules à l'intérieur de la paroi cellulaire. Dans beaucoup de cas, les cellules du mycélium n'ont plus un cytoplasme ou un cytoplasme épuisé des organelles. Des observations similaires avec d'autres huiles essentielles ont été rapportées par Zambonelli *et al.* (1996) et Soylu *et al.* (2005)

McEwan rapportent que l'inhibition de la croissance mycélienne des champignons est due à l'empêchement de la germination des conidies par les composés volatils de l'huile essentielle (McEwan, 1994).

L'action de ces composées débute par une hydratation suivie par une action enzymatique lytique telles que la chitinase  $\alpha$  et  $\beta$ -glucanases. Ce qui provoque une décomposition de la paroi cellulaire des conidies épaissie pour permettre l'apparition du tube germinatif initial. Une fois que cet événement a lieu, il y a un équilibre entre les systèmes lytiques et synthétiques d'enzymes nécessaires pour la prolongation normale des hyphes. Un

déséquilibre dans l'un ou l'autre système d'enzyme mène à l'inhibition et/ou à l'empêchement de croissance.

Les travaux de Carmo *et al.* (2008) montrent, également, que l'activité antifongique des huiles essentielles pourrait être liée à l'interférence des composants de l'huile essentielle dans des réactions enzymatiques de la synthèse de la paroi cellulaire, qui affecte la croissance fongique. Ces suggestions ont été déjà rapportées par Bang *et al.* (2000). Ils ont étudié l'inhibition des enzymes synthétisant la paroi des cellules fongiques en examinant les effets inhibiteurs de l'huile essentielle sur le  $\beta$ -(1.3) glucane et sur la chitine synthétase.

En effet, le mécanisme d'action des composés phénoliques des huiles essentielles sur les champignons est fondé principalement sur l'inhibition des enzymes fongiques contenant le groupement SH dans leur site actif (Celimene *et al.*, 1999).

Plusieurs auteurs, notamment Mares *et al.* (2004); Rasooli and Abyaneh (2004) et Sharma & Tripath (2007), ont constaté que les huiles essentielles peuvent causer des changements morphologiques comprenant l'insuffisance de sporulation, la perte de pigmentation, le développement anormal des conidiophores et la déformation des hyphes.

Selon Derwich *et al.* (2010), l'activité antimicrobienne des monoterpènes est expliquée par la présence des groupes d'hydroxyles phénoliques capables de former des liaisons hydrogènes avec les emplacements actifs des enzymes de la cellule ciblée.

Les recherches actuelles confirment que l'activité biologique d'une huile essentielle est à mettre en relation non seulement avec la composition chimique, les groupes fonctionnels des composés majoritaires (alcools, phénols, composés terpéniques et cétoniques) et leurs proportion mais également aux possibles effets synergiques entre ces composants (Lahlou *et al.*, 2004).

En se basant sur les résultats de l'analyse chimique par CPG/SM, le potentiel antifongique de l'huile essentielle des espèces étudiées pourrait être dû à l'abondance des cétones, monoterpènes et sesquiterpènes et à l'effet synergique avec les constituants mineurs, qui peuvent également être impliqués dans l'activité antifongique.

Parce qu'elles affectent plusieurs cibles simultanément, les huiles essentielles peuvent être utiles en tant qu'agents antifongiques et il n'y a aucun rapport de résistance ou d'adaptation des microorganismes à cause de la diversité des composés chimiques (Bakkali *et al.*, 2008).

Beaucoup de chercheurs ont confirmé la présence de l'activité antifongique de l'huile essentielle des *Rutaceae* (Chedia *et al.*, 2013). De même, nos essais antifongiques prouvent

l'existence de cette activité et indiquent que les huiles essentielles des trois espèces étudiées ont une activité antifongique très intéressante

La richesse des trois espèces en terpénoides pourrait expliquer son activité antifongique sur les champignons étudiés. En effet, Benbnina *et al.* (2010) ont montré dans une étude comparative entre l'huile essentielle des feuilles, tiges et fleurs sur *Botrytis cinerea* (tomate), *Alternaria solani* et *Fusarium solani* (pomme de terre) que l'huile essentielle des feuilles de *Ruta chalepensis* exerce un effet fongicide important comparativement aux autres espèces. De même, il a été prouvé que certaines lactones sesquiterpéniques sont antifongiques (Mitscher et Hasennhuettl, 1975).

La richesse de l'huile essentielle en composés monoterpéniques pourrait être responsable de l'effet antifongique de cette huile sur les trois champignons testés. En effet, plusieurs travaux ont étudié l'efficacité des monoterpènes oxygénés dans l'activité antifongique (Salamci *et al.*, 2007).

Les terpènes phénoliques agissent sur les champignons grâce à divers mécanismes basés, d'une part, sur l'inactivation des enzymes fongiques qui contiennent le groupement SH dans leur site actif et d'autre part en se fixant sur les groupes amine et hydroxylamine des protéines membranaires microbiennes provoquant ainsi une altération de la perméabilité et une fuite des constituants intracellulaires (Cowan, 1999 ; Lopez-Malo *et al.*, 2005 ; Cristiani *et al.*, 2007). Les travaux réalisés par plusieurs chercheurs ont affirmés également que la forte activité antifongique observée avec l'huile essentielle d'*Ocimum gratissimum* peut être uniquement au thymol. Celui-ci interviendra dans l'inhibition de la synthèse de la trehalase, une enzyme impliquée dans la transformation du glucose chez les champignons (Cowan, 1999 ; Dorman et Deans, 2000 ; Lopez-Malo *et al.*, 2005).

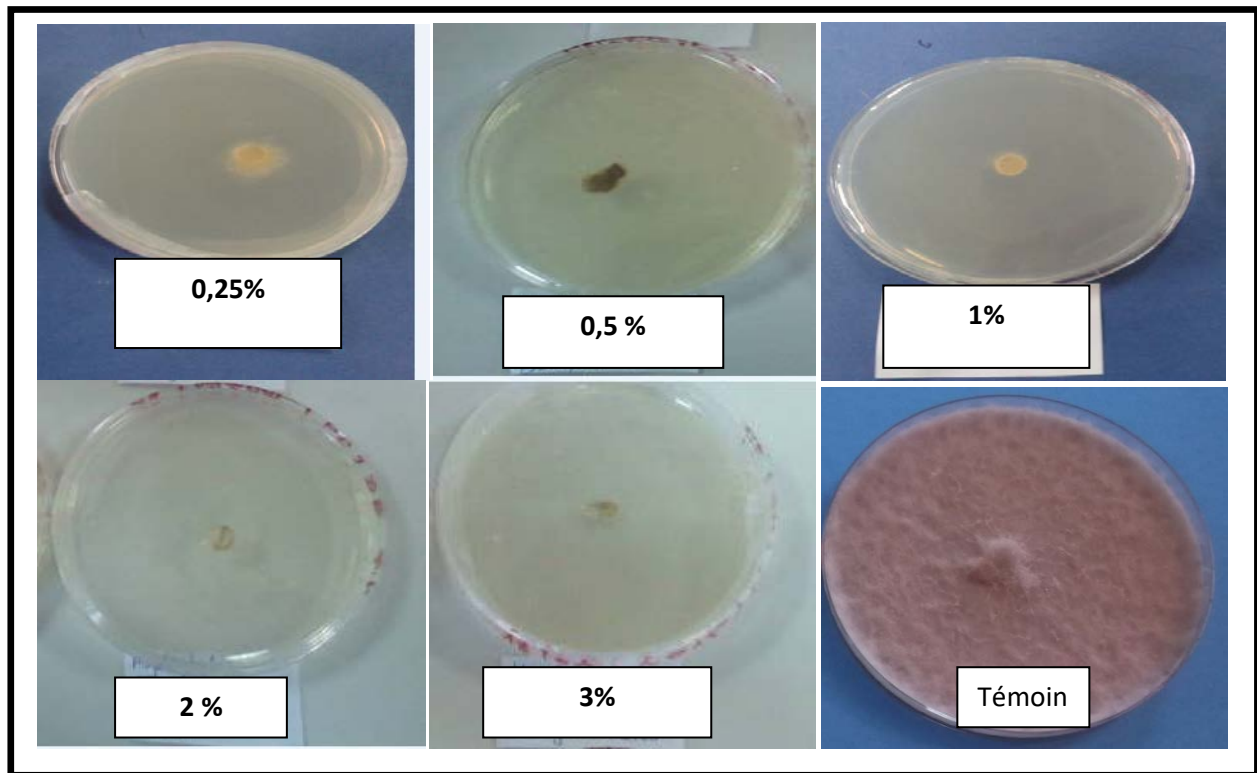
D'après la présence de composés cétoniques, d'acides aliphatiques, d'alcools de monoterpène et sesquiterpènes révèle aux huiles essentielles des espèces de *Ruta* (*chalepensis*, *graveolens* et *montana*) leurs activités antibactériennes et antifongiques (De feo *et al.*, 2002; Oliva *et al.*, 2003; Ivanova *et al.*, 2004).

Dans ce sens, une étude publiée par Valnet (2005) a montré que les composés chimiques ayant une efficacité antibactérienne et antifongique à large spectre sont les phénols, les aldéhydes, les alcools et les cétones terpéniques.

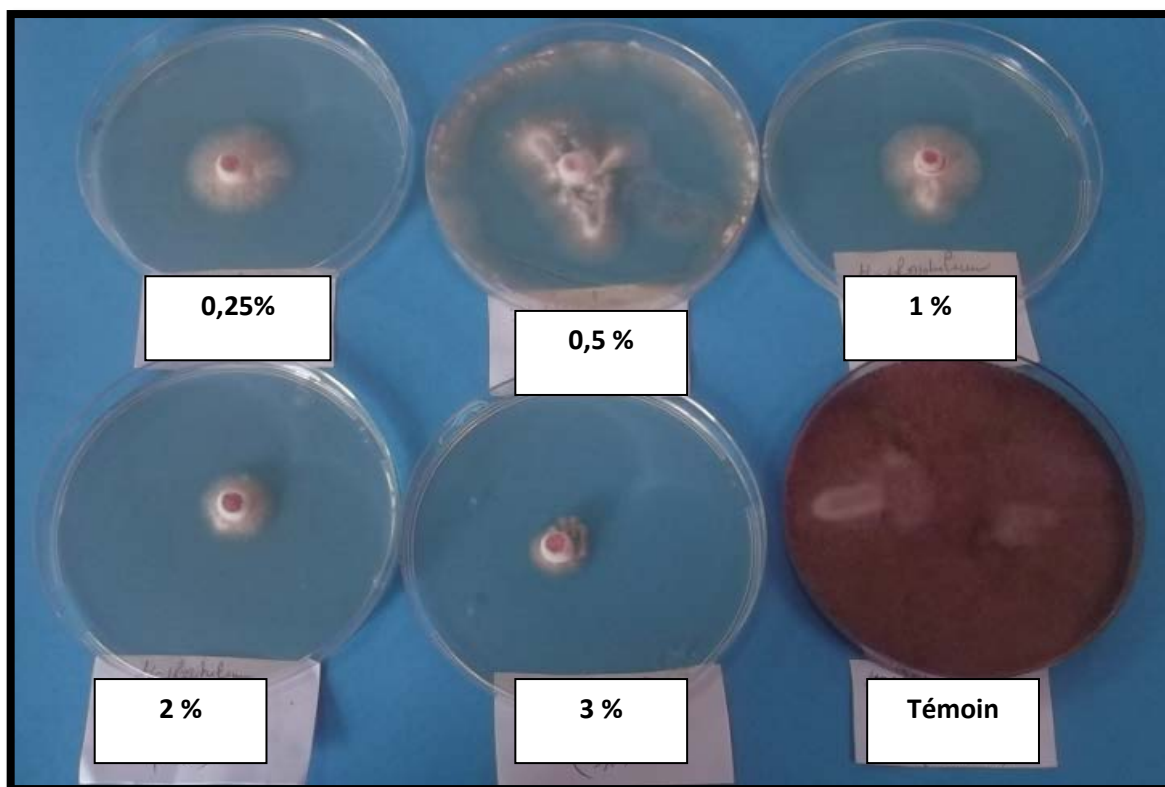
L'activité inhibitrice peut être due aux différents modes d'action de tous les composants de l'huile essentielle sur les champignons. Cette dominance d'activité des huiles essentielles sur celle d'un composant majoritaire confirme bien l'effet de synergie que pourrait apporter les composants minoritaires à l'activité antifongique des huiles essentielles.

Les interactions synergiques entre les différents composés peuvent être à l'origine d'une activité beaucoup plus prononcée que celle prévisible pour les composés majoritaires (Lahlou, 2004).

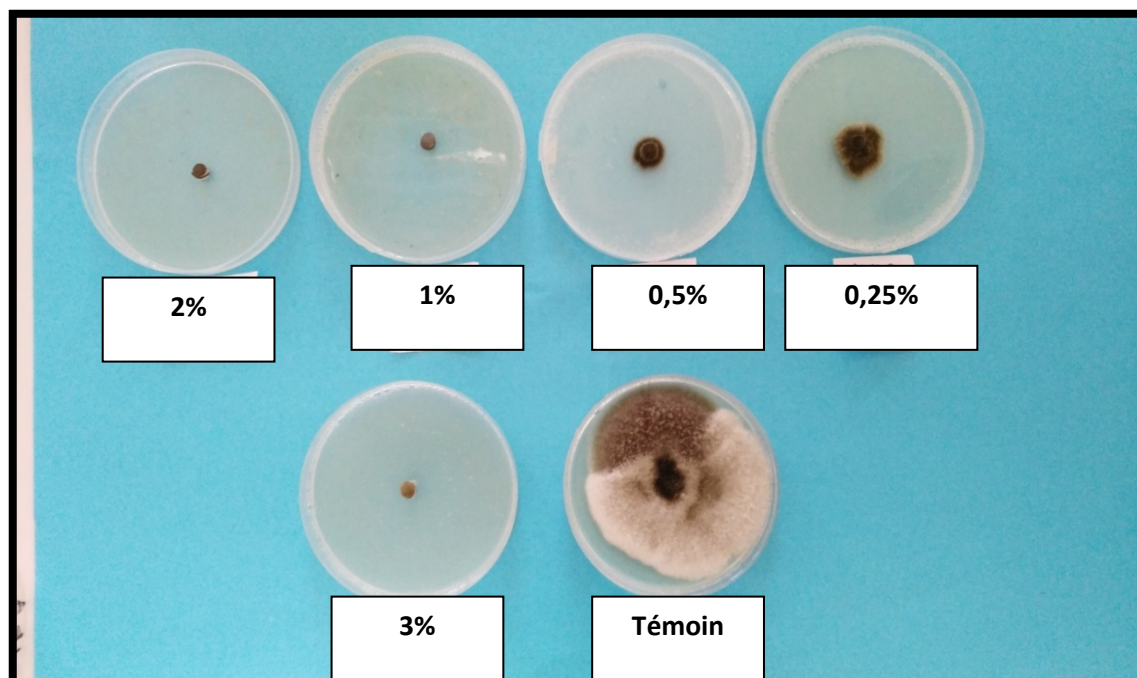
Les travaux de Randrianarivelo et *al.* (2008) ont affirmé que les constituants minoritaires sont également connus pour leur activité anti-microbienne. Les alcools, les aldéhydes et les esters peuvent contribuer à l'effet antimicrobien des huiles essentielles.



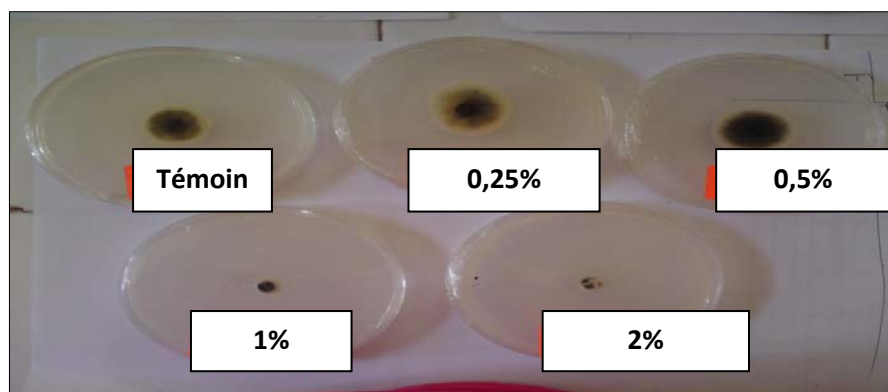
**Figure 73:** Test antifongique des différentes concentrations de l'huile essentielle d'*Haplophyllum tuberculatum* vis-à-vis de *Botrytis cinerea*.



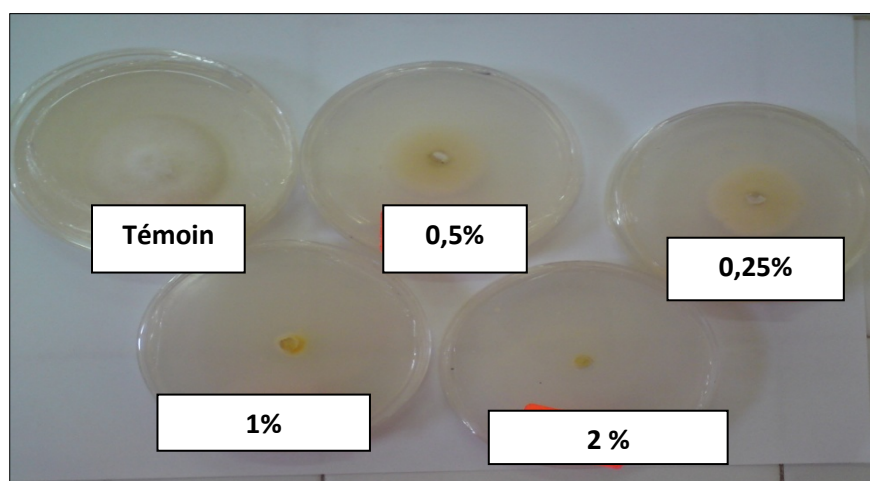
**Figure 74:** Test antifongique des différentes concentrations de l'huile essentielle de *Haplophyllum tuberculatum* vis-à-vis de *FORL*.



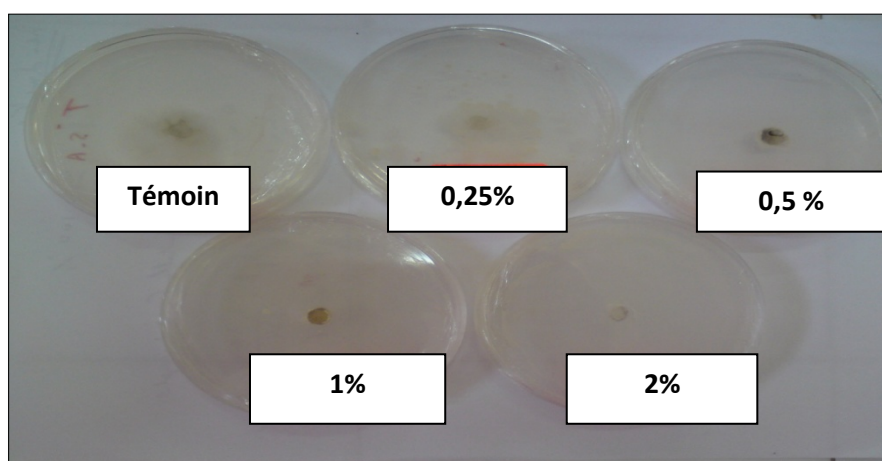
**Figure 75:** Test antifongique des différentes concentrations de l'huile essentielle de *Haplophyllum tuberculatum* vis-à-vis d'*Alternaria solani*



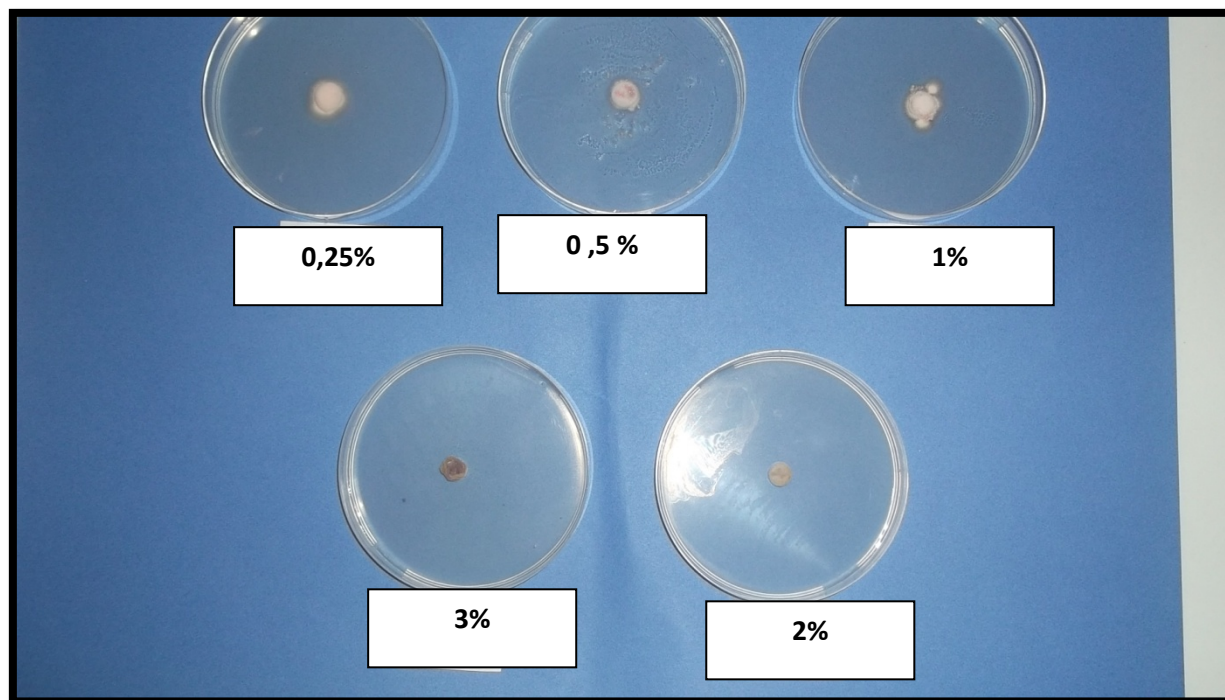
**Figure 76 :** Test antifongique de l'huile essentielle de *Ruta chalepensis* vis-à-vis d'*Alternaria solani*



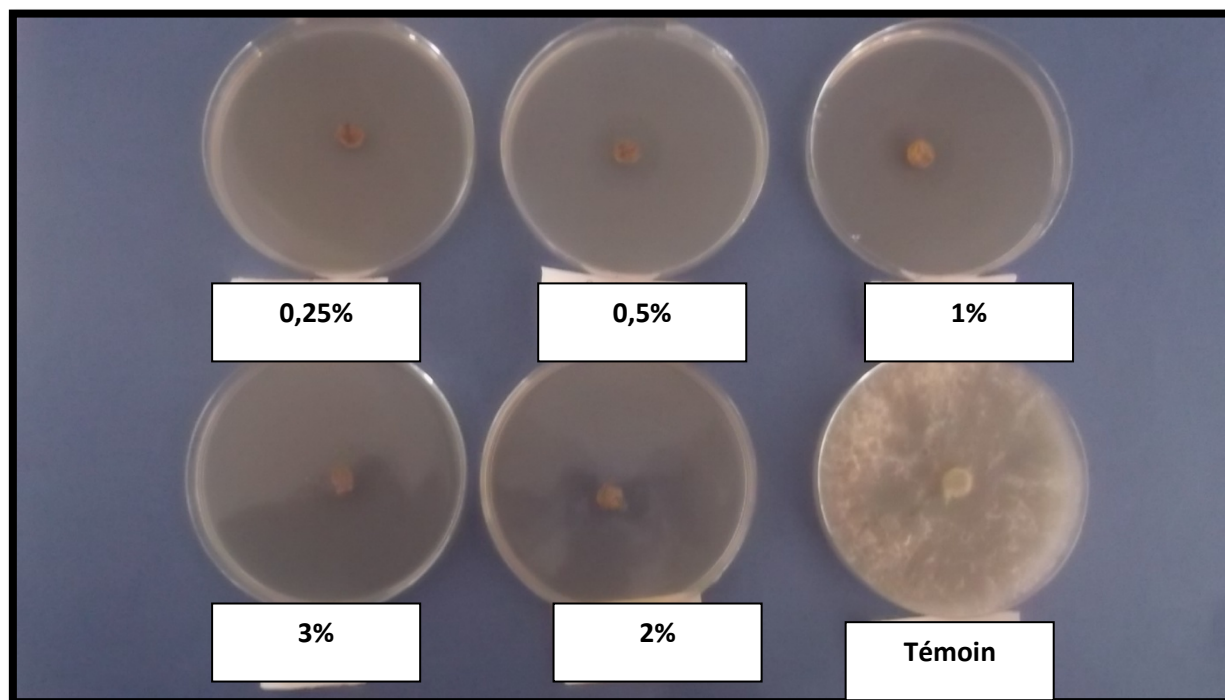
**Figure 77:** Test antifongique de l'huile essentielle de *Ruta chalepensis* vis-à-vis de *FORL*.



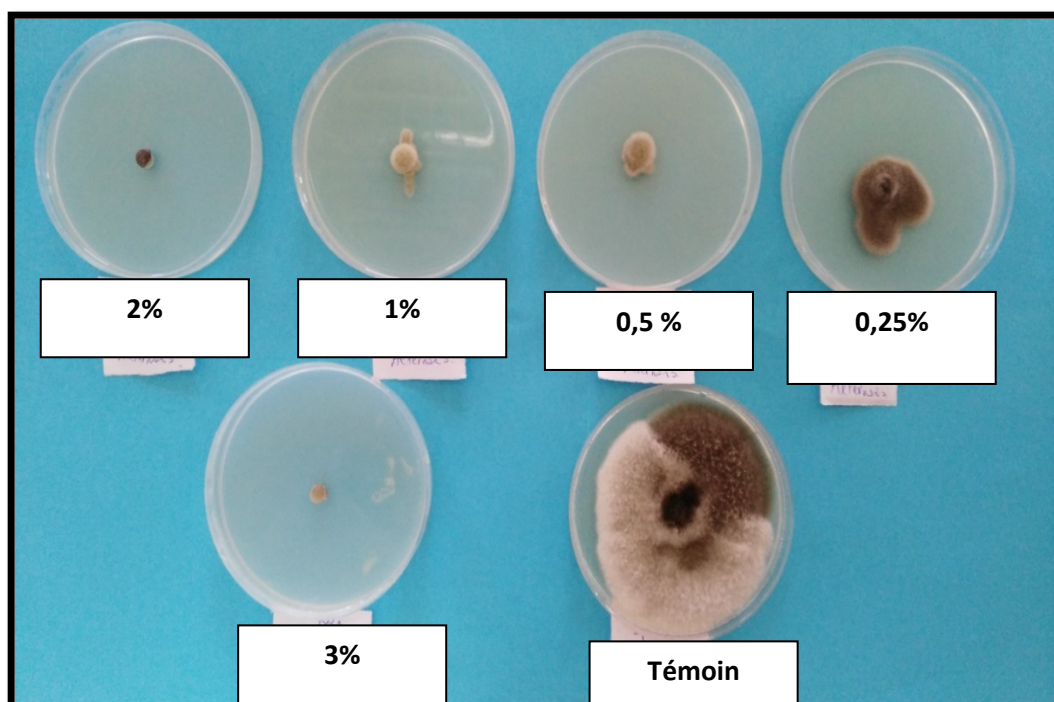
**Figure 78:** Test antifongique de l'huile essentielle de *Ruta chalepensis* vis-à-vis de *Botrytis cinerea*.



**Figure 79:** Test antifongique *in vitro* de l'huile essentielle de *Ruta angustifolia* sur *FORL*.



**Figure 80 :** Test antifongique *in vitro* de l'huile essentielle de *Ruta angustifolia* sur *Botrytis cinerea*.

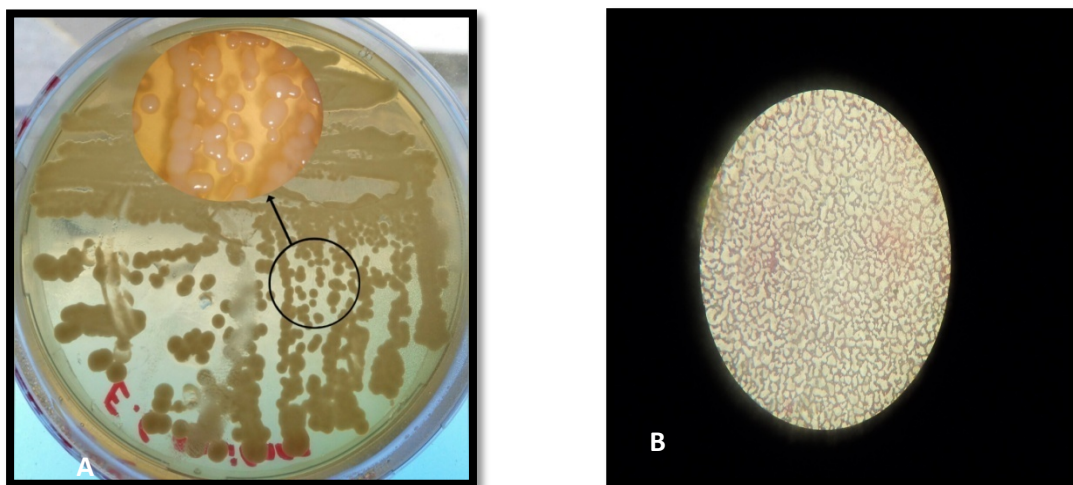


**Figure 81:** Test antifongique *in vitro* de l'huile essentielle de *Ruta angustifolia* sur *Alternaria solani*.

### II-7-3- Activité antibactérienne de l'huile essentielle et de l'extrait méthanoïque des espèces étudiées

#### II-7-3-1- Coloration de Gram et identification biochimique de *Pectubacterium carotovorum*

Les tests biochimiques réalisés pour l'identification macroscopique, microscopique et biochimique de *Pectubacterium carotovorumn* (*Erwinia carotovora*) sont représentés dans la figure 82 et le tableau 18.



**Figure 82 :** *Erwinia carotovora* en culture et en coloration de Gram(X40).

**A:** Aspect macroscopique d' *Erwinia carotovora*.

**B:** Aspect microscopique d' *Erwinia carotovora*

**Tableau 18 : Identification biochimique de *Pectubacterium carotovorum***

ONPG	-
ADH	-
LDC	+
ODC	+
CIT	+
H <sub>2</sub> S	-
Urées	-
TDA	-
IND	-
VP	+
GEL	-
GLU	+
MAN	+
INO	+
SOR	+
RHA	-
SAC	+
MEL	-
AMY	+
ARA	+
OX	-
Catalase	+

### II-7-3-2- Pouvoir antibactérien des huiles essentielles et des extraits méthanoïques des trois espèces contre *Pectubacterium carotovorum* par la méthode des disques

La méthode d'aromatogramme est la technique la plus utilisée pour déterminer l'activité antimicrobienne des extraits. Elle sert à prédire la sensibilité d'un germe aux substances étudiées.

La méthode de diffusion des disques a permis de mettre en évidence le pouvoir antibactérien des huiles essentielles et des extraits méthanoliques des trois espèces *vis-à-vis* d'*Erwinia carotovora*, bactérie phytopatogène qui attaquent les cultures maraichères.

Les résultats de l'activité antibactérienne des deux extraits méthanoliques et huiles essentielles de *R.chalepensis*, *R.angustifolia* et *H.tuberculatum* sont consignés dans le tableau 19.

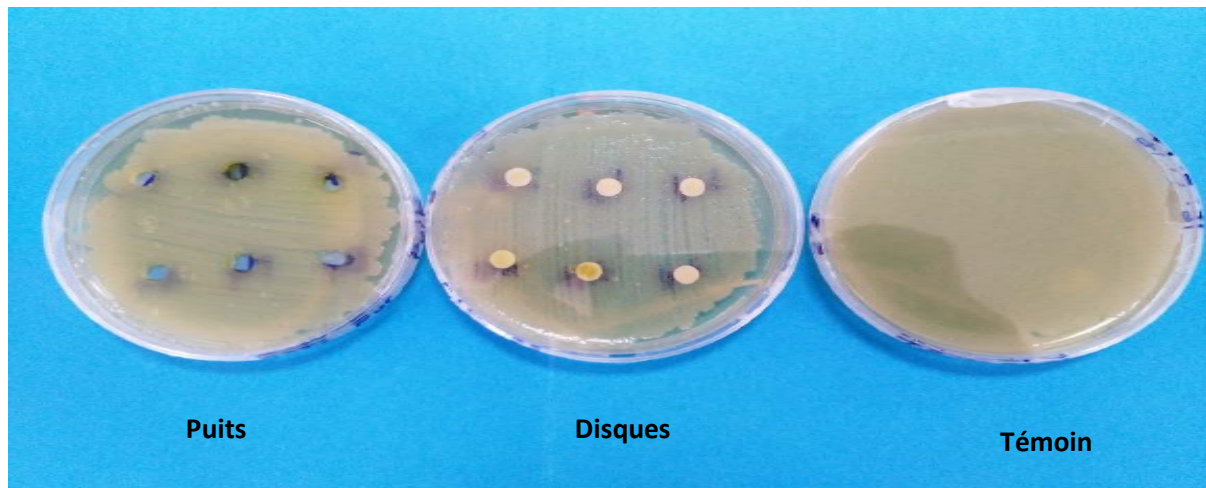
**Tableau 19:** Diamètres des zones d'inhibition en mm (moyenne  $\pm$  écart-type)

Concentrations Espèces	Pure	1/2	1/4	1/8	1/16	DMSO	Témoin
<i>R.chalepensis</i>	15 $\pm$ 0,57	-	-	-	-	-	-
<i>R.angustifolia</i>	-	-	-	-	-	-	-
<i>H.tuberculatum</i>	14 $\pm$ 0,54	-	-			-	-

(-) inhibition ; (+) croissance.

Les six extraits méthanoliques n'ont donnés aucune activité inhibitrice sur la souche phytopatogène d'*Erwinia carotovorar*. Cette dernière a montré une résistance à toutes les concentrations utilisées (pure et diluées) (Fig. 83).

A la suite de cette observation, on pourra dire que les extraits méthanoliques des trois plantes ne contiennent pas d'agents antibactériens. L'absence d'anneau d'inhibition prouve que la bactérie est hautement résistante *vis-à-vis* de nos extraits ; la fiabilité de ce résultat a été renforcée par une autre méthode, celle des puits.

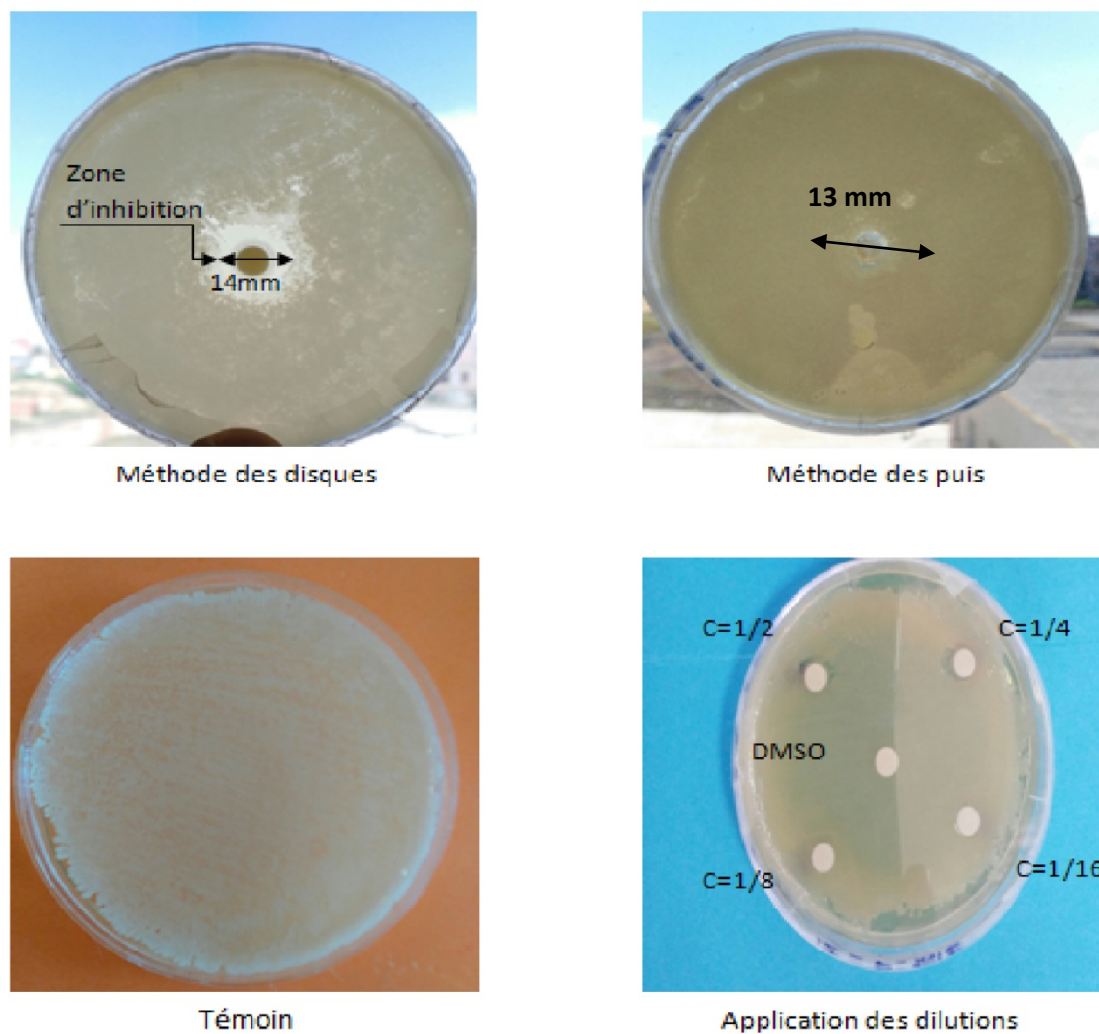


**Figure 83** : Résultats du test antibactérien (disques et puis) obtenus avec les extraits méthanoliques sur la bactérie *Pectobacterium carotovorum*.

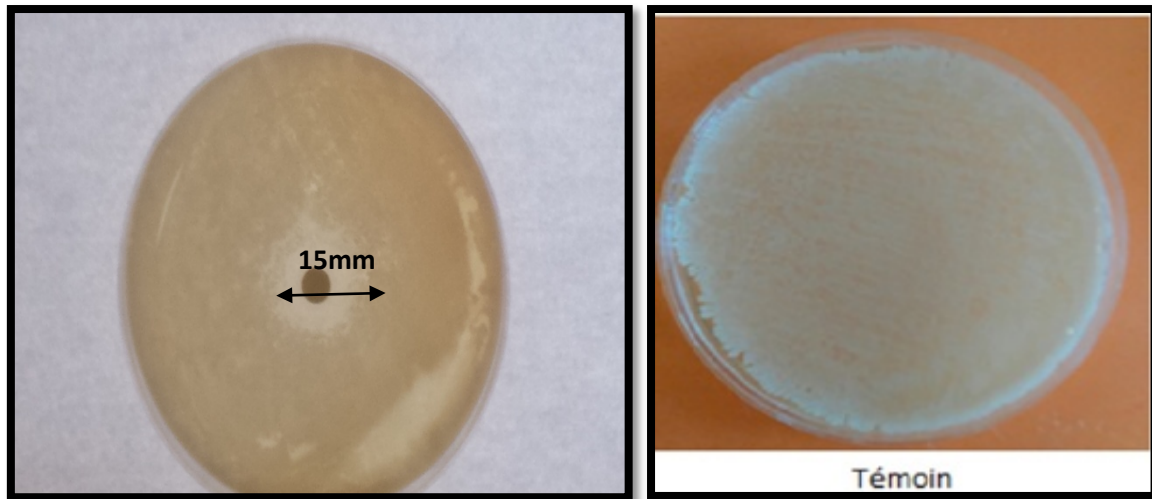
Cette faible efficacité pourrait être aussi due au fait qu'au cours de la période d'incubation quelques composants volatils de l'huile s'évaporent des milieux de culture, ce qui a diminué leurs concentrations, et par la suite leurs activités antibactériennes, ou à l'utilisation du méthanol absolu comme solvant d'extraction, qui été incapable d'extraire de grande concentration de constituants possédant un effet antibactérien.

Les résultats enregistrés sont très loin de ceux indiquées par Ghazghazi et *al.* (2015) qui ont remarqué que l'extrait méthanolique de *R.chalepensis* pour une dose de 15 $\mu$ l exerce une activité antibactérienne importante contre un ensemble de bactéries (gram positif et négatif) avec des zones d'inhibitions variantes entre 8 à 30 mm. En revanche l'huile essentielle de la plante n'a montré aucun effet antibactérien sur toutes les souches testées. On peut expliquer cette divergence par la méthode d'extraction choisie. L'extraction par macération a donné de très bon résultat par rapport à la nôtre.

En revanche, l'huile essentielle d'*H. tuberculatum* et *R .chalepensis* ont agi positivement avec l'huile « pure » provoquant une zone d'inhibition estimée à 14 mm  $\pm$  0,57 et 15 mm  $\pm$  0,17, respectivement (Fig. 84 et 85).



**Figure 84:** Effet inhibiteur de l'huile essentielle d'*Haplophyllium tuberculatum* vis-à-vis d'*Erwinia carotovora*.



**Figure 85:** Effet inhibiteur de l'huile essentielle de *Ruta chalepensis* pure vis-à-vis d'*Erwinia carotovora*.

Selon Moreira *et al.* (2005), la sensibilité aux différentes huiles est classifiée selon le diamètre des zones d'inhibition comme suit : non sensible (-) pour le diamètre moins de 8 mm ; sensible (+) pour un diamètre entre 9-14 mm ; très sensible (+ +) pour un diamètre entre 15-19 mm et extrêmement sensible (+++) pour le diamètre plus que 20 mm

D'après les résultats obtenus, on pourra prédire que l'huile essentielle de *R. chalepensis* et *H. tuberculatum* exerce un effet sensible envers la bactérie testée.

L'activité antimicrobienne de l'huile essentielle a fait l'objet d'un grand nombre de publication à l'échelle internationale (Lambert *et al.*, 2001) ; Kalemba *et al.*, 2003) ; Cecchini *et al.*, 2012 ; Aguiar *et al.*, 2013 ; Rego *et al.*, 2016).

Ces résultats sont difficilement comparables avec ceux de la bibliographie étant donné que très peu d'étude ont été consacré à l'étude des extraits naturels de *Ruta.sp* et surtout sur des bactéries phytopathogènes.

Par contre, ces résultats concordent avec ceux de Nur azfa shuib *et al.* (2015) sur l'extrait méthanolique de *R. angustifolia* vis-à-vis de deux bactéries gram positif : *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* et deux bactéries gram négatif : *Pseudomonas aeruginosa* et *Echerichia coli*.

A une concentration de 1,0 mg / disque, aucune zone d'inhibition n'a été détecté pour l'ensemble des bactéries utilisées pour ce test. Ce résultat est soutenu par Hadouchi *et al.* (2013). En revanche, Mohd Hassan *et al.* (2012) a indiqué que les alcaloïdes extraites de *R.*

*angustifolia* exercent une activité antibactérienne contre les mêmes bactéries avec une concentration minimal inhibitrice situant entre 62,5 et 1000 µg / ml. En outre, Mohd Kamal et al. (2010) a montré que la concentration minimal inhibitrice de *R. angustifolia* était compris entre 0,01 et 0,025 mg / ml. Cependant, les variations des résultats obtenus sont dues essentiellement au solvant choisi et à la méthode d'extraction utilisée. La macération avec du méthanol absolu pourrait éventuellement être incapable d'extraire une grande quantité de principes actifs.

De nombreuses études ont démontré que les huiles essentielles des espèces de *Ruta* figurent parmi les huiles essentielles les moins puissants et qui ont une faible activité antibactérienne (Ben - Bnina et al. (2010) ; Proestos et al. (2006)).

Dans ce sens, une étude publiée par Chibani et al. (2013) a montré que l'huile essentielle de *R.angustifolia* exerce un effet antibactérien *vis-à-vis* d'*E.coli* (bactérie Gram négatif) avec une CMI estimé à 20µg/ml.

Les résultats de l'activité antibactérienne des huiles essentielles des espèces de *Ruta* ont montré une variation entre les trois espèces étudiées. L'huile essentielle de *H. tuberculatum* et *R. chalepensis* à l'état pur s'est montrée plus efficace que celui de *R. angustifolia* (Fig. 62 et 63).

Dans une étude réalisée par Hadouchi et al. (2013) sur quatre espèces de *Ruta* : *R. chalepensis* var. *bracteosa*, *R. graveolens*, *R. angustifolia* et *H. tuberculatum*, indique que l'huile essentielle des espèces a montré une faible activité antibactérienne contre douze bactéries. Les résultats obtenus montrent aussi une variation on fonction des espèces utilisées. A 10 µl/disque, l'huile essentielle de *H. tuberculatum* s'est montré le plus résistant par rapport aux autres espèces, alors que *R. chalepensis* a montré une zone d'inhibition estimée à 17 mm. Ce résultat est probablement dû à la présence de 95,63 % de cétones dans l'huile totale. La nature antibactérienne modeste qui a été signalé chez *R. graveolens* et *R. chalepensis* était apparemment lié à la présence d'hydrocarbures monoterpéniques. Alors que pour *H. tuberculatum*, elle est peut être liée à la présence des monoterpènes et des alcools monoterpéniques.

Selon Georgantelis et al. (2007), la variation de la composition chimique explique donc les variations observées dans l'activité antimicrobienne des extraits d'une même plante ou de plantes différentes.

De même Oussalah et *al.* (2006) ont montré que l'activité biologique d'une huile essentielle est à mettre en relation avec sa composition chimique, les groupes fonctionnels des composés majoritaires (alcools, phénols, aldéhydes).

Plusieurs travaux ont démontré que les huiles essentielles sont reconnues par leurs composants naturels, comme les mono terpènes, diterpènes et les hydrocarbures avec des groupes fonctionnels divers. De nombreux composés qui entrent dans la composition des huiles essentielles sont souvent cités comme des composants naturels responsables de l'activité antibactérienne comme le cas d'*Haplophyllium tuberculatum* ou les alcools mono terpéniques (40.79 %) sont responsables de la plupart des activités antimicrobiennes (Hadouchi et *al.*, 2013).

Cette activité antimicrobienne observée pour les huiles essentielles de l'espèce étudiée peut être attribuée à leurs composés majoritaires. Il a été rapportés que les alcools terpéniques sont particulièrement actifs contre les cellules microbiennes, car ils sont solubles dans les milieux aqueux et provoquent d'importants dégâts sur les parois cellulaires des microorganismes. Les alcools possèdent une activité microbicide plutôt que microbiostatique (Hammer et *al.*, 2003).

Ferhat et *al.* (2014) affirment que le 2-undécanone, constituant majeur de l'huile essentielle de *Ruta chalepensis* possède une forte activité antibactérienne. Alors que Alina et *al.* (2010) démontrent qu'aucun effet n'est obtenu par l'utilisation de l'huile essentielle de *R. chalepensis* sur *Escherichia coli* ou sur *Klebsiella pneumoniae*

Plusieurs travaux mettent en évidence la grande sensibilité des bactéries Gram positif par rapport aux bactéries Gram négatif (Turkmen et *al.*, 2007 ; Hayouni et *al.*, 2007 ; Falleh et *al.*, 2008). Cela peut s'attribuer à la différence dans les couches externes des bactéries Gram- par rapport aux bactéries Gram+. En effet, les bactéries Gram- possèdent une couche additionnelle qui est la membrane externe, composée de phospholipides, de protéines et de lipopolysaccharides, formant une barrière imperméable à la plupart des molécules hydrophobes (Georgantelis et *al.*, 2007).

Selon Caillet et Lacroix. (2007), les huiles essentielles possèdent plusieurs modes d'action sur les différentes souches de bactéries, mais d'une manière générale leur action se déroule en trois phases :

- Attaque de la paroi bactérienne par l'huile essentielle, provoquant une augmentation de la perméabilité puis la perte des constituants cellulaires.

- Acidification de l'intérieur de la cellule, bloquant la production de l'énergie cellulaire et la synthèse des composants de structure.
- Destruction du matériel génétique, conduisant à la mort de la bactérie.

Cette activité antibactérienne de l'extrait pur pourrait être expliquée également par l'interaction moléculaire des groupements fonctionnels des composants des huiles essentielles avec la paroi des bactéries ce qui provoque de profondes lésions. Cette activité peut être donc le résultat d'un effet synergique entre plusieurs composés de cette huile essentielle (Delaquis *et al.*, 2002 ; Viuda-Martos *et al.*, 2008).

CONCLUSION  
ET  
PERSPECTIVES

## Conclusion

A travers ce travail et d'après les résultats obtenus, on pourra conclure que *Ruta chalepensis*, *Ruta angustifolia* et *Haplophyllum tuberculatum* sont des plantes prometteuses, elles présentent une richesse importante en métabolites secondaires et renferment une variété de molécules biologiquement actives.

L'analyse qualitative réalisée par les réactions de caractérisation a permis de mettre en évidence la présence des polyphénols totaux, coumarines, alcaloïdes, flavonoïdes, tannins et sucres réducteurs. Ces tests ont également décelé une réaction sensible à la présence des saponosides et une absence totale des anthocyanes dans les tiges et les feuilles des trois espèces étudiées. Alors que l'analyse quantitative des phénols totaux, flavonoïdes totaux effectuée par un dosage spectrophotométrique a dévoilé que *Ruta chalepensis* et *Ruta angustifolia* contiennent une quantité beaucoup plus importante comparativement à *Haplophyllum tuberculatum* et que l'extrait issu des feuilles est relativement le plus riche que celui des tiges.

Les résultats du piégeage du radical libre DPPH ont dévoilé le pouvoir antioxydant des extraits méthanoliques des feuilles de *R. angustifolia* et *R. chalepensis*.

Les résultats enregistrés par l'analyse de chromatographie liquide à haute performance couplée à la spectrométrie de masse (UPLC/ MS) confirment la capacité des organes végétatifs à synthétiser des furocoumarines en quantités importantes et variable. La quantité des coumarines et furocoumarines repérées dans les deux espèces : *R.chalepensis* et *R.angustifolia* est impressionnante. C'est la première fois que l'on détecte autant de molécules dans ces types de plantes. Les principaux composants sont : psoralène, xanthotoxine, bergaptène, isoimperatorine, Epoxybergaptène, 6 - 7 DHB. *H.tuberculatum* semble contenir une quantité moins importante en coumarine et furocoumarines par rapport aux deux autres espèces de la rue.

L'identification chimique de l'huile essentielle par GC-MS a montré la présence des produits majoritaires : Pipéritone (13,35 %), Germacrène-B (12,30%) et Béta-Phellandrène (5,05%) pour *H.tuberculatum* et le 2-Undécanone (35,38 %, 45,49%) et le 2-Nonanone (20,11 %, 22,29 %) respectivement pour *R. chalepensis* et *R. angustifolia*.

Grâce à sa richesse en composés cétonique, sesquitérpènes et en monoterpènes l'huile essentielle des trois plantes s'est avérée un agent antifongique efficace contre les trois

champignons testés (*FORL*, *Alternaria solan* et *Botrytis cinerea*). La meilleure activité fongicide, à l'encontre de *Botrytis cinerea*, a été obtenue en utilisant l'extrait méthanolique pour toutes les concentrations utilisées et à la concentration de 20mg/ml pour l'huile essentielle et ceci en face des trois espèces étudiées.

Cette activité antifongique peut être attribuée à la prédominance de la rutine qui a été détecté par UPLC / MS dans les tiges et les feuilles de *R. angustifolia* et *R. chalepensis*. Si l'on se fonde sur ce résultat, on pourrait dire que ces plantes constituent une des sources naturelles de substances antifongiques d'importance élevée.

L'activité larvicide de l'huile essentielle des deux plantes vis-à-vis de *Tuta absoluta* a montré que l'huile essentielle avec une concentration de 10µl/ml a permis l'élimination partiel des larves par dessèchement de celles ci avec un taux de mortalité corrigée de 55 % pour *Haplophyllum tuberculatum* et 40 % pour *Ruta chalepensis*. Les doses létales pour 50 % de la population d'insecte calculée par la méthode de Probit est d'environ 3,765 µ/ml pour *Ruta chalepensis* et 4,7 µl /ml pour *Haplophyllum tuberculatum*.

En revanche, Les extraits méthanoliques des trois espèces n'ont révélé aucun effet bactérien pour toutes les doses utilisées, tandis que l'huile essentielle de *R. chalepensis* et *H. tuberculatum* à l'état pur (100 %) a montré un effet antibactérien contre *Pectubacterium carotovorum* estimé à  $(13 \pm 0,57)$  et  $(13,33 \pm 0,57)$ , respectivement.

Certains résultats nous paraissent intéressants et méritent d'être poursuivis par des études plus fines et plus approfondis.

En perspectives, il serait donc intéressant de :

- Réaliser un fractionnement de l'extrait méthanolique afin d'identifier les molécules responsables de l'activité biologique en utilisant des techniques d'identification plus performantes.
- Evaluer l'activité antioxydante par d'autres méthodes (FRAP, DPPH et ABTS, afin de comparer les résultats et déduire la méthode la plus fiable.
- Tester l'activité antifongique, antibactérienne, *in vitro* et *in vivo* avec des molécules bioactives purifiées.
- Elargir les groupes des champignons et des bactéries phytopathogènes qui attaquent la tomate afin de vérifier l'effet des extraits sur d'autres agents pathogènes.

- Approfondir ces résultats par une recherche moléculaire à fin de mieux maîtrisé la prolifération des bactéries ou des champignons phytopathogènes qui attaquent la tomate.

RÉFÉRENCES  
BIBLIOGRAPHIQUES

**Abbas, A., Betul, D., Hulya, T. K., Ulrich, R. B., Maia, T., David, E. Wedge. Ikhlas, A. Khan., KemaL, H.C .B., Nurhayat, T. 2013.** Biting Deterrence, Repellency, and Larvicidal Activity of *Ruta chalepensis* (Sapindales: Rutaceae) Essential Oil and Its Major Individual Constituents against Mosquitoes. Entomological Society of America, 50:6.

**Abouda, L.R.N., Seri Kouassi, B.P., Koua, H.K. 2010.** Insecticidal Activity of Essential Oils from Three Aromatic Plants on *Callosobruchus Maculatus* F. in Côte D'ivoire. Eur J Sci Res, 39(2):243-250.

**Abou-Zeid, H.M., Bidak, L.M., Goh,Y.M., 2014.** Phytochemical screening and antimicrobial activities of some wild medicinal plants of the western mediterranean coastal region Egypt. International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research. 5(10): 4445-4455.

**Abu-Darwish, M.S. and Abu-Dieyeh, Z.H.M., 2009.** Essential oil content and heavy metals composition of *Thymus vulgaris* cultivated in various climatic regions of Jordan. Int. J. Agric. Biol, 11:59-63.

**Adams, R.P.2007.** Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Mass Spectroscopy, Edition. Allured Publishing Corporation, France.

**AFNOR ,2000.** Recueil de normes : les huiles essentielles. Tome 1. Echantillonnage et méthodes d'analyse. AFNOR, Paris, 440 p.

**Afnor, 1982.** Recueil de normes françaises des produits dérivés des fruits et légumes jus de fruits. Ed. AFNOR, 325 p.

**AFNOR, 1988** .Association Française de normalisation : Huiles essentielles. Recueil des normes françaises, 3<sup>eme</sup> édition AFNOR, Paris.

**AFNOR. 2000.** Recueil de normes : les huiles essentielles : Monographies relatives aux huiles essentielles, Tome 2, AFNOR, Paris, 661-663p.

**Álvarez Cruz, N.S., 2011.** *Haplophyllum tuberculatum* (Forssk.) A.Juss. [Internet] Fiche de PROTA4U. Schmelzer, G.H. & Gurib-Fakim, A. (Editeurs). PROTA (Plant Resources of Tropical Africa / Ressources végétales de l'Afrique tropicale), Wageningen, Pays Bas. <<http://www.prota4u.org/search.asp>>. Visité le 6 août 2017.

**Aguiar, G.P., Carvalho, C.E.,Dias, H.J.,Reis, E.B.,Martins, M.H., Wakabayashi, K.A., Groppo, M., Martins, C.H., Cunha, W.R., Crotti, A.E. 2013.**Antimicrobial activity of selected essential oils against cariogenic bacteria. Nat Prod Res, 27 : 1668–1672.

**Ajouz, S. 2009.**Estimation du potentiel de résistance de *Botrytis cinerea* à des biofongicides. Thèse Pour l'obtention du Grade de docteur de l'université d'AVIGNON et des pays de VAUCLUSE.

**Akhtar, K.P., M, Matin, J.H., Mirza, A.S. Shakir and M. Rafique, 1994.** Some studies on the post harvest diseases of tomato fruits and their chemical control. Pak. J. Phytopathol, 6: 125-129.

**Akkaria,H., Ezzineb,O., Dhahrib,S., B'chirc,F., Rekikd,M., Hajajia,S., Darghoutha,M.A., Ben Jamâab, M.L., Gharbi,M.2015.** Chemical composition, insecticidal and in vitro anthelmintic activities of *Ruta chalepensis* (Rutaceae) essential oil. Industrial Crops and Products ,74 :745–751.

**Al-Brashdi,A.S., Al-Ariymi,H., Al Hashmi,M., Khan,S.A.2016.** Evaluation of antioxidant potential, total phenolic content and phytochemical screening of aerial parts of a folkloric medicine, *Haplophyllum tuberculatum* (Forssk) A. Juss. Journal of Coastal Life Medicine, 4(4): 315-319

**Al-Burtamani, S.K.S., Fatope ,M.O., Marwah,R.G., Onifade, A.K. et Al Saidi ,S.H., 2005.** Chemical composition, antibacterial and antifungal activities of the essential oil of *Haplophyllum tuberculatum* from Oman. Journal of Ethno pharmacology, 96: 107-112.

**Alfonso, V., Munoz, R., Gonzalez Garcia, R. 2001.** Molecular wine microbiology, Amsterdam; Boston, Elsevier.

**Ali Bouzidi1, M., Latrèche1, A., Attaoui1, I., Benabderrahmane, M., Mehdadi1, Z and Benyahia, M.2012.** Antibacterial Effect of the Essential Oils Extracted from *Ruta chalepensis* L. and *Ruta montana* L. Journal of Life Sciences, 6 : 898-902

**Ali, A., Demirci,B., Tuba Kiyan, H, Ulrich ,R. , Bernier., David, E. Ikhlas, A. Khan, Kemal Husnu., Can Baser, and Tabanca,N.2013.** Biting deterrence, repellency, and larvicidal activity of *Ruta chalepensis* (Sapindales: Rutaceae) essential oil and its major individual constituents against mosquitoes. Journal of Medical Entomology, 50 (6):1267-1274.

**Alim, Y. 2008.** Les champs de tomates décimés par une maladie. El Watan. Disponible sur Internet (2/12/08) [[algerie-infos-actualites.com/articles-109020.html](http://algerie-infos-actualites.com/articles-109020.html)].

**Alilou, H.2012.** Etude phytochimique et antifongique de deux plantes du Sud du Maroc : *Asteriscus graveolens subsp. odorus* (Schousb.) Greuter et *Asteriscus imbricatus* (Cav.) DC. Thèse de doctorat. Université Ibn Zohra (Agadir, Maroc), PP88.

**Al-Rehaily, A.J.,Yusufoglu, H.S., Al-Yahya, M.A., Demirci, B., Wedge, D.E., Tabanca, N., Demirci, F., Bernie, U.R. R., Becnel ,J.J., Temel ,H.E., Başer, K.H.C. 2013.** Chemical Composition and Biological Activity of *Haplophyllum tuberculatum* Juss. Essential Oil. Journal of Essential Oil Bearing Plants, 79:48.

**Al-Said,M.S., Al-Yahya. M.A.,T.Ginnawi, A.O., Ageel,A.M. 1990.** Studies on *Ruta chalepensis*, an ancient medicinal herb still used in traditional medicine. Journal of Ethnopharmacology, 28(3): 305-312.

**Altieri, M.A., Nicholls, C.I., Fritz, M.A., 2005.** Manage insects on your farm: a guide to ecological strategies. Sustainable Agriculture Network, Beltsville, MD.

**Alyafi Alzhri ,G. 2007.**Determination of chemical composition of Prangos and the possibility to use in the applied field, Damascus University, P 54.

**Alzhri, G.A.2007.**Determination of chemical composition of Prangos and the possibility to use in the applied field, Damascus University, P 54.

**Alzoreky ,N .,Nakahara ,K.2003.** Antibacterial activity of extracts from some edible plants commonly consumed in Asia. International Journal of Food Microbiology ,80 :223–230.

**Andersen, Q.M., Markham, K.R.2006.** Flavonoides, chemistry, biochemistry and application. Boca Raton, FL:CRC Press, Taylor and Francis.

**Angiosperme Phylogyny Group .1998.** Classification for the orders and families of flowering plants. Botanical journal of the linnean society, 4(19): 20-23.

**Angiosperm Phylogeny Group .2003.** An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG II. Botanical Journal of the Linnean Society, 141: 399-436.

**Aouadhi , C.H., Ghazghazi , H., Hamrouni , S ., Hasnaoui , B., Maaroufi, A.2013.** *In Vitro* Antifungal Activity of the Essential Oil and the Methanolic Extract of *Ruta Chalepensis*. Arch Inst Pasteur Tunis, 90 (1-4): 39-46

**Aprotosoae ,A.C., Spac, A.D., Hancianu, M., Miron ,A., Tanasescu, V.F., Dorneanu ,V. and Stanescu, U., 2010.** The chemical profile of essential oils obtained from fennel fruits(*Foeniculum vulgare* Mill.). *Farmacia*, 58 (1):46-54.

**Arif ,A . , Jawed ,E . ,Al-Khateeb ,E .,Al-Shamma, A. 2005.** Qualitative and quantitative investigation of furocoumarin derivatives (Psoralens) of *Haplophyllum tuberculatum* (Rutaceae). *Almustansirya journal of Pharmaceutical sciences*. 2:2.

**Armstrong, G. M., Armstrong, J. K. 1965.** Further studies on the pathogenicity of three forms of *Fusarium oxysporum* causing wilt on alfalfa. *Plant Disease Reports*, 49: 412-416.

**Atmani, D., Chaher, N., Berboucha, M., Ayouni, K., Lounis, H., Boudaoud, H., Debbache, N., Atmani, D. 2009.** Antioxidant capacity and phenol content of selected Algerian medicinal plants. *Food Chem*, 112: 303–309.

**Atmani, D., Chaher, N., Berboucha, M., Ayouni, K., Lounis, H., Boudaoud, H., Debbache, N., Atmani, D. 2009.** Antioxidant capacity and phenol content of selected Algerian medicinal plants. *Food Chem*, 112: 303–309.

**Attou, A.2011.** Contribution à l'étude phytochimique et activités biologiques des extraits de la plante *Ruta chalepensis* (*Fidjel*) de la région d'Ain Témouchent. Mémoire en vue de

l'obtention du diplôme de magister en biologie .Option : « Produits naturels : Activités biologiques et synthèses». *Universite ABOU BEKR BELKAID (TLEMCEM)*.

**Audigié, C.I., Dupont, G., Zonszain, F. 1985.** Principe des méthodes d'analyse biochimique. Edition Doin. Collection : Biosciences et techniques(Paris), 190 p.

**Avlessi, F., Alitonou, G.A., Djenontin, T S., Tchobo, F., Yèhouéno, B., Menut, C. & Sohounhloué ,D. 2012.** Chemical composition and Biological activities of the Essential oil extracted from the Fresh leaves of *Chromolaena odorata* (L.) Robinsongrowing in Benin. *Journal of Biological Sciences*, 1(3): 7-13.

**Baba Aissa,F. 2000.** Encyclopédie des plantes utiles. Edition. Librairie moderne, N°91 (Rouïba, Alger).

**Babu Kasimala, M., Tukue, M. 2014.**Phytochemical screening and antibacterial activity of two common terrestrial medicinal plants *Ruta chalepensis* & *Rumex nervosus*. *Carib.j.SciTech*, 2: 634-641.

**Babu Kasimala, M., Tukue, M.2014.** Phytochemical screening and antibacterial activity of two common terrestrial medicinal plants *Ruta chalepensis* & *Rumex nervosus*. *Carib.j.SciTech*, 2: 634-641.

**Badaoui, M.I., Berkani, A., Lotmani, B.2010.** Les entomopathogènes autochtones, nouvel espoir dans le contrôle biologique de *Tuta absoluta* Meyrick 1917 (Lepidoptera: Gelechiidae) en Algérie.*Entomologie faunistique*.63 :3.

**Badaoui, M.I., Berkani, A.2008.**La mineuse de la tomate *Tuta absoluta* Meryrick (Lepidoptera : Gelechiidae). *Annales de l'Institut National de la Recherche Agronomique d'Algérie*.

**Bagchi, G.D., Dwivedi, P.D., Singh, A., Haider, F., Naqvi, A.A. 2003.** Variations in essential oil constituents at different growth stages of *Ruta chalepensis* on cultivation at North Indian plains. *J Essent Oil Res*, 9: 365–6.

**Baghlaf, A. O., EL – Beih,S. K. A. , EL Tawil, B. A. H. 1983.**Consituents of local plants .Part 15:Study of volatile oil of Saudi *Ruta chalepensis* L. *Herba Hung*, 22(1):39 - 41.

**Bajpai, V.K., Kang, S.C. 2010.** Antifungal activity of leaf essential oil and extracts of *Metasequoia glyptostroboides* Miki ex Hu. *J. Am. Oil. Chem. Soc*, 87: 327-336.

**Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D. and Idaomar, M. 2008.** Biological effects of essential oils- a review. *Food Chem Toxicol*, 46 : 446-475.

**Balasundram, N., Sundram, K. et Samman, S. 2006.** Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food Chemistry*. 99:191–203.

**Bang, K.H., Lee, D.W., Park, H.M. , Rhee, Y.H., 2000.** Inhibition of fungal cell wall synthesizing enzymes by trans-cinnamaldehyde. *Biosci. Biotechnol. Biochem*. 64: 1061-1063.

**Barrata, T., Dorman, D., Deans, S., Figueiredo, C., Barroso, J. & Ruberto, G. 1998.** Antimicrobial and antioxidant properties of some commercial essential oils. *Flavour and Fragrance Journal*.13:235-244.

**De Bary, A. 1866.** Morphologie und Physiologie der Pilze, Flechten und Myxomyceten. Engelmann, Leipzig.

**Baser, K. H. C., Özek, T., Beis, S. H. 1994.** The essential oil of *Origanum vulgare* of Turkish origin. *J. Essent. Oil Res*, 8: 413 - 414.

**Basil, A., Jimenez-carmonna, M. M. & Clifford, A.A. 1998.** Extraction of rosemary by super heated water. *Journal of food chemistry*.46:5205-5209.

**Bauske, E.M., Rodriguez-Kabana, R., Estaun, V., Kloepper, J.W., Robertson, D.G., 1994.** Management of *Meloidogyne incognita* on cotton by use of botanical aromatic compounds. *Nematropica*, 24: 143-150.

**Bego, G.V. 2003.** Connaître l'essentiel sur les huiles essentielles. Ed. MDB.

**Bekro, Y., A., Bekro, J. A. M., Boua, B.B., 2007.** Study ethnobotanical and phytochemical screening of *Caesalpinia benthamiana* (Baill.) Herend and Zarucchi (Caesalpiniaceae). *Sci. Nat*, 4 (2):217-225.

**Belyagoubi, L. 2006.** Effet de quelques essences végétales sur la croissance des moisissures de détérioration des céréales. Mémoire de magister. Université Abou Bekr Belkaid, 110p.

**Ben-Bnina, E., Hammami, S., Daamii-remadi, M., Ben-Jannet, H., & Mighri, Z. 2010.** Chemical composition and antimicrobial effects of Tunisian *Ruta chalepensis* L. essential oils. *Journal de la Société Chimique de Tunisie*, 12 :1-9.

**Benchelah, A.C., Bouziane, H., Maka, M., Ouahés, C. 2000.** Fleurs du Sahara voyage ethnobotanique avec les touaregs du tassili, Edition Atlantica ( France).

**Bendriss, H. 2003.** Valorisation des plantes aromatiques et médicinales de : *Ruta chalepensis* et *Marrubium vulgare*. Mémoire de Magister. Université Hassiba Ben Bou Ali, Chelf (Algérie).

**Beniston, W. S. 1984.** Fleurs D'Algérie. Entreprise nationale du livre (Alger).

**Bentabet, N., Boucherit-Otmani, Z., Boucherit, K., 2007.** Composition chimique et activité antioxydante d'extraits organiques des racines de *Fredolia aretioides* de la région de Béchar en Algérie. *Phytothérapie Journal*, 12 :364-371.

**Bentabet, N., Boucherit-Otmani, Z., Boucherit, K. 2007.** Composition chimique et activité antioxydante d'extraits organiques des racines de *Fredolia aretioides* de la région de Béchar en Algérie. *Phytothérapie Journal*. 12, 364-371.

- Bernadet, M., Binet, C., De Smedt, D. 1989.** Guide des médecines douces. Edit. Mourite .
- Berkani, A., Badaoui, M.I. 2008.** La mineuse de la tomate *Tuta absoluta* Meyrick 1917 (Lepidoptera: Gelechiidae). Annales de l'Institut National de la Recherche Agronomique d'Algérie, 16 p.
- Bertrand ,C., Andreu, V. 2013.** Colloque Intrants Naturels Université de Perpignan Via Domitia. Journées Substances Naturelles en Protection des Cultures. Réglementation, expérimentation, usages, Paris.
- Bertrand, C., Andreu, V. 2013.** Colloque Intrants Naturels. Journées Substances Naturelles en Protection des Cultures. Réglementation, expérimentation, usages. Université de Perpignan Via Domitia (Paris).
- Besombes, C.2008.** Contribution à l'étude des phénomènes d'extraction hydrothermomécanique d'herbes aromatiques. Applications généralisées. Thèse de Doctorat., Université de la Rochelle. p : 41-45.
- Bettaieb, A., Moujahed, N., Ksouri, R., 2012.** Secondary compounds characterization in some autochthonous species from a North-Eastern region of Tunisia. Options méditerranéennes: New approaches for grassland research in a context of climate and socio-economic changes Series A. Séminaires Méditerranéens n° 102, Samsun (Turkey).
- Bicchi, C., Liberto, E., Matteodo, M., Sgorbini, B., Mondello, L., Acompara, Z. B., Costa, R., Rubiolo, P. 2008.** Quantitative analysis of essential oils: a complex task. *Flavour Fragr. J.*, 23 : 382-391.
- Blancard, B., Laterrot, H., Marchoux, G., Candresse, T. 2009.** Les maladies de la tomate, identifier, connaitre, maîtriser. Edition Quae, INRA, Versailles. France.
- Blancard, D., Sorel, M., Fermaud, M. 2013.** *Moisissure grise (Botrytis cinerea) : Biologie, épidémiologie.* in site e-phytia, [en ligne]. <ephytia.inra.fr/fr/C/6089/Vigne-Moisissure-grise-botrytis-cinerea> (Page consultée le 10 juillet 2013).
- Bodereau-Dubois, B.2011.** Récepteurs nicotiques neuronaux d'insectes et insecticides : caractérisation de facteurs cellulaires impliqués dans la modulation de l'efficacité des neonicotinoïdes. Thèse de doctorat. Laboratoire Récepteurs Canaux Ioniques Membranaires, INRA, Université d'Angers(France), p30.
- Bohbot, J.D., Dickens, J.C. 2010.** Insect repellents: modulators of mosquito odorant receptor activity. PLOS ONE. 5, e12138.
- Boizot, N., Charpentier, J.P. 2006.** Méthode rapide d'évaluation du contenu en composés phénoliques des organes d'un arbre forestier. Méthodes et outils pour d'observation et l'évaluation des milieux forestiers, prairiaux et aquatiques, INRA, 79-82.

- Boller,E.F., Häni, F., Poehling, H.M. 2004.** Ecological infrastructures: ideabook on functional biodiversity at the farm level, temperate zones of Europe. IOB Cwprs, Commission on Integrated Production Guidelines and Endorsement, Switzerland.
- Borguini ,R., Torres, E. 2009.** Tomatoes and tomato products as dietary sources of antioxidants. *Food Rev Int*, 25: 313–325.
- Bostanian, N.J., M. Akalach et H. Chiasson. 2005.** Effects of a *Chenopodium*-based botanical insecticide/ acaricide on *Orius insidiosus* (Hemiptera: Anthocoridae) and *Aphidius colemani* (Hymenoptera: Braconidae). *Pest Manag. Sci.* 61 : 979-984.
- Bourgaud, F. 1990.** Study of the biology of plants of the genus *Psoralea* (PULSES) producing a pharmaceutical furocoumarins interest culture *in vitro* . Doctoral thesis of The INPL in Agricultural Sciences National Polytechnic .Institut polytechnique of Lorraine (France). pp50.
- Bourgaud F., Gravot A., Milesi S. and Gontier E. 2001.** Production of plant secondary metabolites: a historical perspective. *Plant Sci*, 161, 839-851.
- Bourgou, S., Ksouri, R., Bellila, A., Skandrani, I., Falleh, H., Marzouk, B., 2008.** Phenol composition and biological activities of Tunisian *Nigella sativa* L. shoots and roots. *C. R. Biologies* . 331, 48-55.
- Bourrel, C., Dargent, R., Viirem, G., et Gaset, A. 1995.** Analyse chimique et propriétés fongistatiques de quelques huiles essentielles en milieu liquide. Effet sur la morphogénèse hyphale. *Rivista Italiana*, 17 : 31-42.
- Bousbia, N., Vian, M.A., Ferhat, M.A., Petitcolas, E., Meklati, B.Y., Chemat, F.2009.** Comparison of two isolation methods for essential oil from rosemary leaves: hydrodistillation and microwave hydrodiffusion and gravity. *Food Chemistry*, 114, 355-362.
- Bouzidi, M. A., Latrèche, A., Attaoui, I., Benabderrahma ,M., Mehdadi, Z ., Benyahia,M. 2012.**Antibacterial Effect of the Essential Oils Extracted From *Ruta chalepensis* L. and *Ruta montana* L. *Journal of Life Sciences*, 6:898-902.
- Boyle ,W. 1955.** Spices and essential oils as perspectives. *American Perfurmer Essential Oil Review*. 66: 25-28.
- Brambila, J., Lee, S.2013.** *Tuta absoluta*, The tomato leaf miner : Identification Aid. Cooperative Agriculture Pest Survey program. Consulté le 22 Mars 2013, depuis [http://caps.ceris.purdue.edu/screening/tuta\\_absoluta\\_id](http://caps.ceris.purdue.edu/screening/tuta_absoluta_id).
- Bremer, B., Bremer,K., Chase,M.W.,Fay, M.F., Reveal,J.L., Soltis,D.E .,Soltis,P.S and Stevens,P.F.2009.** An update of the Angiosperme Phylogény Group classification for the order and families of flowering plants: APG III. *Bot. J. Linn. Soc*, 161:105-121.

- Brewer D.1960.**Studies in Ascochyta pisi .Canadian journal de la végétale philosophie mathématique.Classique Hachette.
- Bringel Rêgo,C., Silva,A.M., Gonçalves,L.M., Aurélio Benini,M.2016.** *In vitro* antimicrobial activity of essential oil of *Cymbopogon citratus* (lemon grass) on *Streptococcus mutans* biofilm. Journal of Microbiology Research, 10(31): 1224-1228.
- Bruneton, J. 1999.** Pharmacognosie, Phytochimie – Plantes médicinales – 3ème Ed Techniques et documentations. Paris. pp: 227-494.
- Bruneton, J.1999.** Pharmacognosie, Phytochimie, plantes médicinales. Tec. Et Doc. Lavoisier (Paris). 3eme édition, 484-488 pp.
- Buchanan, B.B., Gruissem, W., Jones, R.L .2000.** Biochemistry & Molecular Biology of Plants. American Society of Plant Physiologists: Rockville, MA, p 1367
- Burgot ,G., Burgot ,J. L.2011.**Méthodes instrumentales d'analyse chimique et applications : Méthodes chromatographiques électrophorèses, méthodes spectrales et méthodes thermiques, 3ème Edition Tec & Doc Lavoisier, p.10.
- Burt ,S. 2004.**Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods ,a review. International Journal of Food and Microbiology. 94: 223-253.
- Cáceres, S. 2000.** La polilla del tomate: Manejo químicocultural. Hoja de Divulgación 15. Estación Experimental Agropecuaria Bella Vista, INTA, 5 p.
- Caillet, S., Lacroix, M. 2007.** Les huiles essentielles : leurs propriétés antimicrobiennes et leurs application potentielles en alimentaire. Laboratoire de Recherche en Sciences Appliquées à l'Alimentation (RESALA), INRS-Institut Armand-Frappier.8p.
- Carette, A.S., 2000.** La lavande et son huile essentielle. Thèse de doctorat. Université de Toulouse. p : 100.
- Carlen, C., Faby, R., Karjalainen, R., Pommier, J.J., and Steffek, R. 2003.** Control of air borne diseases in strawberries with natural and synthetic elicitors. Acta Horticulturae, 649: 237-240.
- Carmo, E.S., Lima, E.D.O. , De Souza, E.L., 2008.** The potential of *Origanum vulgare* L. (Lamiaceae) essential oil in inhibiting the growth of some food-related *Aspergillus* species. Brazilian Journal of Microbiology, 39:362-367.
- Carson, C.F., Mee, B.J. & Riley, T.V., 2002.-** Mechanism of action of Melaleuca alternifolia (tea tree) oil on Staphylococcus aureus determined by time-kill, lysis, leakage and salt tolerance assays and electron microscopy. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, **46**: 1914–1920.

**Caude, M., Jardy, A. 1996.** Méthodes chromatographiques. Dossier P1445. Base documentaire : Techniques d'analyse. Papier TA2.

**Cecchini, C., Silvi, S., Cresci, A., Piciotti, A., Caprioli, G., Papa, F., Sagratini, G., Vittori, S., Maggi, F. 2012.** Antimicrobial efficacy of *Achillea ligustica* All. (Asteraceae) essential oils against reference and isolated oral microorganisms. Chem. Biodivers, 9, 12–24.

**Celimene, C.C., Micales, J.A., Ferge, L. and Young, R.A. 1999.** Efficacy of pinosylvins against white rot and brown rots fungi. Holz forschung: 53:491-497.

**Chabasse ,D., Bouchara, J.P., Gentile, L., Brun, S., Cimon, B., Penn, P .2002.** Les moisissures d'intérêt médical (edn) Bioforma, Paris. 160p.

**Chaibeddra, Z., Baaziz, N ., Zellagui, A. 2016.** *Ruta tuberculata* Forsk: Phytochemical screening, total phenolic contents and antioxidant activity of crude coumarins and alkaloids extracts. Der Pharmacia Lettre, 8 (6):212-216.

**Chang, S.T., Wang, S.Y., Wu, C.L., Chen, P.F., Kuo, Y.H. 2000.** Comparison of the antifungal activity of cadinane skeletal sesquiterpenoids from *Taiwania* (*Taiwania cryptomerioides* Hayata) heartwood Holzforchung , 54, 241-245.

**Chauhan, R.S., Kaul, M.K., Shahi, A.K., Kumar, A., Ram, G. and Tawa, A. 2009.** Chemical composition of essential oils *Mentha spicata* L. accession from North-West Himalayan region, *India*. Ind. Crops. Prod. 29: 654-656.

**Chaumont, J.P., Leger, D.1989.** Propriétés antifongiques de quelques phénols et de composés chimiquement très voisin, relation structure et activité. Plant Med. Phyto, 23(2): 124 - 126.

**Chaux ,C.L et Foury, C.L.1994.** Cultures légumières et maraichères. Tome III. Légumineuses potagères, légumes et fruits. Tec et Doc Lavoisier, Paris, 563p.

**Chedia, A., Ghazghazi, H ., Safa, H ., Brahim, H ., M, Abderrazak.2013.** *In vitro* antifungal activity of the essential oil and the methanolic extract of *Ruta chalepensis*. Arch Inst Pasteur Tunis.90(1-4):39-46.

**Chehma, A., Faye, B., Bastianelli, D.2010.** Valeurs nutritionnelles de plantes vivaces des parcours sahariens algériens pour dromadaires. Fourrages, 204 :263-268. Chemistry, 99:191–203.

**Chen, C. C., Huang, Y. L., Huang, F. I., Wang, C. W., & Ou, J. C. 2001.** Water soluble glycosides from *Ruta graveolens*. Journal of Natural Products, 64, 990–992.

**Chiasson , H .,Beloin, N. 2007.** Les huiles essentielles, des biopesticides « Nouveau genre ». Bulletin de la Société d'entomologie du Québec .Antennae, 14 :1.

**Chibani, S., Bouratoua A., Kabouche, A., Laggoune, S., Semra, Z., Smati, F., Kabouche, Z. 2013.** Composition and antibacterial activity of the essential oil of *Ruta chalepensis* subsp. *angustifolia* from Algeria. *Der Pharm. Lett.* 5(5): 252.

**Chowdhury, J.U., Mobarok, H. Bhuiyan ,N.I. and Nandi ,N.C. 2009.** Constituents of essential oils from leaves and seeds of *Foeniculum vulgare* Mill. Cultivated in bangladesh. *Bangladesh . J. Bot*, 38(2): 181-183.

**Ciqual.2013.** Table de composition nutritionnelle des aliments Source des données nutritionnelles .Informations nutritionnelles .fr.

**Cilindre, C., Castro, A.J., Clément, C., Jeandet, P., and Marchal, R. 2007.** Influence of *Botrytis cinerea* infection on Champagne wine proteins (characterized by twodimensional electrophoresis/immunodetection) and wine foaming properties. *Food Chemistry*, 103: 139-149.

**Ciulei, I. 1980.** Methodology for Analysis of Vegetable Drugs. Pratical Mannuals on the Industrial Utilization of Medicinal and Aromatic Plants (3rd edn). Arta Grafica: Romania.

**Clémence, R., Dongmo, M.2009.** Clinique et pharmacologie , evaluation de l'activité antidermatophytique des extraits au méthanol et fractions d'acalyphamanniana (euphorbiacés) et tritemma hirtum ( mélatomatacées). Master en biochimie. Université de Dchang, p34

**Clevely, A., Richmond, K., 1997.** Plantes Et Herbes Aromatiques, Connaître Et Préparer, Larousse(Paris).

**Clevenger, J.F. 1928.** Apparatus for the determination of volatile oil. *J. Am. Pharm. Assoc*, 17(4), 346-351.

**Coertze, S.2001.** Germination and Establishment of Infection on Grape Berries by Single Airborne Conidia of *Botrytis cinerea* .*Plant Disease*, 85(6): 668-677.

**Coley-Smith, J.R. 1980.** Sclerotia and other structures in survival, p. 85-114, in: The biology of *Botrytis*. J. R. Coley-Smith, K. Verhoeff and W. R. Jarvis, eds. Academic Press, London, UK.

**Collin, G.2000.** Quelques techniques d'extraction de produits naturels. *Info-essences*, 13: 4-5.

**Conti , B., Leonardi ,M ., Pistelli ,L ., Profeti, R ., Ouerghemmi ,I ., ; Benelli ,G . 2013.** Larvicidal and repellent activity of essential oils from wild and cultivated *Ruta chalepensis* L. (Rutaceae) against *Aedes albopictus* Skuse (*Diptera: Culicidae*), an arbovirus vector. *Parasitol Res* 112 :991–999.

**Couic-Marinier, F., Lobstein, A. 2013.** Les huiles essentielles gagnent du terrain à l'officine. *Actualités pharmaceutiques*, 52 (525) : 18-21.

**Cowan, M. M. 1999.** Plant products as antimicrobial agents. Clin. Microbiol. Rev. 12 : 564 - 582

**Cox ,S.D., Mann, C.M., Markham, J.L., Bell, H.C., Gustafson, J. E., Warmington, J. R., & Wyllie, S.G., 2000.-** The mode of antimicrobial action of the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil). Journal of Applied Microbiology, 88: 170-175.

**Cristiani, M., D'arrigo, M., Mandalari,, G, Castelli, F., Sarpietro, MG., Micieli, D .2007.**Interaction of our monoterpenes contained in essential oil with model membrane : Implication for their antibacterial activity.Journal of Agricultural and food chemistry, 55:6300-6308.

**Da Silva, F.G. E., Da S. Mendes, F.R., Da C. Assunção, J.C., Pinheiro Santiago, G.M., Xavier Bezerra M.A., Barbosa, F.G., Mafezolic, J., Rodrigues Rocha, R. 2014.** Seasonal variation, larvicidal and nematicidal activities of the leaf essential oil of *Ruta graveolens* L. J Essent Oil Res. 26 (3):204-209.

**Damoiseau, L .2013.**Académie du Biocontrôle et de la PBI. Colloque Intrants Naturels. Journées Substances Naturelles en Protection des Cultures. Réglementation, expérimentation, usages (Paris).

**Daoudi ,A., Hrouk ,H., Belaidi, R., Slimani, I., Ibijbijen, J., Nassiri, L. 2016.** Valorisation de *Ruta montana* et *Ruta chalepensis*: Etude ethnobotanique, Screening phytochimique et pouvoir antibactérien Valorization of *Ruta montana* and *Ruta chalepensis*: Ethnobotanical study, phytochemical screening and Antibacterial activity. J. Mater. Environ. Sci, 7 (3) :926-935.

**Das Graças-Da Silva, M.F., Gottlieb, Otto R., Ehrendorfer F. 1988.** Chemosystematics of the Rutaceae: Suggestions for a more natural taxonomy and evolutionary interpretation of the family. Plant Systematics and Evolution, 161, 97-134.

**De Belair ,G.1990.** Structure, fonctionnement et perspectives de gestions de quatre éco-complexes lacustres et marécageux (El-Kala, Est algérien). Thèse doc. Univ. Montpellier.193 p.

**De Feo, V., De Simone ,F., Senatore, F .2002.**Potential allelochemicals from the essential oil of *Ruta graveolens*. Phytochemistry, 61: 573-578

**Debouba ,M., Khemakhem, B., Zouari,S., Gouia, H.2014.** Chemical and Biological Activities of *Haplophyllum tuberculatum* Organic Extracts and Essential Oil. Journal of Essential Oil Bearing Plants, 17: 5.

**Debray, M ., Jacquemin, H ;,Razafindrambo, R. 1971.** Travaux et documents de l'Orstom. Paris, N°8.

**Delaquis, P. J., Stanich, K., Girard, B., & Mazza, G. 2002.** Antimicrobial activity of individual and mixed fractions of dill, cilantro, coriander and eucalyptus essential oils. *International Journal of Food Microbiology*, 74, 101–109.

**Delarras, C.2007.** Microbiologie pratique pour le laboratoire d'analyse ou de contrôle sanitaire. Technique et documentations. Lavoisier, Paris.

**Dib, H. 2010.** Rôle des ennemis naturels dans la lutte biologique contre le puceron cendré, *Dysaphis plantaginea Passerini (Hemiptera aphididae)* en vergers de pommiers. Thèse de Doctorat. Université d'Avignon et des Pays de Vaucluse ( Institut National de la Recherche Agronomique).

**Djeddi, S ., Yannakopoulou, E ., Papadopoulos K., Skaltsa,H.2015.** Activités anti-radicalaires de l'huile essentielle et des extraits bruts de *Thymus numidicus* Poiret., Algérie. *Afrique Science* .11(2) 58 – 65.

**Djeugap, J.F., Fontem, D.A. & Tapondjou, A.L.2011.** Efficacité *in vitro* et *in vivo* des extraits de plantes contre le mildiou (*Phytophthora infestans*) de la morelle noire. *Int. J. Biol.Chem. Sci.* 5(6): 2205-2213.

**Djeridane, A., Yousfi, M., Brunel, J.M and Stocker P. 2010.** Isolation and characterization of a new steroid derivative as a powerful antioxidant from *Cleome arabica* in screening the *in vitro* antioxidant capacity of 18 Algerian medicinal plants. *Food and Chemical Toxicology*, 48: 2599-2606.

**Dob, T., Dahmane, D., Gauriat-Desrdy, B. , Daligault, V. 2008.** Volatile constituents of the essential oil of *Ruta chalepensis* L. subsp *angustifolia* (Pers.) P. Cout. *J. Essent. Oil Res.*20(4): 306-309.

**Dorman ,H.J. & Deans, S.G., 2000.** Antimicrobial agents from plants: antimicrobial activity of plant volatils oils. *Journal of Applied Microbiology*, 88(2): 308-316.

**Dugrand ,A., Olry ,A., Olry, T., Hehn ,A., Froelicher ,Y., Bourgaud, F. 2013.** Coumarin and Furanocoumarin Quantitation in Citrus Peel via Ultrapformance Liquid Chromatography Coupled with Mass Spectrometry (UPLC-MS). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61, 10677–10684.

**Dugrand-Judek A, Olry A, Hehn A, Costantino G, Ollitrault P, Froelicher Y. 2015.** The Distribution of Coumarins and Furanocoumarins in Citrus Species Closely Matches Citrus Phylogeny and Reflects the Organization of Biosynthetic Pathways. *PLOS ONE*, 10 :( 11).

**Dümmler,C., Schwab,A., ; Jäger-mischke,I., ; Thiam,A., Stoll,G; Görgen,R; Prexlerschwab, S.1993.** Pesticides et agriculture tropicale. Dangers et alternatives. Edition PAN/CTA. Weikersheim, RFA.

**Dupond, F. et Guignard, JL. 2012.** Abrégés de pharmacie. Botanique- Familles des plantes. Ed. Elsevier Masson 15e édition.

**Derwich, A., Manar, Z., Boukir, A. .2010.**GC/MS analysis and in vitro antibacterial activity of the essential oil isolated from leaf of *Pistacia lentiscus* growing in Morocco. World Applied Sciences Journal, 8:1267-1276.

**DSA. 2014.** Direction des statistiques agricoles, Biskra, Algérie.

**Eberhard, T., Rober, A., Annelise L. 2005.**Les plantes aromatiques. Ed Lavoisier, p423.

**Eilert, U .1994.** *Ruta*. In: Hagers Handbuch der pharmazeutischen Praxis. Band 6. Drogen P-Z. Springer Verlag, Berlin.

**El abed, N., Guesmi, F., mejri, M., Marzouki, M.N., Ben hadj ahmed, S. 2014.** Phytochemical screening and assessment of antioxidant, antibacterial and cytotoxicity activities of five tunisian medicinal plants. International journal of pharmaceutical research and bio science, 3(4):770-789.

**El Sayed ,K, Al-Said ,M.S, El-Feraly, F.S, Ross, S.A .2000.** New quinoline alkaloids from *Ruta chalepensis*.J Nat Prod, 63 (7): 995–7.

**Elad, Y., Williamson, B., Paul Tudzynski, Nafiz Delen. 2007.** *Botrytis* biology, pathology and control, Dordrecht, Netherlands, Springer.

**El-Haci I.A., Atik-Bekkara, F., Didi, A., Gherib, M. ,Didi. M.A. 2012.**Teneurs en polyphénols et pouvoir antioxydant d'une plante médicinale endémique du Sahara algérien. Phytothérapie , 10:280–285.

**El-Naggar, E.M.B, El-Darier, S.M. , Abdalla,A. , El-Mekannen, S., Švajdlenka, E ., Emlièka, M.2014.** Chemical Composition of Essential Oil of *Haplophyllum tuberculatum*(Rutaceae) Grow Wild in Different Habitats of Egypt. Journal of Pharmacology, 8 (3): 385-393.

**El-Waziry, A.M. 2007.** Nutritive value assessment of ensiling or mixing *Acacia* and *Atriplex* using in vitro gas production technique. Res. J. Agric. Biol. Sci. 3(6): 605-614

**Emam, A.M., Swelam, E.S, Megally, N.Y .2009.** Furocoumarin and quinolone alkaloid - rutamine with Larvicidal and Antifeedant Activities Isolated from *Ruta chalepensis* Leaves. J Nat Prod, 2: 10–22.

**Engler, A. 1931.** Rutaceae In: Die natürlichen Pflanzenfamilien, 2nd ed. Engelmann, Leipzig, 19a, 187-359, 458-459.

**Estay, P. 2000.** Polilla del tomate *Tuta absoluta* (Meyrick). *Informativo La Platina*, 9 : 1-4.

**Eymard, H.J.D. , Deans, S.G.2000.** Atimicrobial agents from plant : antibacterial activity of plant volatile oils. Journal of applied microbiology,88(2):308-316.

**Fahlen, A., Walander, M. and Wennersten, R. 1997.** Effect of light temperature regime on growth and essential oil yield of selected aromatic plants. *J. Sc. Food. Agric.* 73: 111-119.

**Fakhfakh, N., Zouari ,S., Zouari ,M., Loussayef, C., Zouari, N.2012.** Chemical composition of volatile compounds and antioxidant activities of essential oil, aqueous and ethanol extracts of wild Tunisian *Ruta chalepensis* L. (Rutacea).*J. Medicinal Plants Research*, 6(2012)593.

**Falleh, H., Ksouri, R., Chaieb, K., Karray-Bouraoui, N., Trabelsi, N., Boulaaba, M., Abdelly, C. 2008.** Phenolic composition of *Cynara cardunculus* L. organs, and their biological activities .*C. R. Biologies.* 331: 372-379.

**Fantino, N.S. 1990.** Etude du polymorphisme au d'une population de lavande (*Lavandula angustifolia* Mill.) Détermination de critères précoces de sélection. Thèse de doctorat. Université de La Rochelle, p :41-45.

**FAOSTAT.2009.** World tomatoes, all production by country, 1990-2005.

**FAO STAT .2013.** Food and Agriculture Oragniziion of the United Nations Statistics Division. <http://faostat3.fao.org/browse/Q/QC/E>

**FAO STAT .2015.** Food and Agriculture Oragniziion of the United Nations Statistics. Division. <http://faostat3.fao.org/browse/Q/QC/E>

**Favier , J.,Ireland-Ripert, J., Toque, C. et Feinberg. 2003.** Répertoire générale des aliments. Ed. Ciqual ,40-48p.

**Ferhat, M., Kabouche ,A., Kabouche ,Z., J. 2014.** Comparative compositions of essential oils of three *Ruta* species growing in different soils . *J. Mater. Environ. Sci.* 5 (3): 735-738.

**Fernandez ,S. , Montagne, A. 1990.** Preferencia de oviposición de las hembras y duración, crecimiento y sobrevivencia de las larvas de *Scrobipalpula absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae) en diferentes solanáceas. *Boletín de Entomología Venezolana*, 5(13) :100-106.

**Figueiredo, A.C., Barroso, J.G., Pedro, L.G. and Scheffer, J.J.C. 2008.** Factors affecting secondary metabolites production in plants: volatile components and essential oils. *Flavour. Frag. J.* 23: 213-226.

**Finney ,D.J, Probit .1971.**Analysis. 3<sup>rd</sup> Edition. Cambridge, London and New York .

**Fiori, A.C.G., Schwan-Estrada, K.R.F., Stangarlin, J.R., Vida, J.B., Scapim, C.A., Cruz, M.E.S. and Pascholati, S.F. 2000.** Antifungal activity of leaf extracts and essential oils of some medicinal plants against *Didymella bryoniae*. *J. Phytopathol*, 148:.483-487.

**Fokialakis, N, Osbrink, W.L.A, Mamonov, L.K, Gemejeva, N.G, Mims, A.B, Skaltsounis, A.L, Lax, A.R, Cantrell, C.L.2006.** Antifeedant and toxicity effects of

thiophenes from four *Echinops* species against the Formosan subterranean termite, *Coptotermes formosanus*. Pest Management Science, 2: 832 – 838.

**Foster, S., Tyler, V.E. 1999.** A Sensible Guide to the Use of Herbs and Related Remedies; Ed 4: Tyler,,s honest herbal, Haworth herbal press, p: 325-326.

**FRANCE AGRIMER (2014).** Les filières de fruits et légumes : Données 2013. <http://www.franceagrimer.fr> (consulté le 25/03/2015).

**France-Ida ,J.1996.** Bref survol de diverses méthodes d'extraction d'huiles essentielles. Info-essence , 3: 5-6.

**Furniss , D., Adams, T.2007.** Herb of Grace: an unusual cause of phytophotodermatitis mimicking burn injury. J Burn Care Res, 28 (5): 767–9.

**Gallais, A. et Bannerot, H. 1992.** Amélioration des espèces végétales cultivées. Objectifs et critères de sélection. Ed. INRA. Paris.

**Gamal .A. 2005.**Caractérisation et étude de l'effet des sources de carbone et d'azote sur la production de nouveaux métabolites secondaires chez *aspergillus ochraceus* non producteur de l'ochratoxine A. Thèse de Doctorat ., Institut national polytechnique de Toulouse.

**Ganou, L. 1993.** Contribution à l'étude des mécanismes fondamentaux de l'hydrodistillation des huiles essentielle. Thèse de l'INP Toulouse, France.

**Garabeth, F., Bouaoun, D., Elyafi-Elzahri, G., 2007.** Etude quantitative des coumarines d'une plante sauvage *Prangos asperula Boissier*. Journal of phytothérapie, 5:259-263.

**Georgantelis, D, Ambrosiadis ,I, Katikou ,P.2007.** Effect of rosemary extract, chitosan and  $\alpha$ -tocopherol on microbiological parameters and lipid oxidation of fresh pork sausages stored at 4 °C. Meat Sci Elsevier, 76: 172–81.

**Ghazghazia,H., Chediab, A., Abderrazakb, M., Brahma, H., 2013.** Comparaison des contenus en polyphénols et de l'activité antioxydante des extraits méthanoliques de quatre plantes collectées du nord de Tunisie. Microbiol. Hyg. Alim.-Vol 25, N° 73 (4ème Journée GEDIV).

**Ghazghazia,H., Chediab, A., Abderrazakb, M., Brahma, H., 2013.** Comparaison des contenus en polyphénols et de l'activité antioxydante des extraits méthanoliques de quatre plantes collectées du nord de Tunisie. Microbiol. Hyg. Alim.-Vol 25, N° 73– juillet 2013 (4ème Journée GEDIV).

**Gholampour Azizi ,S., Shateri and Mousavizadeh, M.2012.** Isolation and identification of the mycotoxigenic and non-mycotoxigenic fungi from foodstuff and feedstuff in Mazandaran Province, Northern Iran. African Journal of Microbiology , 6(18):3993-3999.

**Gonzalez-Trujano, M. E., Carrera, D., Ventura Martinez, R., Cedillo-Portugal, E., Navarrete, A., 2006.** Neuropharmacological profile of an ethanol extract of *Ruta chalepensis* L in mice. *Ethnopharmacol*, 106, 129-135.

**Gonzalez-Trujano, M. E., Carrera, D., Ventura Martinez, R., Cedillo-Portugal, E., Navarrete, A. 2006.** Neuropharmacological profile of an ethanol extract of *Ruta chalepensis* L in mice. *Ethnopharmacol*. 106, 129-135.

**Grewal, R.K., Jhooty, J.S. 1984.** Rating of gram Cicer arietinum blight in fungicidal trials. *Crop. Improv*, 11 (1):71-72.

**Groves, J.W., Drayton, E.L. 1939.** The perfect stage of *Botrytis cinerea*. *Mycologia*, 31, 485-489.

**Guinoiseau, E. 2010.** Molécules, antibactérienne issues d'huiles essentielles : séparation, identification et mode d'action. Thèse de Doctorat de l'Université de Corse, option : Biochimie- Biologie moléculaire, France, 50p.

**Gullino, M.L. 1992.** Chemical control of *Botrytis* spp, p. 217-222, in: Recent advances in *Botrytis* research. K. Verhoeff, N. E. Malathrakis and B. Williamson, eds. Pudoc Scientific Publishers.

**Gunaydin, K., Savci, S. 2005.** Phytochemical studies on *Ruta Chalepens* (LAM.) LAMARCK. *Natural Product Research*, 19(3): 203–210.

**Haddouchi, F., Mohammed Chaouche, M., Zaouali, Y., Ksouri, R., Attou, A., Benmansour, A. 2013.** Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oils from four *Ruta* species growing in Algeria. *Food Chemistry* 141 : 253–258.

**Hammer, K.A., Carson, C.F., Riley, and T.V. 1999.** Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts. *J. Appl. Microbiol*, 86: 985–990.

**Huang, D., Ou, B., Prior, R.L. 2005.** The Chemistry behind Antioxidant Capacity Assays", *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53 (6): 1841-1856.

**Iauk, L., Mangano, K., Rapisarda, A., Ragusa, S., Maiolino, L., Musumeci, R., Costanzo, R., Serra., 2004.** A. Protection against murine endotoxemia by treatment with *Ruta chalepensis* L. plant with anti-inflammatory properties. *Ethnopharmacol*, 90, 267-272.

**Iauk, L., Mangano, K., Rapisarda, A., Ragusa, S., Maiolino, L., Musumeci, R., Costanzo, R., Serra., 2004.** A. Protection against murine endotoxemia by treatment with *Ruta chalepensis* L. plant with anti-inflammatory properties. *Ethnopharmacol*. 90, 267-272.

**Iauk, L., Mangano, K., Rapisarda, A., Ragusa, S., Maiolino, L., Musumeci, R., Costanzo, R., Serra., 2004.** A. Protection against murine endotoxemia by treatment with *Ruta chalepensis* L. plant with anti-inflammatory properties. *Ethnopharmacol*. 90, 267-272.

**Hammer ,K.A.,Carson ,C.F., Riley ,T.V. 2003.**Antifungal activity of the components of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil. J. Appl. Microbiol, 95(4), 853-860.

**Hammiche, V., Azzouz, M. 2013.** Les rues : ethnobotanique, phytopharmacologie et toxicité. Phytothérapie, 11:22-30.

**Hammiche, V., Merad, R ., Azzouz, M.2013.**Plantes toxiques à usage médicinal du pourtour méditerranéen, Springer-Verlag France,p : 197–226,

**Harborne, J. B., 2005.** Phytochemical methods. New Delhi. Springer (India) Pvt. Ltd., 17.

**Haston, E., Richardson, J. E., \_Stevens, P. F.2009.**The linear angiosperm phylogeny group (LAPG) III: a linear sequence of the families in APG III. Bot. J. Linn. Soc, 161: 128-131.

**Hayouni, E., Abedrabba, M., Bouix, M., Hamdi, M. 2007.** The effects of solvent and extraction method on the phenolic contents and biological activities *in vitro* of Tunisian *Quecus coccifera* L. and *Juniperus phoenicea* L. fruit extracts, Food Chem. 105: 1126-1134.

**Hayouni, E., Abedrabba, M., Bouix, M., Hamdi, M. 2007.** The effects of solvent and extraction method on the phenolic contents and biological activities *in vitro* of Tunisian *Quecus coccifera* L. and *Juniperus phoenicea* L. fruit extracts, Food Chem, 105: 1126- 1134.

**Hettiarachichi, D.S.2008.** Volatile oil content determination in the Australian sandalwood industry: Towards a standardised method. Sandalwood Research Newsletter, 23: 1-4.

**Heywood ,V.H. 1996,** Les plantes à Fleurs, 306 familles de la flore mondiale. Edition Nathan(Paris), p336.

**Hnatyszyn, O., Arenas, P., Moreno, A.R., Rondina, R., Coussio, J.D., 1974.** Plantas reguladoras of fecundidad medicina segun the folkloric. Revista de la Sociedad Cientifica, 14-37.

**Holz, G., Coertze? S., & Williamson, B. 2004.** The ecology of *Botrytis* on plant surfaces. In: Y. Elad, B. Williamson, P. Tudzynski, & N. Delen (Eds.), *Botrytis: biology, pathology and control* (pp. 9-27). Dordrecht, The Netherlands: Kluwer Academic Press.

**Huang, H. S.,Chang, L. H., Jong, T. T., Nien, Y. F.& Chang, C. M. J.,1995.** Supercritical carbon dioxide extraction of turmetic oil from *Curcuma longa* Linn. ,and purification of turmerones. Separation and Purification Technology, 47:119-125

**Hudaib, M., Speroni, E., Di Pietra, A.M. and Cavrini, V. 2008.** GC/MS evaluation of thyme (*Thymus vulgaris* L.) oil composition and variations during the vegetative cycle. J. Pharm, Biomed. Anal. 29: 691-700.

**Huignard, J.2013.**Les plantes et les insectes : une lutte permanente- Les défenses des plantes. Le Bulletin trimestriel de la Société des amis du Muséum national d'histoire naturelle, n°251.

- Inigo, R. P. A., BE viana, M. E. L., Catalan, C. A. N., De iglesias, D. I. A.1981.**Essential oil of *Ruta chalepensis* L.(Rutaceae).Essenze Deriv. Agrum, 51 : 349-351.  
*Int. J. Agric. Biol.*, Vol. 11, N° 1, pp.59-63.
- Isman, M. 1999.** Pesticides based on plant essential oils. *Pesticide Outlook*, 68-72.
- Ivanova, A., Kostova, I., Rodriguez Navas, H., Villegas, J .2004.**Volatile components of some Rutaceae species. *Z Naturforsch* ,59: 169-173.
- Jarvis, W. R., Epidemiology. In: J. R. Coley-Smith.1980.**Eds.The biology of *Botrytis*. Academic Press, London, UK, pp. 219-250.
- Jeandet, P., Adrian, M., Breuil, A.C., Sbaghi, M., Debord, S., Bessis, R., Weston, L.A., and Harmon, R. 2000.** Chemical induction of phytoalexin synthesis in grapevines: Applications to the control of grey mouldin the vineyard.*Acta Horticulturæ*, 528:591-596.
- Johansen, C., Verheul Gram, L., Abee, T., 1997.** Protamine-induced permeabilization of cell envelopes of Gram-positive and Gram- negative Bacteria. *App. Env. Micobio*, 63: 1155-1159.
- Jones, L.R. 1901.** *Bacillus carotovorus n.sp*, die Ursache einer weichen Fäulnis der Möhre. Zentralblatt für Bakteriologie, Parasitenkunde, Infektionskrankheiten und Hygiene Abt II, 7: 12-21.
- Joulain, D.1994.** Modern methodologies applied to the analysis of essential oil and other complex natural mixture: use and abuse.*Perfumer & Flavorist*, 19: 5-17.
- Judd, W.S., Cambell, C.S., Kellogg, E.A. , Stevens, P. 2002.** Botanique systématique une perspective phylogénétique. De Boeck université, 540 p.
- Jussieu, A.L. 1789.**Genera Plantarum Secumdum Ordines Naturales Disposita, Herrissant, Paris,p296.
- Kabouche, Z., Benkiki, N., Seguin, E., Bruneau, C .2003** .A new dicoumarinyl ether and two rare furocoumarins from *Ruta montana*. *Fitoterapia*, 74(1-2): 194-6.
- Kacem, M., Kacem, I., Simon, G., Ben Mansour, A., Chaabouni, S., Elfeki, A., Bouaziz .2015.** Phytochemicals and biological activities of *Ruta chalepensis* L. growing in Tunisia. *Food Biosci*,12:73-83.
- Kadidia, D.A.O.2013.** Etude de la variabilité de *Fusarium verticil Lioides* (Sacc.) Nirenberg isolé des semences paysannes de maïs au Burkina Faso et recherche de méthodes de lutte alternatives basées sur les extraits de plantes *in vitro*. Diplôme d'études approfondies en gestion intégrée des ressources naturelles. Université polytechnique de bobo-dioulasso (BURKINA FASO)

- Kadri, A., Zarai, A., Bekir, A., Gharsallah, N., Damak million., Gdoura, R., 2011.** Chemical composition and antioxidant activity of *Marrubium vulgare L.* essential oil from Tunisia. *Journal of Biotechnology*, 10, 3908-3914.
- Kalemba, D. & Kunicka, A. 2003.**Antibacterial and antifungal properties of essential oils. *Current Medicinal Chemistry*. 10: 813-829.
- Kallel,S., Ben Ouadday, M.Z.,Ghrabi, Z. 2009.** Evaluation de l'activité nématotoxique d'*Haplophyllum tuberculatum* sur *Meloidogyne javanica*. *Nematol medit*, 37: 45-52.
- Kamalak, A., Canbolat, O., Gurbuz, Y., Erol, A. and Ozay, O. 2005.** Effect of Maturity Stage on Chemical Composition, *in Vitro* and *in Situ* Dry Matter Degradation of Tumbleweed Hay (*Gundelia tournefortii L.*). *Small Ruminant Research*, 58, 149-156.
- Kambouche, N., Merah, B., Bellahouel, S., Bouayed, J., Dicko, A., Derdour, A., Younos ,C., Soulimani, R.2008.** Chemical composition and antioxidant potential of *Ruta montana L.* essential oil from Algeria. *J Med Food*, 11(3): 593–5.
- Kang, D.G., Yun, C.K., Lee, H.S., 2003.** Screening and comparison of antioxidant activity of extracts of herbal medicines used in Korea. *Journal of Ethnopharmacology*, 187, 231-236.
- Kanko, C., Sawaliho, B.E., Kone, S., Koukoua, G., N'guessan,Y.T. 2004.**Étude des propriétés physico-chimiques des huiles essentielles de *Lippia multiflora*, *Cymbopogon citratus*, *Cymbopogon nardus*, *Cymbopogon giganteus*. *Comptes rendus Chimie*, 1039–1042.
- Kharroubi, A. 2008.** Agriculture: *Tuta absoluta* threatens the Moroccan tomato.
- Kheyer, N., Meridja, D., Belhamel ,K..2014.** Etude de l'activité antibactérienne des huiles essentielles d'*Inulaviscosa*, *Salviaofficinalis* et *Laurusnobilis* de la région de Bejaia. *Algerian Journal of Natural Products*, 2(1): 18-26.
- Khelifi, D., Sghaier, R.M., Amouri, S., Laouini, D., Hamdi, M., Bouajila, J., 2013.** Composition and anti-oxidant, anti-cancer and anti-inflammatory activities of *Artemisiaherba-alba*, *Ruta chalpensis L.* and *Peganum harmala L.* *Food and Chemical Toxicology*, 55: 202–208.
- Khosravi ,A.R., Shokri ,H., Farahnejat, Z., Chalangari, R., Katalin, M.2013.** Antimycotic efficacy of Iranian medicinal plants towards dermatophytes obtained frompatients with dermatophytosis. *Chin. J. Nat. Med*, 11: 43–48.
- Kim K.S., Lee S., Lee Y. S., Jung S.H., Park Y., Shin K.H, Kim B.K., 2003.** Anti-oxidant activities of the extracts from the herbs of *Artemisia apiacea*. *Journal of Ethnopharmacology*, 85 : 69–72.
- Kim, S., Roh, J, Kim, D., Lee, H., Ahn, Y. 2003.** Insecticidal activities of aromatic plant extracts and essential oils against *Sitophilus oryzae* and *Callosobruchus chinensis*. *J. Stored Prod. Res.*, 39 : 293-303.

**Kolai, N., Saiah., F, Boudia., A. 2012.** Effet inhibiteur *in vitro* de l'huile essentielle d'*Artimesia herba alba* sur deux souches de *Fusarium oxysporum f. sp. radicis-lycopersici*. Algerian journal of arid environment ,2 :71-76.

**Kordali ,S., Cakir, A. ,Zengin ,H. , Duru, M. E. 2003.**Antifungal activities of the leaves of three *Pistacia* species grown in Turkey. Fitoterapia. 74 : 164-167.

**Kouamé, J., Gnoula, C., Palé, E., Bassolé, H., Guissou, I. P., Simporé ,J., Nikiéma, J .B., 2009.** Etude des propriétés cytotoxiques et anti-radicalaires d'extraits de feuilles et de galles de *Guiera senegalensis* J. F. Gmel (Combretaceae). Science et technique, Sciences de la santé. Vol 32 (1 et 2) :14p.

**Kouamé-Bi, K.F.P. 2012.**Valorisation de quatre plantes médicinales Ivoiriennes : étude phytochimique. Thèse de doctorat., Université de Nantes et de l'Université de Cocody-Abidjan. 180 p.

**koudjil, M., Boukabcha,F., Harichane,H. 2015.**Perte en rendement et déprédation par la mineuse, *Tuta absoluta*(Lepidoptera, Gelechiidae) sur la culture de tomate, dans la wilaya de Chlef (Algérie). Nature & Technologie. B. Sciences Agronomiques et Biologiques, n° 12, Pages 73- 85.

**Ksouri, R., Megdiche, W., Falleh, H., Trabelsi, N., Boulaaba, M., Smaoui, A., Abdelly, C. 2008.** Influence of biological, environmental and technical factors on phenolic content and antioxidant activities of Tunisian halophytes. C. R. Biol, 331: 865- 873.

**Kurita, N., myaji, M., kurane, R., Takahara, Y., Ichimara, K., 1979.** Antifungal activity and molecular orbital energies of aldehyde compounds rom oils of higher plants. Agric. Boil. Chem. 43: 2365-2371

**Kurita, N., Koike, S.1982.** Synergetic antimicrobial effect of sodium chloride and essential oils components. Agric. Bil. Chem. 46: 159-165.

**Lagunez Rivera, L.2006.** Etude de l'extraction de métabolites secondaires de différentes matières végétales en réacteur chauffée par induction thermomagnétique directe. Thèse Doctorat, Institut national polytechnique de Toulouse. P: 15-35.

**Lahlou, M.2004.**Methods to study phytochemistry and bioactivity of essential oils. Phytotherapy Research, 18: 435-448.

**Lambert, R. J. W., Skandamis, P. N., Coote, P., & Nychas, G. J. E. 2001.** A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential.J Appl Microbiol, 91(3):453-62.

**Lardry, J.M., Haberkorn, V.2007.** L'aromathérapie et les huiles essentielles. Kinesither Rev , 61 : 14-7.

- Le Houerou, H.N. 1990.** Définition et limites bioclimatiques du Sahara. Sécheresse, 1 : 246-59.
- Lebdi Grissa, K., Skander ,M., Mhafdhi ,M., BelHadj ,R.2011.** Lutte intégrée contre la mineuse de la tomate, *Tuta absoluta* Meyrick (Lepidoptera: Gelechiidae) en Tunisie. Faun. Entomol. , 63 (3), 125-132.
- Leach ,C.M.1962.**The quantitative relationship of UV and visible radiation to the induction of reproduction in *Ascochyta pisi* .Can .j.Bot.,40:1577-1602.
- Leela, N.K., Khan, R.M., Reddy, P.P., Nidiry, E.S.J. 1992.** Nematicidal activity of essential oil of *Pelargonium graveolens* against root-knot nematode *Meloidogyne incognita*. *Nematologia Mediterranea*, 20: 57-58.
- Lelliott, R.A. 1984.** Genre XII. *Erwinia* Winslow, Broadhurst, Buchanan, Krumweide, Rogers et Smith 1920, p. 332-339. Dans R. E. Buchanan et NE Gibbons (ed.), Le manuel de Bergey de Bactériologie déterminante, 8 e éd. The Williams & Wilkins Co., Baltimore.
- Leroux, P., Credet A., 1978.** Document sur l'étude de l'activité des fongicide. INRA, Versailles, France, 12 p.
- Link, H.F. 1809.Observations in ordines plantarum naturalis, Dissetatio I. Mag Ges Naturf Freunde Berlin, 3:3-42.
- Lietti, M.M.M., Botto, E.,Alzogaray, A.R.2005.** Insecticide resistance in Argentine populations of *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae). Neotropical Entomology, 34(1): 113-119.
- Lietti, M.M.M., Botto, E. and Alzogaray, A.R.. 2005.** Insecticide resistance in Argentine populations of *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae). Neotropical Entomology, 34(1): 113-119.
- López, M.D., Pascual-Villalobos, M.J. 2010.** Mode of inhibition of acetylcholinesterase by monoterpenoids and implications for pest control. Industrial Crops and Products, 31: 284-288.
- Lopez-Malo, A., S. M. Palou, E. 2005.** *Aspergillus flavus* growth in the presence of chemical preservatives and naturally occurring antimicrobial compounds. Int. J. Food Microbiol,99 : 119 - 128.
- Lorrain, E. 2013.**100 Questions sur la phytothérapie. Ed. La boétie, Italie.
- Lucchesi ,M.E., Samdja, J., Bradshaw, S., Louw, W., Chemat, F. 2007.** Solvent free microwave extraction of *Elletaria cardamomum* L.: a multivariate study of a new chemotype for the extraction of essential oil. J. Food Eng, 79: 1079-1086.
- Lucette Couderc, V.2001.**Toxicité des huiles essentielles. Thèse de Doctorat. Ecole national de vétérinaire .Toulouse .FRANCE.

**MADR. 2009.** Ministère de l'Agriculture et du Développement Rural, Direction des statistiques.

**Maffei & Sacco. 1997.** Perfumer and flavorist. . Flavour and Fragrance Journal.13 : p:61

**Maier, W., Baumert, A., Schumann, B., Furukawa, H., Gročger, D. 1993.** Synthesis 1,3-dihydroxy-N-methylacridone and its conversion to rutacridone by cell-free extracts of *Ruta graveolens* cell cultures. Phytochemistry, 32: 691–8.

**Majdoub, O., Dhen, N., Souguir, S., Haouas, D., Baouandi, M., Laarif, A. et Chaieb, I. 2014.** Composition chimique des huiles essentielles de *Ruta chalepensis* et leur activité insecticide contre *Tribolium castaneum*. Tunisian Journal of Plant Protection, 9: 83-90.

**Mallea ,A.R., Macola, G.S., Garcia, S.J.G., Bahamondes, L.A. & Suarez, J.H. 1972.** *Nicotiana tabacum* var *virginica*, a new host of *Scrobipalpula absoluta*. *Revista de la Facultad de Ciencias Agrarias*, Universidad Nacional de Cuyo,18, p. 13-15,

**Mancebo F, Hilje L, Mora GA Víctor H. and Salazar,R. 2001.** Biological activity of *Rutachalepensis*(*Rutaceae*) and *Sechium pittieri*(*Cucurbitaceae*) extracts on *Hypsipyla grandella* (*Lepidoptera: Pyralidae*) larvae. *Rev Biol Trop*, 49: 501-8.

**Mancebo, F., Hilje, L., Mora, G.A, Castro, V.H., Salazar, R. 2001.** Biological activity of *Ruta chalepensis* (*Rutaceae*) and *Sechium pittieri* (*Cucurbitaceae*) extracts on *Hypsipyla grandella* (*Lepidoptera: Pyralidae*) larvae. *Rev Biol Trop*, 49 (2): 501–8.

**March, R.E., Li, H., Belgacem, O., Papanastasiou, D.2007.**High-energy and low energy collision-induced dissociation of protonated flavonoids generated by maldi and by electrospray ionization. *International Journal of Mass Spectrometry*, 262, 51-66.

**Mares, D., Tosi ,B., Poli ,F., Andreotti, E. and Romagnoli, C. 2004.** Antifungal activity of *Tagetus patula* on some phytopathogeni fungi ultrastructural evidence on *phythum ultimum* *Microbiol. Res*, 859: 295-304.

**Martinez, F., Dubos, B., Fermaud, M. 2005.** The role of saprotrophy and virulence in the population dynamics of *Botrytis cinerea* in vineyards. *Phytopathology*, 95: 692-700.

**Maria Margarida, Vieira .2008.** Mineira do tomateiro (*Tuta absoluta*). Uma nova ameaça a produção de tomate. V Seminário Internacional do Tomate de Industria .

**McEwan, M. 1994.** The antifungal effects of plant essential oils and their production by transformed shoot culture. Dr thesis, Strathclyde Institute of Biomedical Sciences, University of Strathclyde, Glasgow, Scotland.

**Mejrib, J., Abderrabbab,M., Mejria,M. 2010.** Chemical composition of three essential oil of *Ruta chalepensis* L: Influence of drying, hydro-distillation duration and plant parts. *Industrial Crops and Products*, 32.3:671-673.

**Mejri, J., Bouajila, J., Sik Ali, S. B., Abderrabba, M.,Mejri, M. 2012.** *Ruta chalepensis* L. Essential Oil: Chemical Composition and Phytotoxic Activity. JBAPN, 2 (6):341-352.

**Merghache ,S., Hamza,M., Tabti,B.2009.** Etude physicochimique de l'huile essentielle de *Ruta Chalepensis* L. de Tlemcen, Algérie. Afrique Science, 05(1) : 67 – 81.

**Meyer, C.2014.** Dictionnaire des sciences animales, édition scient, sur le site du Cirad, Montpellier, France, consulté en mai 2014, article rues

**Milesi, S., Massot, B., Gontier, E., Bourgaud, F., Guckert, A. 2001.** *Ruta graveolens* L.: a promising species for the production of Furanocoumarins. Plant Sci, 161: 189–99.

**Miller, A.G., Morris, M. et Stuart, S. 1988.** Plants of Dhofar, the southern region of Oman: Traditional, Economic and Medical Uses. The Office of the Adviser for Conservation of The Environment, Diwan of Royal Court, Sultanate of Oman, 242 pp.

**Mioulane, P. 2004.** Encyclopédie Universelle des 15000 plantes et fleurs de jardins, Larousse, Ed : PROTEA, p : 7-50.

**Mitscer, L.A., Hasennhuettl, G. 1975.** Phytochemistry, 9, 243-283.

**Mohammad, S., Abu-Darwish and Abu-Dieyeh Z.H.M., 2009.** Essential oil content and heavy metals composition of *Thymus vulgaris* cultivated in various climatic regions of Jordan. *Int. J. Agric. Biol.*, Vol. 11, N° 1, pp.59-63.

**Mohammedi, Z., Atik, F.2011.** Antibacterial activity of essential oils from *Cistus ladaniferus* L. and *Lavandula stoechas* L. International Journal of PharmTech Research, 3(1): 484-487.

**Raynaud,C., Sanda,K. 2013.** Activités insecticides de l'huile essentielle de *Cymbopogon schoenanthus* (L.) Spreng. sur les larves de stade II de *Dysdercus voelkeri* Schmidt (Heteroptera:Pyrrhocoridae). J. Soc. Ouest-Afr. Chim, 035: 8 - 14

**Naz ,S., Siddiqi, R., Ahmad, S., Rasool ,S., Sayeed, S.2007.** Antibacterial activity directed isolation of compounds from *Punica granatum* .Journal of Food Sciences, 72, 341–345.

**Mohd ,K., Laina ,Zand ,Mohd ,H., Norazian, T., Nurhaya K. 2010.** Bioassay-guided Isolation of Antimicrobial Active Alkaloids from *Ruta angustifolia (L.) Pers.* In: *3rd International Conference on Biotechnology for the Wellness Industry & Exhibition*, Putra World Trade Centre, Kuala Lumpur, Malaysia .

**Mohd, H., Norazian, L., Fatimah ,A., Wan, H and Mohd ,N., Siti ,S ., Mohd, K., Laina, Z., Deny, S. 2012.** Antimicrobial Activity of Extracts and Alkaloids from Callus and Shoot Cultures of *Ruta angustifolia (L.) Pers.* In: *International Seminar on Natural Product Medicines 2012: Current Issues on Future Researchers and Applications of Natural Product Medicines*, Bandung, Indonesia.

**Mohr, N., Budzikiewicz, H., El Tawil, B.A.H., El Beih, F.K.A. 1982.** Further Alkaloids from *Ruta chalepensis*. *Phytochemistry*.21(7): 1838-1839.

**Molyneux. P.2004.** The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity .*Songklanakarinn J. Sci. Technol*, 26(2) : 211-219.

**Moore, J.A. 1936.** Floral anatomy and phylogeny in the Rutaceae. *New Phytologist*, 35 : 318-322.

**Moreira, M.R., Ponce, A.G., Del Valle, C.E., Roura, S.I. 2005.** Inhibitory parameters of essential oils to reduce a foodborne pathogen. *LWT-Food Science and Technology*, 35(5): 565-570.

**Motta, M.M.M., Picanço, M.C., Zanuncio, J.C., Bacci, L., Silva, E.M. 2005.** Impact of integrated pest management on the population of leafminers, fruit borers, and natural enemies in tomato. *Ciencia Rural*, 35(1):204-208.

**Muanza , K., Muanza, B.W. ,Kim, K.L., William, L.1994.** Antibacterial and antifungal activities of nine medicinal plants from Zaire, International. *Journal of Pharmacology*, 32 337–345.

**Mucciarelli .1985.** White stronlda clever unguate eat an nat, (2), p118

**Munro, D B., Small, E. 1998.** Les legumes du Canada .NRC Research Press.

**N'guessan, K., Kadja, B., Zirihi, G.N., Traoré, D., Aké-Assi, L., 2009.** Screening phytochimique de quelques plantes médicinales ivoiriennes utilisées en pays Kroubo (Agboville, Côte-d'Ivoire). *Sciences et Nature*, 6: 1-15.

**Nadio,N.A., Poutouli,W.P., Akantetou,P., Laba,P., Tozoou, M. E., Bokobana, K. , Koba , C., Raynaud, K. 2015.** Propriétés insecticides et répulsives de l'huile essentielle D'*Ocimum Sanctum L.* envers *Dysdercus Voelkeri* Schmidt (Heteroptera; Pyrrhocoridae). *Science de la vie, de la terre et agronomie REV*, 3(2) : 2424-7235.

**Ndomo, A.F., Tapondjou, A.L., Tendonkeng, F., Tchouanguep, F.M. 2009.** Evaluation des propriétés insecticides des feuilles de *Callistemon viminalis* (Myrtaceae) contre les adultes d'*Acanthoscelides obtectus* (Say) (Coleoptera; Bruchidae). *Tropicultura*, 27(3): 137-143.

**Nébié, R. C. H. 2006.** Etudes des huiles essentielles de plantes aromatiques du Burkina Faso: Production, Composition chimique et Propriétés insecticides. Thèse de Doctorat d'Etat Sciences Physiques (Chimie Organique: structure et réactivité), Unité de Fondation et de Recherche/ Sciences Exactes et Appliquées, Université de Ouagadougou, Burkina Faso. 175p.

**Negi, P.S., Jayaprakasha, G.K . 2003.** Antioxidant and antibacterial activities of *Punica granatum* peel extracts .*Journal of Food Sciences*, 68, 1473–147.

**Ngamo, L.S.T., Hance, T.H. 2007.** Diversité des ravageurs, des denrées et méthodes alternatives de luttés en milieu tropical. *Tropicultura*, 25(4): 215-220.

**Nguyen, T. T. T., Tran, E., Ong, C. K., Lee, S. K., Do, P. T., Huynh, T. T., Nguyen, T. .2003.** Kaempferol-Induced Growth Inhibition and Apoptosis in A549 Lung Cancer Cells Is Mediated by Activation of MEK-MAPK. *Journal of Cellular Physiology*, 197:110–121

**Ntalli, N.G., Manconi, F., Leonti, M., Maxia, A., Caboni, P. 2011.** Aliphatic Ketones from *Ruta chalepensis* (Rutaceae) Induce Paralysis on Root Knot Nematodes. *J. Agric. Food Chem.*, 59: 7098-7103.

**Nyamador, W.2009.** Influence des traitements à base d'huile essentielle sur les capacités de reproduction de *Callosobruchus subinnotatus* Pic. et de *Callosobruchus maculatus* F. (Coleoptera : Bruchidae): Mécanisme d'action de l'huile essentielle de *Cymbopogon giganteus* Chiov. Thèse de doctorat de l'Université de Lomé, 177p.

**Obeng-Ofori, Reichmuth C. H, Bekele ,J ., Hassanali A W. 1997.** Biological activity of 1,8-cineol a major component of essential oil of *Ocimum kenyense* (ayobangira) against stored product beetles. *Journal of Applied Entomology*, 121: 237-243.

**Oliva, A, Meepagala, K.M, Wedge, E., Harries, D., Hale, A.L, Aliotta, G., Duke,S.O .2003.**Natural fungicides from *Ruta graveolens* L. leaves, including a new quinolone alkaloid. *J Agric Food Chem* ,51: 890- 896

**EPPO .2007.** Distribution Maps of Quarantine Pests for Europe: *Tuta absoluta*. European and Mediterranean Plant Protection Organisation. Disponible sur Internet (22/11/08) [[http://www.appo.org/quarantine/insects/Tuta\\_abso\\_luta/DSGNORAB\\_Map.htm:1-2](http://www.appo.org/quarantine/insects/Tuta_abso_luta/DSGNORAB_Map.htm:1-2)].

**Olle ,M. ,Bender ,I., 2010.** The content of oils in Umbelliferous crops and its formation. *Agronomy Research*, 8 (3):687-696.

**Ouerghemmi, I., Rebey, I. B., Rahali, F/Z., Bourgou, S., Pistelli, L., Ksouri, R., Marzouk, B., Tounsi, M.S.2016.** Antioxidant and antimicrobial phenolic compounds from extracts of cultivated and wild-grown Tunisian *Ruta chalepensis*. *Journal of food and drug analysis* xx .

**Oussalah, M., Caillet, S., Saucier, L., Lacroix, M., 2006.** Antimicrobial effects of selected plant essential oils on the growth of a *Pseudomonas putida* strain isolated from meat. *Meat Science* 73: 236-244.

**Oussou, K.R. 2009.** Etude chimique et activités biologiques des huiles essentielles de sept plantes aromatiques de la pharmacopée Ivoirienne. Thèse de Doctorat. Université de Cocody-Abidjan, 241p.

**Oussou, K.R., Youlou, S., Kanko, C., Guessenn, K. N., Boti, J.B., Ahibo, C. & Casanova, J. 2008.** Etude chimique et activité antidiarrhéique des huiles essentielles de deux plantes aromatiques de la pharmacopée Ivoirienne. *European Journal of Scientific Research*. 1: 94-103.

**Ozcan, M. 1999.** Antifungal properties of propolis. *Grasas y Aceites*, 50: 395-398.

**Ozenda, P., 2000.** Les Végétaux : Organisation et diversité biologique. Ed. Dunod .

**Padrini, F., Lucheroni, M.T. 1996.** Le grand livre des huiles essentielles .Paris, DE VECCHI (France), p207.

**Paolini, J. 2005.** Caractérisation des huiles essentielles par CPG/Ir, CPG/SM (IE et IC) et RMN du carbone-13 de *Cistus albidus* et de deux *Asteraceae endémiques* de Corse : *Eupatorium cannabinum subsp. corsicum* et *Doronicum corsicum*. Thèse Doct. Université de Corse.

**Parada, M., Carrio, E., Angels Bonet, M., Vallès, J. 2009.** Ethnobotany of the Alt Empordà region: Plant used in human tradition medicine. *Journal of Ethnopharmacology*, 124:609-618.

**Parada, M., Carrio, E., Angels Bonet, M., Vallès, J. 2009.** Ethnobotany of the Alt Empordà region: Plant used in human tradition medicine. *Journal of Ethnopharmacology*, 124 : 609-618.

**Paris, R., Moyse, M. 1965.** Précis de matière médicale. Edit. Masson. Paris, 412 P.

**Park, K., Choi, K. S., Kim, D. H., Choi, H., Kim, L. S., Bak, W. c., Choi, J. W. & Shin, S. C. 2006.** Fumigant activity of plant essential oils and components from horseradish (*Armoracia rusticana*), anise (*Pimpinella anisum*) and garlic (*Allium sativum*) oils against *Lycoriella ingenua* (Diptera: Sciaridae). *Pest Manage. Sci*, 62: 723-728.

**Prat, R., Mosiniak, M., Vonarx, V. 2005.** Les Fruits. La tomate : une baie. Biologie et Multimédia .Université Pierre et Marie Curie - UFR des Sciences de la Vie.

**Paquereau, J. 2013.** Au jardin des plantes de la Bible: botanique, symboles et usages. Au jardin des plantes de la Bible: botanique, symboles et usages, pp222.

**Periago, M. J., García-Alonso, J., Jacob, K., Olivares, A. B., Bernal, A. J., Iniesta, M. D. 2009.** Bioactive compounds, folates and antioxidant properties of tomatoes (*Lycopersicon esculentum*) during vine ripening. International Journal of Food Science and Nutrition, 60 (8):694–708.

**Perera, S., Trujillio, L., Santos, B. 2008.** La polilla del tomate (Tuta absoluta) Nueva laga en el cultivo del tomate, ED Agro Cpildo, 2p.

**Perombelon, M. C. M., Kelman, A. 1980.** Ecology of the soft rot erwinias. Annu Rev of Phytopathol, 18: 361–387.

**Pérombelon, M.C.M., Kelman, A. 1980.** Ecology of the soft rot erwinias. Annual Review of Phytopathology, 18, 361–87.

**Petit-Paly ,G., Rideau, M., Chenieux, J.C .1982.** Étude de quelques Rutacées à alcaloïdes II.– *Ruta graveolens* : revue botanique, chimique et pharmacologique (Étude particulière des alcaloïdes quaternaires quinoléiques). Plantes médicinales et phytothérapie, 16 (1): 55–72.

**Persoon, C.H. 1801.** Synopsis methodica fungorum ,1-706.

**Pharmacopée européenne. 2008.** Recommandations relatives aux critères de qualité des huiles essentielles. Agence Française de Sécurité Sanitaire des produits de santé (Afssaps).

**Pinto, E., Salgueirol, R., Carlos Cavaleiroc .Palmeira, A., Goncalves, M, J. 2007.** In vitro susceptibility of some species of yeasts and filamentous fungi to essential oils of *Salvia officinalis*. Industrial Crops and products, 26:135-141.

**Platzer N. 2002.** Application de la RMN à la détermination des structures. Base Documentaire, Techniques d'analyse, Dossier : P1092, vol. TA1. polytechnique de Bobo-Dioulasso, Burkina Faso, 61p.

**Popovici, C., Saykova, I., Tylkowski, B. 2009.** Evaluation de l'activité antioxydante des composés phénoliques par la réactivité avec le radical libre DPPH. Revue de Génie Industriel, 4 : 25-39.

**Portes ,E. 2008.** Synthèse et Etudes de Tétrahydrocurcuminoïdes : Propriétés Photochimiques et Antioxydantes, Applications à la Préservation de Matériaux d'Origine Naturelle. Thèse de doctorat Université Bordeaux I, p 44-46.

- Pouget ,M. 1980.** The soil-vegetation results in the southern steppes Algiers. Thesis doct, univ. Marseille III. 555p.
- Proestos, C.,Boziaris, I. S., Nychas, G. J. E., & Komaitis, M. 2006.** Analysis of flavonoids and phenolic acids in Greek aromatic plants: Investigation of their antioxidant capacity and antimicrobial activity. Food Chemistry, 95: 664–671.
- Pukalskas, A., Venskutonis, P.R., Salido, S., Waard, P.D., Van Beek, T.A., 2012.** Isolation, identification and activity of natural antioxidants from horehound (*Marrubium vulgare L*) cultivated in Lithuania. Food Chem, 130, 695-701.
- Puryilé Médah, B. 2009.** Evaluation de l'effet des extraits de plantes locales sur le développement de plantes de sorgho et la transmission de *Phoma sorghina*, agent de moisissure des grains. Mémoire de fin de cycle, Institut du Développement Rural, Université
- Puryilé Médah, B.2009.** Evaluation de l'effet des extraits de plantes locales sur le développement de plantes de sorgho et la transmission de *Phoma sorghina*, agent de moisissure des grains. Mémoire de fin de cycle, Institut du Développement Rural, Université polytechnique de Bobo-Dioulasso, Burkina Faso, 61p.
- Quezel, P., Santa, S. 1963.** Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales. Tome II. C.N.R.S. (Ed). Paris, 565p.
- Raaman, N., Natarajan, P., Swaminathan, A., Balan,L ., H,Laxmanan.2014.** *In vitro* propagation, qualitative phytochemical analysis and antioxidant activity of *Ruta chalapensis L.* Medicinal Plants, 6 :( 2).
- Raghav, S.K., Agrawal, C., Goswami, K., Das, H.R., 2006.** Anti-inflammatory effect of *Ruta graveolens L.* in murine macrophage cells. Journal of Ethnopharmacol, 104, 234-239.
- Randrianarivelo ,R., Sarter, S., Odoux, E., Brat, P ., Lebrun, M ., Romestand, B., Menut, C., Andrianoelisoa, H.S., Raheirmandimby, M et Danthu. P 2008.** Composition and antimicrobial activity of essential oils of *Cinnamosma fragrans*. Food Chemistry, 114,680-684.
- Rasooli, and Abyaneh, M.R. 2004.** Inhibitory effect of Thyme oils on growth and afltoxin production by *Aspergillus parasiticus*. Food Control, 15: 479-483.
- Rasooli I .,Owlia P. 2005.** Chemoprevention by thyme oils *Aspergillus paras iticus* growth and aflatoxin production. Rev Phytochemistry, 32 (9): 22-66.
- Rasooli, I., Rezaei, M.B., Allameh, A.2006.** Ultrstructural studies on antimicrobial efficacy of thym essential oil on *Listeria monocytogenes*, International Journal of Infectious Diseases, 10 (24) : 23-66.
- Regnault-Roger ,C. , Phillogéne, B.2008.** Past and current prospects for the use of botanicals and plant allelochemicals in integrated pest management .Pharmaceutical Biology, 46(1-2):41-52.

- Regnault-Roger, C. , Hamraoui.A. 1995.** Fumigant toxic activity and reproductive inhibition induced by monoterpenes on *Acanthoscelides obtectus* (Say) (Coleoptera), a bruchid of kidney bean (*Phaseolus vulgaris* L.). J. Stored Prod. Res, 31 : 291-299.
- Regnault-Roger, C., Vincent, C., Arnason, J.T. 2012.** Essential oils in insect control: low-risk products in a high-stakes world. Annu. Rev. Entomol,57:405–24.
- Ribéreau-Gayon, P .1968.** Les composés phénoliques des végétaux. Editions Dunod, Paris ,254 pp.
- Richard, H., Multon, J.L.1992.** Les arômes Alimentaires .Edition Technologie et documentation, Lavoisier(Paris).
- Richard, H., Peyron F. 1992.**Epices et aromates. Ed .Tec & Doc-Lavoisier.Paris.p :339.
- Rizk ,A.M. 1982.** Constituents of plants growing in Qatar. Fitoterrapia, 52 (2) : 35-42.
- Royer, M., Larbat, R., Bot, J., Adamowicz, S., Robin, C., 2013.** Is the C: N ratio reliable indicator of C allocation to primary and defense related metabolisms in tomato?. Phytochemistry, 88, 25-33.
- Rustaiyan, A, Khossravi ,M, Sultani-Lotfabadi, F, Yari, M, Masoudi, S, Monfared, A. 2002.** Constituents of the essential oil of *Ruta chalepensis* L. from Iran. J Essent Oil Res, 14:378–379.
- Said Hassane,S.O ., Satrani,B ., Ghanmi,M ., Mansouri, N., Mohamed,H ., Chaouch,A . 2011.** Activité antimicrobienne et composition chimique de l’huile essentielle de *Plectranthus aromaticus* Roxb. de l’Ile de la Grande Comore. Biotechnol. Agron. Soc. Environ, 15(2), 251-258.
- Salamci, E., Kordali, S., Kotan, R., Cakir, A., Kaya, Y., 2007.** Chemical composition, antimicrobial and herbicidal effects of essential oils isolated from Turkish *Tanacetum aucheranum* and *Tanacetum chiliophyllum* var. *chiliophyllum*. Biochem. Sys. Ecol,35, 569-581.
- Salvo,G., Manafzadeh,S., Ghahremaninejad,F., Tojibaev,K., Zeltner,L., Conti, E. 2011.** Phylogeny, morphology, and biogeography of *Haplophyllum* (Rutaceae), a species-rich genus of the Irano-Turanian floristic region.Systematics of Taxon.
- Salvo,G., Bacchetta,G., Ghahremaninejad,F., Conti,E.2008.** Phylogenetic relationships of Ruteae (Rutaceae): New evidence from the chloroplast genome and comparisons with non-molecular data. Molecular Phylogenetics and Evolution, 49 : 736–748.
- Sauvant D., 1988.** La composition et l’analyse des aliments. In : Jarrige R. (ed), Alimentation des Bovins, Ovins et Caprins, 305-314.INRA, Paris.
- Schilder, A.M.C., Gillett, J.M., Sysak, R.W., and Wise, J.C. 2002.** Evaluation of environmentally friendly products for control of fungal diseases of grapes. 10th International

conference on cultivation technique and phytopathological problems in organic fruit-growing and viticulture, Weinsberg, Germany, pp. 163–167.

**Schilder, A.M.C., Gillett, J.M., Sysak, R.W., and Wise, J.C. 2002.** Evaluation of environmentally friendly products for control of fungal diseases of grapes. 10th International conference on cultivation technique and phytopathological problems in organic fruit-growing and viticulture, Weinsberg, Germany, pp. 163– 167.

**Schmelzer, G.H., 2011.** *Zanthoxylum madagascariense* Baker. In: Schmelzer, G.H. & Gurib-Fakim, A. (Editeurs). PROTA (Plant Resources of Tropical Africa / Ressources végétales de l’Afrique tropicale), Wageningen, Pays Bas. Consulté le 27 juin 2017.

**Schmelzer, G.H., Gurib-Fakim, A. 2013.** Plantes médicinales 2. Edition Amazon, p17.

**Schmitt, A., Kunz, S., Nandi, S., Seddon, B., and Ernst, A. 2002.** Use of *Reynoutria sachalinensis* plant extracts, clay preparations and *Brevibacillus brevis* against fungal diseases of grape berries, 10<sup>th</sup> International conference on cultivation technique and phytopathological problems in organic fruit-growing and viticulture, Weinsberg, Germany, pp. 146-151. Scientific Publishers.

**Scimeca, D.2007.** Les plantes du bonheur, Ed. Alpen, p.12-17.

**Scora, R.W. 1973.** Essential leaf oil variability in green, variegated and albino foliage of *Myrtus communis*. Phytochem.12: 153-155.

**Sengul ,M., Yildiz,H., Gungor ,N., Cetin, B., Eser, Z., Ercisli, S. 2009.** Total phenolic content, antioxidant and antimicrobial activities of some medicinal plants. Pak. J. Pharm. Sci, 22: 102-106.

**Sens-Olive,G. 1979.** Les huiles essentielles - généralités et définitions. *Traité de phytothérapie et d'aromathérapie*, éd. Maloine.

**Sen-Sung ,C., Ju-Yun, L., Chun-Ya ,L., Yen-Ray, H., Mei-Chun, L., Wen-Jer, W., Shang-Tzen, C.2008.** Terminating red imported fire ants using *Cinnamomum osmophloeum* leaf essential oil. Bioresource Technology ,99: 889 – 893.

**Shankara, N., van Lidt de Jeude, J., de Goffau, M., Hilmi, M., van Dam, B. 2005.** La culture de la tomate production, transformation et commercialisation, PROTA - Fondation Agromisa et CTA, Wageningen, 105 p.

**Sharma ,N. and Tripath ,A. 2008.** Effects of *Citrus sinensis* (L.) Osbeck epicarp essential oil on growth and morphogenesis of *Aspergillus niger* (L.) Van Tieghem. *Microbiol. Res*, 163(3):337-44.

**Shehadeh, M.B., Afifi, F.U., Abu-Hamdah, S.M.2007.** Platelet aggregation inhibitors from aerial parts of *Ruta chalepensis* grown in Jordan. *Integrative Medicine Insights*, 2: 35–39.

**Shryock, T. R., Apley, M., Jones, R. N., Lein, D. N., Thornsberry, C., Walker, R. D., Watts, J. L., White, D. G., and Wu, C. C. 2002.** *NCCLS*. Performance Standards for

Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria Isolated from Animals; Approved Standard–Second Edition. USA.

**Shryock, T. R., Apley, M., Jones, R. N., Lein, D. N., Thornsberry, C., Walker, R. D., Watts, J. L., White, D. G., and Wu, C. C. 2002.** Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria Isolated from Animals; Approved Standard–Second Edition. USA: NCCLS.

**Shuib, N.A., Iqbal, A., Akmal Sulaiman, F., Razak, I., Susanti, D. 2015.** Antioxidant and antibacterial activities of *Ruta Angustifolia* extract. *Journal Teknologi (Sciences & Engineering)*, 77:25 101–105.

**Silano, V., Delbò, M. 2008.** Assessment report on *Foeniculum vulgare* Miller. European Medicines Agency. London, 23p.

**Silou, T., Malanda, M., & Loubaki, L. 2004.** Optimisation de l'extraction de l'huile essentielle de *Cymbopogon citratus* grâce à un plan factoriel complet. *Journal of food engineering* 65, 219 – 223.

**Sipailiene, A., Venskutonis, P.R., Baranauskiene, R. & Sarkinas, A. 2006.** Antimicrobial Activity of commercial samples of thyme and marjoram oils. *Journal of Essential Oil Research*, 18: 698-703.

**Skerman, B. D., McGowan, V., Sneath, H. A. 1980.** Approved lists of bacterial names. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 30, 225-420.

**Snyder, L.R., Kirkland, J.J., Dolan, J.W. 2009.** Introduction to modern liquid chromatography, 3ème édition. New-York : éd. John Wiley & Sons, pp960

**Sombié, P.A.E.D., Hilou, C., Mounier, A.Y., Coulibaly, M., Kiendrebeo, M., Millogo, J.F., Nacoulma, O.G. 2011.** Antioxydant and anti-inflammatory activities from Galls of *Guiera senegalensis* J.F.Gmel (Combretaceae). *Journal of medicinal plant*, 5(4):448-461.

**Somda, L., Leth, V. & Sérémé, P. 2007.** Antifungal effect of *Cymbopogon citratus*, *Eucalyptus camaldulensis* and *Azadirachta indica* Oil Extracts on Sorghum Seed-Borne Fungi. *Asian Journal of Plant Sciences*, 6 (8): 1182-1189.

**Soylu, E.M., Yigitba, H., Tok, F.M., Soyly, S., Kurt, S., Baysal, Ö. and Kaya, A.D. 2005.** Chemical composition and antifungal activity of the essential oil of *Artemisia annua* L. against foliar and soil-borne fungal pathogens. *Journal of Plant Diseases and Protection*, 112 (3) :229–239.

**Spichiger, R.E., Savolainen, V.V., Figeat, M., Jeanmonod, D. 2002.** Botanique systématique des plantes à fleurs. Ed. Presses polytechniques et universitaires romandes, 413p.

**Stanescu, U., 2010.** The chemical profile of essential oils obtained from fennel fruits (*Foeniculum vulgare* Mill.). *Farmacía*, 58 (1):46-54.

**Stashenko, E.E., Acosta, R., Martínez, J.R. 2000.** High-resolution gas-chromatographic analysis of the secondary metabolites obtained by subcritical fluid extraction from Colombian rue (*Ruta graveolens* L.). *J. Biochem. Biophys. Methods*. 43:379–390.

**Steck, W., Bailey, B.K. 1969.** Leaf coumarins of *Angelica archangelica*, *Can J Chem*, 47: 2425-2430

**Stephan Z.A, 2004.** Iraq. <http://www.fao.org/docrep/v9978e/v9978e0g.htm>

**Stevenson, W. R., R., Loria, G. D. Franc., Weingartner, D. P. 2001.** Compendium of potato diseases, 2<sup>nd</sup> ed, *Journal of Agricultural Science* Item No. 42759

**Suchiya, H., Sato, M., Miyazaki, T., Fujiwara, S., Tanigaki, S., Ohyama, M., Tanaka, T., Linuma, M., 1996.** Comparative study on the antibacterial activity of phytochemical flavanones against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J. Ethnopharmacol*, 50: 27-34.

**Tampe, J., Parra, L., Huaiquil, K. and Quiroz, A. 2016.** Potential repellent activity of the essential oil of *Ruta chalepensis* (Linnaeus) from Chile against *Aegorhinus superciliosus* (Guérin) (Coleoptera: Curculionidae). *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*, 16 (1): 48-59.

**Tiendrebéogo, A. 2011.** Etude de l'efficacité des extraits de plantes locales (*Eclipta alba* L., *Cymbopogon citratus* (D.C.) Stapf, *Agavae sisalana* Perr. et *Lippia multiflora* Moldenke) contre les principaux champignons seminicoles du riz. Mémoire de fin de cycle, Institut du Développement Rural, Université polytechnique de Bobo-Dioulasso, Burkina Faso, 67p.

**Tlili-Ait Kaki, Y., Bennadja, S., Chefrour A. 2013.** Revalorisation d'une essence endémique: le sapin de Numidie (*Abies numidica*). *Flora Mediterranea*, 23: 123-129.

**Tomi, F., Casanova, J. 2000.** Contribution de la RMN du carbone-13 à l'analyse des huiles essentielles. *Annales Fals. & Expertise Chim.* 93 : 313-330.

**Toth, I. K., Birch, P. R. J. 2005.** Rotting softly aTomnd stealthily. *Curr. Opin. Plant Biol*, 8(4) 424–9.

**Tounsi, M.S., Wannes, W.A., Ouerghemmi, I., Msaada, K., Smaoui, A., Marzouk, B. 2011.** Variation in essential oil and fatty acid composition in different organs of cultivated and growing wild *Ruta chalepensis* L. *Ind Crop Prod*, 33: 617–623.

**Townsend, C.C., 1986.** Taxonomic revision of the genus *Haplophyllum* (Rutaceae). *Hooker's Icon. Plantarum*, 40: 1–336.

**Trease, E., Evans, W.C .1987.** Pharmacognosie, Billiaire Tindall. London 13 th Edition. In Karumi Y, Onyeyili PA et Ogugduaja VO, 2004. Identification des principes actifs de l'extrait de feuilles de *M. balsamia* (Baume du pomme). Journal of Medicine and scientific, 4(3), 179-182.

**Trottin-caudal , Y. 2011.**Maitrise de la protection intégrée (tomate sous serres et abris).Edition centre technique interprofessionnel des fruits et légumes. Paris.

**Turkmen, N., Velioglu, Y. S., Sari. F.,Polat, G., 2007.** Effect of extraction conditions were total polyphenol content and antioxidant Measured and antibacterial activities of black tea. Journal of molecules, 12, 484-496.

**Tzakou, O. , Couladis, M. 2001.** Essential oil of *Ruta chalepensis* L. from Greece. J.Essent. Oil Res. 13(4): 258-259.24.

**Utree, A., Slump, R.A, Steging, G. & Smid, E.J. 2002.** Antimicrobial activity of carvacrol on rice. Journal of food protection.63:620-624.

**Ulubelen, A., Terem, B. 2001.** Alkaloids and from roots of coumarins *Ruta chalepensis*. Phytochemistry. 27 (2): 650-651.

**Valnet, J.1984.** . Aromathérapie , dixième édition, Paris

**Verzera, A, Mondello ,L, Ragusa ,S, Dugo ,G. 2000.** Essential oil of the leaves of a typical mediterranean plant: note II. *Ruta chalepensis* L. (Rutaceae). Essenze e derivati agrumari. 70:207–210.

**Viennot-Bourgin,G. 1965.** Encyclopédie mycologique XXVII. Lechevalier, Paris 350 p.

**Vieira, M.M. 2007.** Mineira do tomateiro (*Tuta absoluta*) uma nova ameaça à produção de tomate. V Seminário Internacional do Tomate de Industria, Mora, 23 p.

**Vitti ,D.M.S.S., Abdalla, A.L., Bueno, I.C.S., Silva-Filho, J.C., Costa, C., Bueno, M.S. 2005.** Do all tannins have similar nutritional effects, a comparison of three Brazilian fodder legumes. Animal Feed Science and Technology, 119 : 345–361.

**Viuda-Martos ,M., Ruiz-Navajas, Y., Fernandez-Lopez, J. & Perez-Alvarez, J.A. 2008.** Antibacterial activity of different essential oils obtained from spices widely used in Mediterranean diet. Int. J. Food Sci. Technol, **43**, 526-531.

**Vokou, D., Kokkini, S. & Bressiere, J.M.1988.** *Origanum onites*( Lamiaceae) in Greece Distribution , volatile oil yield, and composition . Economy Botanic, 42:407-412.

**Wan, J., Wilcock, A. & Coventry, M.J. 1998.** The effect of essential oils of basil on the growth of *Aeromonas hydrophila* and *Pseudomonas fluorescens*. Journal of Applied Microbiology. 84: 152-158.

- Wannissorn, B., Jarikasem, S., Siriwangachai, T., Thubthimthed, S. 2005.** Antibacterial properties of essential oils from Thai medicinal plants. *Fitoterapia*. 76: 233-236.
- Weir, T.L., Huff, D.R., Christ, B.J. and Romaine, C.P. 1998.** RAPD-PCR analysis of genetic variation among isolates of *Alternaria solani* and *Alternaria alternata* from potato and tomato. *Mycologia*, 90: 813 - 821.
- Went, F. W. 1957.** The experimental control of plant growth. *Chronica botanica Comp.*, Ed. Waltham, p. 81-83.
- Verma,, N. , Verma. S. 2010.** *Alternaria* diseases of vegetable crops and new approaches for its control. *Asian J. Exp. Biol. Sci*, 1(3): 681-692.
- Werker, E., Putievsky,E.,Ravid, U., Dudai, N.,Katzir, I.1993.** Glandular Hairs and Essential Oil in Developing Leaves of *Ocimum basilicum* L. (*Lamiaceae*), *Annals of botany*, 71 (1): 43-50.
- Whitehead, N.A., Barnard, A.M., Slater, H., Simpson, N.J., Salmond, G.P.2001.** Quorum-sensing in Gram-negative bacteria. *Microbiol Rev*, 25: 365–404.
- Yen, T.B., Chang, S.T. 2008.** Synergistic effects of cinnamaldehyde in combination with eugenol against wood decay fungi. *Bioresource Technology*, 99: 232-236.
- Zambonelli, A., Zechini, A., Binchi ,A. and Albasin, A. 1996.** Effects of essential oils on phytopathogenic fungi *in vitro*. *J. Phytopathol*, 144: 491-494.
- Zani, F., Massimo, G., Benvenuti, S., Bianchi, A., Albasini, A., Melegari, M., Vampa, G., Bellotti, A. & Mazza, P. 1991.** Studies on the Genotoxic Properties of Essential Oils with Bacillus subtilis rec-Assay and Salmonella/Microsome Reversion Assay. *Planta Medica*, 57: 237-241.
- Zaoual,Y., Chograni, H., Trimech, R. and Boussaid, M. 2013.** Changes in essential oil composition and phenolic fraction in *Rosmarinus officinalis* L. var. *typicus* Batt. organs during growth and incidence on the antioxidant activity. *Ind. Crops. Prod.* 43: 412-419.
- Zeichen, H.R., Rey, A., Argañaraz, E., Bindstein, E., 2000.** Perinatal toxicology of *Ruta chalepensis* (Rutaceae) in mice. *Journal of Ethnopharmacology*, 69, 93-98.
- Zhang, L., Ravipati, A.S., Koyyalamudi, S.R., Jeong, S.C., Reddy ,N., Smith, P.T., Bartlett, J., Shanmugam. K., Münch, G., Wu, MJ, 2011.** Antioxidant and anti-inflammatory activities of selected medicinal plants containing phenolic and flavonoid compounds . *J. Agric. Food. Chem*, 59: 12361–12367.
- Zohair, H.M., Hamed, J.J., May ,A. et Ali, Z.S. 1989.** Insecticidal effects of *Haplophyllum tuberculatum* against *Culex quinquefasciatus*. *Journal of Crude Drug Research*, 27: 17-21.

# ANNEXES

## Annexe I

**Tableau 1:** Teneur en eau, matière sèche, organique, minéral et taux d'humidité (exprimée en %) pour les trois espaces étudiées.

PLANTES	Humidité %	Matière sèche %	Matière sèche %	
			Matière organique%	Matière minérale %
<i>Haplophyllum tuberculatum</i> (Fosk.)A. Juss (région d'Adrar)	29,0 ± 2,51	71,0 ± 2,51	64,0 ± 3,05	7,00 ± 2,64
<i>Ruta Chalepensis</i> .L (région de Mostaganem)	78,08± 2,89	21,91 ± 2,89	18,66 ± 3,39	3,25 ± 0,5
<i>Ruta angustifolia</i> Pers. Bordj Bou Arreridj.	31,08 ± 1,18	68,08 ± 1,01	62,08 ± 1,12	7,00 ± 0,5

**Tableau 2 :** Analyse de variance (matière organique)

	S.C.E	DDL	C.M.	TEST F	PROBA	E.T.	C.V.
VAR.TOTALE	0,546	8	0,068				
VAR.FACTEUR (espèces)	0,545	2	0,273	8100,956	0		
VAR.RESIDUELLE	0	6	0			0,006	1,94%

**Tableau 3:** Analyse de variance (matière minérale)

	S.C.E	DDL	C.M.	TEST F	PROBA	E.T.	C.V.
VAR.TOTALE	0,136	8	0,017				
VAR.FACTEUR (espèces)	0,136	2	0,068	2039,107	0		
VAR.RESIDUELLE	0	6	0			0,006	4,20 %

**Tableau 4 : Analyse de variance (matière sèche)**

	S.C.E	DDL	C.M.	TEST F	PROBA	E.T.	C.V.
VAR.TOTALE	0,411	8	0,051				
VAR.FACTEUR (espèces)	0,41	2	0,205	3072,625	0		
VAR.RESIDUELLE	0	6	0			0,008	1,58 %

**Tableau 5 : Analyse de variance (Humidité)**

	S.C.E	DDL	C.M.	TEST F	PROBA	E.T.	C.V.
VAR.TOTALE	0,545	8	0,068				
VAR.FACTEUR (espèces)	0,491	2	0,246	27,168	0,00133		
VAR.RESIDUELLE	0,054	6	0,009			0,095	15,33 %

## Annexe 2 :

Tableau 6 : Analyse de variance (Dosage des polyphénols)

	S.C.E	DDL	C.M.	TEST F	PROBA	E.T.	C.V.
VAR.TOTALE	11,383	17	0,67				
VAR.FACTEUR 1(espèces)	3,282	2	1,641	946,734	0		
VAR.FACTEUR 2 (organes)	7,865	1	7,865	4536,921	0		
VAR.INTER F1*2	0,216	2	0,108	62,192	0		
VAR.RESIDUELLE 1	0,021	12	0,002			0,042	2,93%

Tableau 7 : Analyse de variance (Dosage des flavonoïdes)

	S.C.E	DDL	C.M.	TEST F	PROBA	E.T.	C.V.
VAR.TOTALE	0,002	17	0				
VAR.FACTEUR 1(espèces)	0,002	2	0,001	1175,358	0		
VAR.FACTEUR 2 (organes)	0,001	1	0,001	812,676	0		
VAR.INTER F1*2	0	2	0	163,43	0		
VAR.RESIDUELLE 1	0	12	0			0,001	4,68%

### Annexe 3 : Préparation des réactifs pour les tests phytochimiques

#### Composition des réactifs

##### Liquueur de Fehling

###### Solution A

CUSO<sub>4</sub> .....35 g  
Eau distillée .....500 ml contenant 5 ml d'H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>  
Laisser refroidir puis compléter au litre avec l'eau distillée

###### Solution B

Sel de Seignette .....150 g  
Eau distillée .....500 ml  
Refroidir puis ajouter 300 ml de lessive de soude non carbonaté, compléter au litre avec l'eau distillée.

Mélanger les deux solutions à volumes égaux (à mélanger juste avant l'emploi).

##### Réactif de MAYER :

Chlorure de mercure.....1,36 g  
Iodure de potassium.....5 g  
Eau distillée.....qsp 100 ml

##### Réactif de BOUCHARDAT

Iode.....2 g  
Iodure de potassium.....2g  
Eau distillée.....qsp 100 ml

##### Réactif de Dragendorff:

Il s'agit d'un mélange (V/V) de deux solutions A et B.

- Solution A

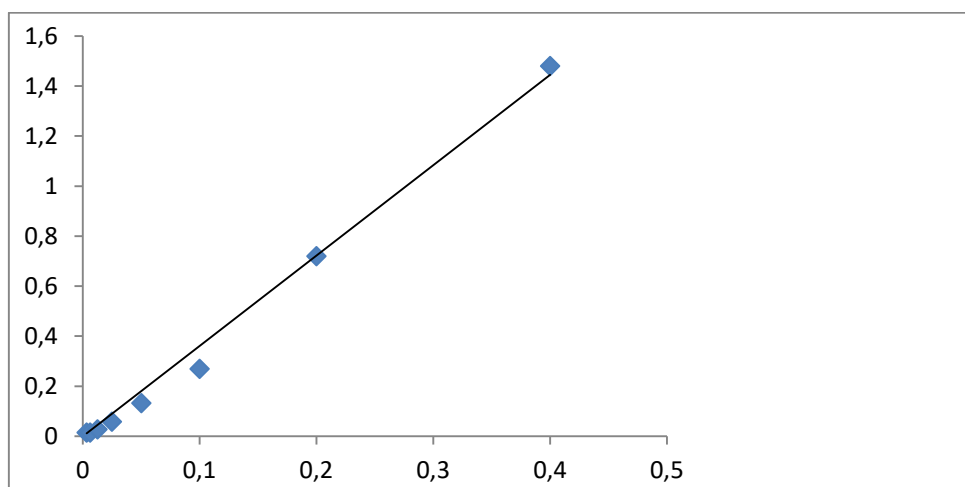
Nitrate de bismuth.....1,7 g  
Acide tartrique concentré.....20 g  
Eau distillée..... 100 ml

- Solution B

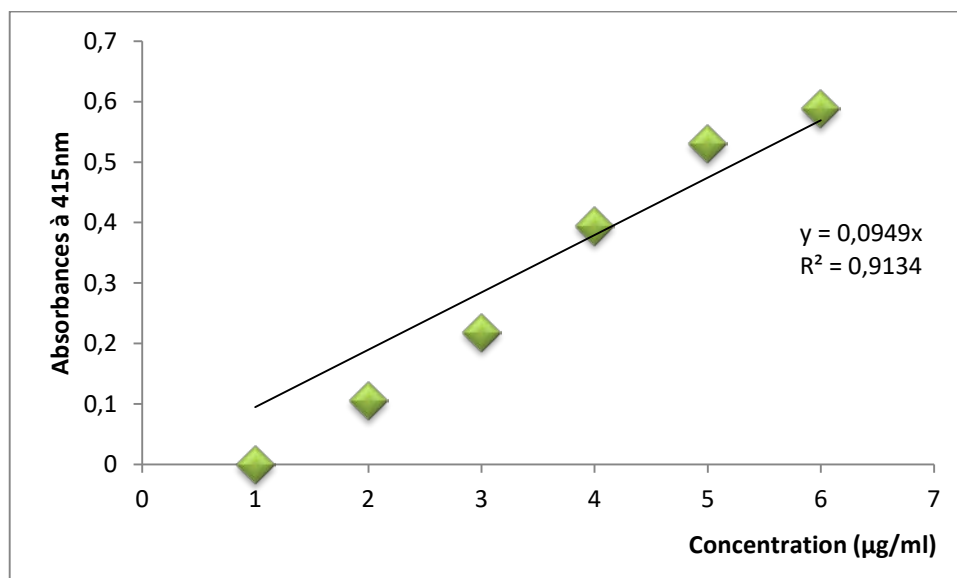
Iodure de potassium.....10 g  
Eau distillée ..... 100 ml

Le mélange a été ensuite additionné de 10 g d'acide tartrique. Une agitation de 30mn a été nécessaire après avoir ramené son volume à 100 ml avec de l'eau distillée.

## Annexe 4



**Figure 1:** Droite d'étalonnage de l'acide gallique.



**Figure 2:** Courbe d'étalonnage de la quercétine.

**Tableau 8 :** Teneurs en polyphénols totaux et des flavonoïdes dans les feuilles et les tiges des trois espèces étudiées (mg EAG/g MS).

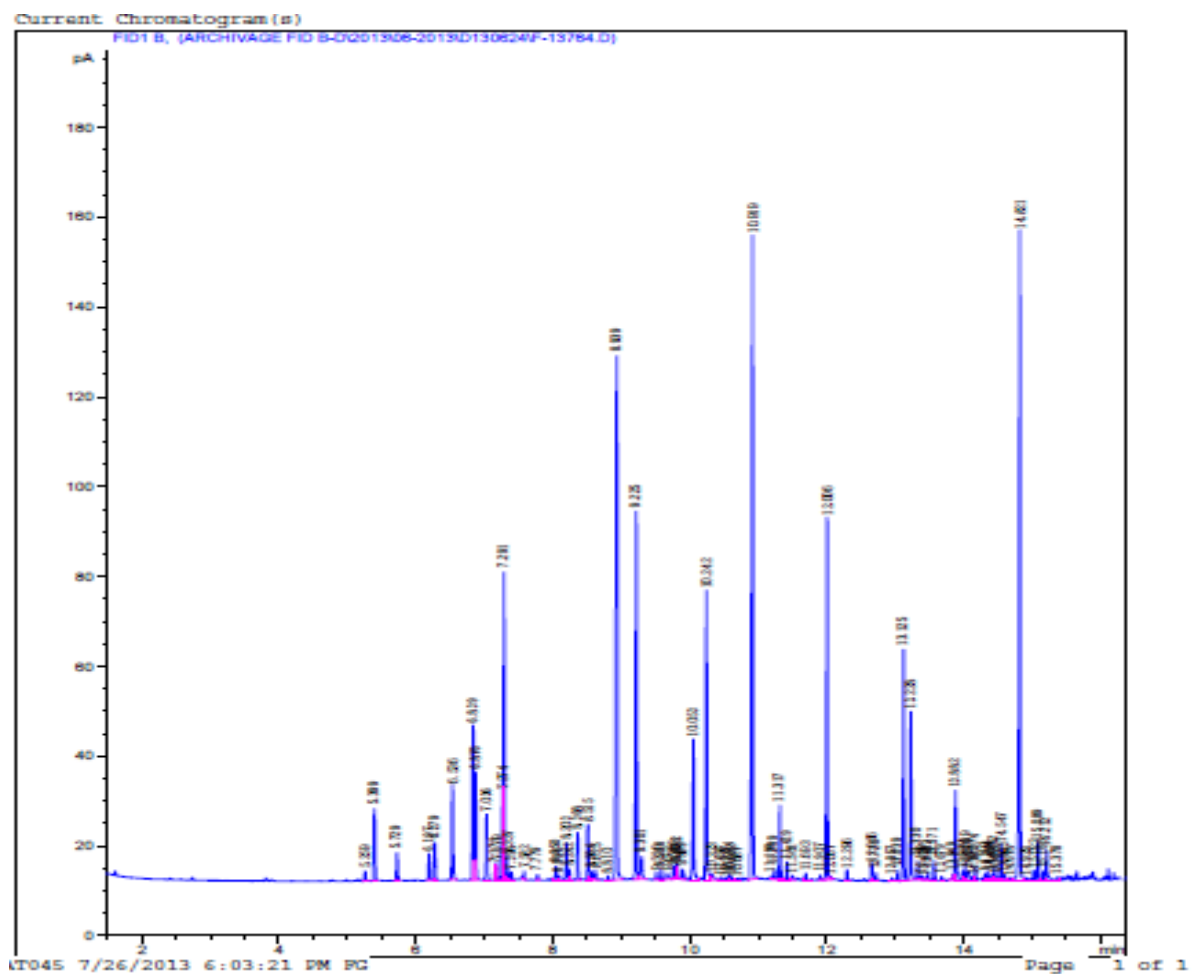
Espèces	Organes	Taux des polyphénols totaux (mg EAG/g MS) (a).	Taux des flavonides (mg EAG/g MS) (b).
<i>Ruta angustifolia</i> (Région EST)	Tiges	1,124 ± 0,03	0,01±0,001
	Feuilles	2,72 ± 0,09	0,02±0,004
<i>Ruta chalepensis</i> (Région OUEST)	Tiges	0,81 ± 0,36	0,02±0,03
	Feuilles	2,14 ± 0,16	0,04±0,03
<i>Haplophyllum tuberculatum</i> (Région Sud)	Tiges	0,35 ± 0,032	0,006±0,06
	Feuilles	1,5 ± 0,05	0,009±0,06

(a) mg d'équivalent d'acide gallique par gramme d'extrait sèche (mg EAG/g d'extrait sèche).

(b) mg d'équivalent de quercétine par gramme d'extrait sèche (mg EQ/g).

**Tableau 9 :** Relation entre activité antioxydante et la teneur des polyphenols (Régression multiple)

	Coef	Stdev	Std Coef	t-ratio	P
Constant	0,02	0,00	0,00	6,44	0,00
Polyphenols	-0,01	0,00	-0,87	-3,50	0,01



**Figure 3 :** Chromatogramme de l'huile essentielle de *Haplophyllum tuberculatum* par GC/FID.

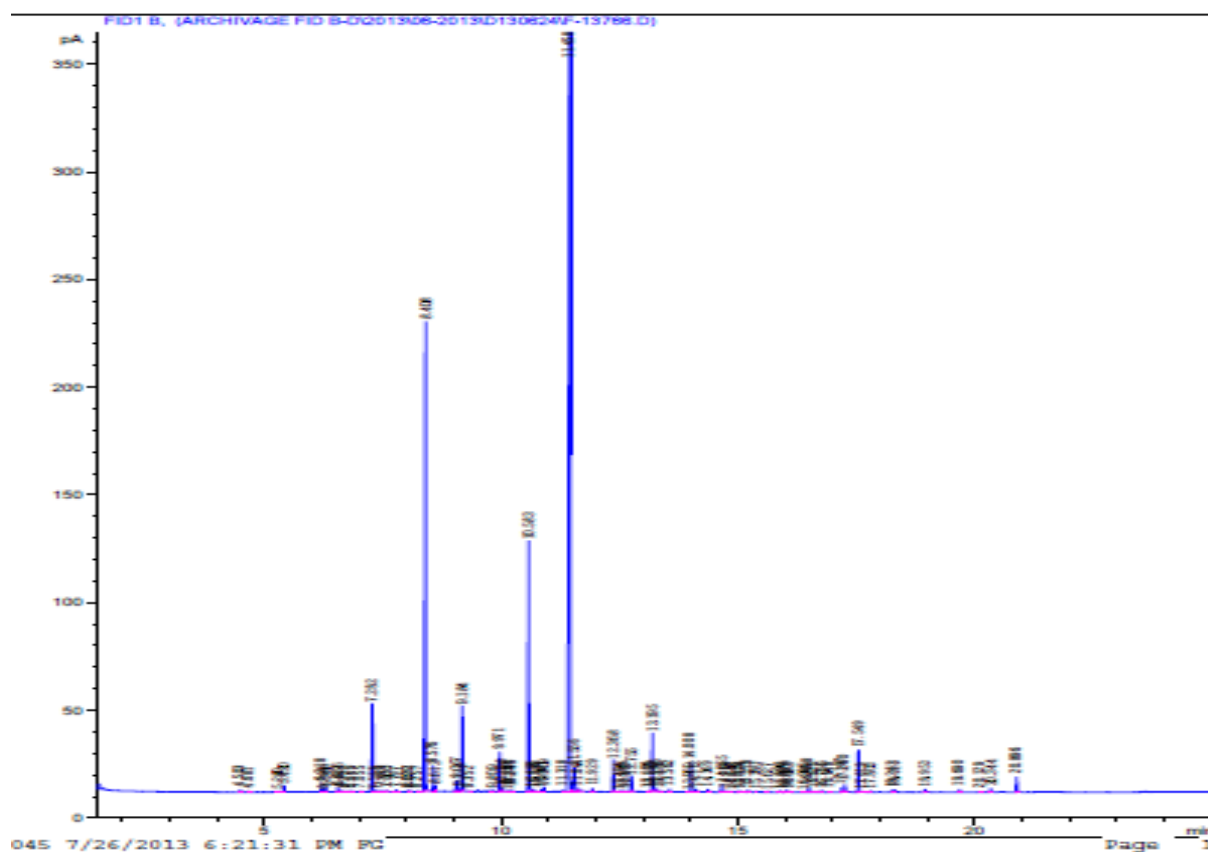


Figure 4 : Chromatogramme de l'huile essentielle de *Ruta angustifolia* par GC/FID.

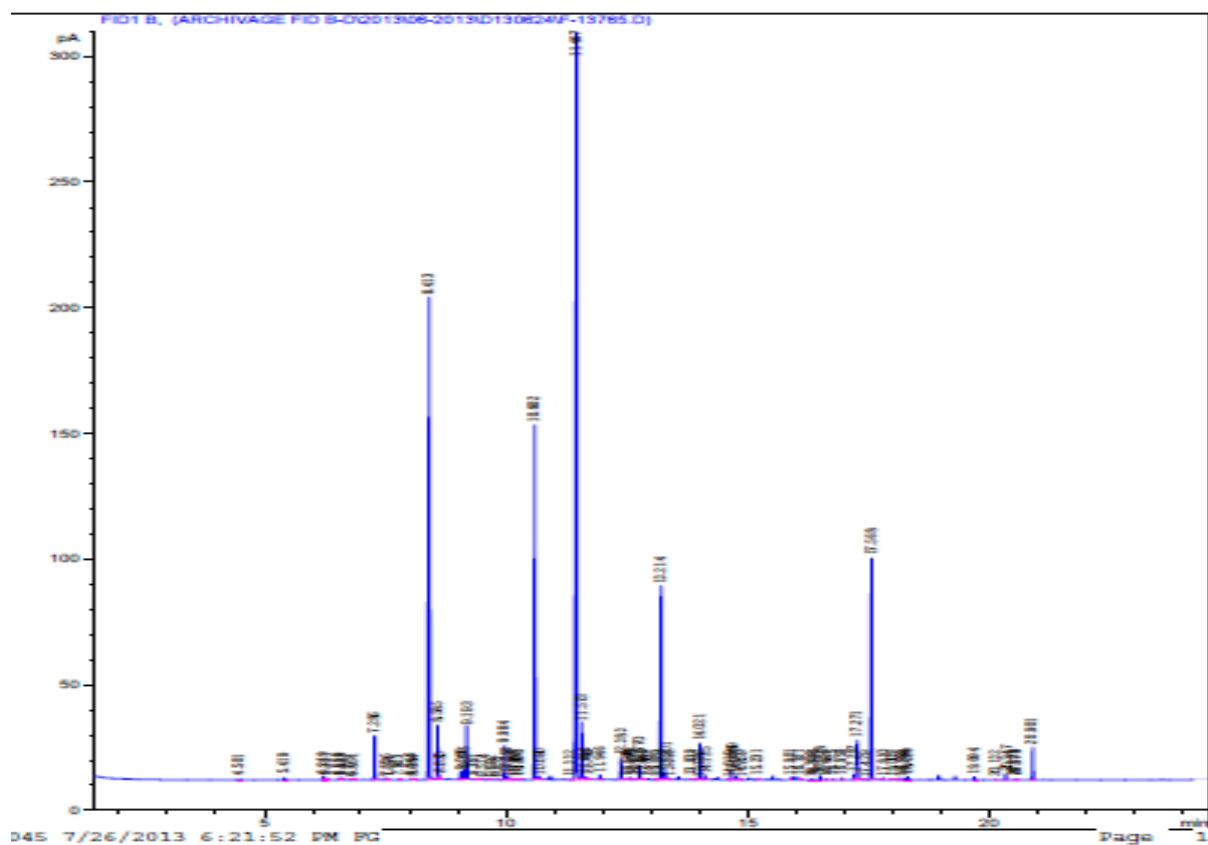


Figure 5 : Chromatogramme de l'huile essentielle de *Ruta chalepensis* par GC/FID.

## Annexe 5 : Effet de l'huile essentielle de *Ruta chalpensis vis-à-vis*

### *Tuta absoluta*

Tableau 10 : Résultats de l'activité larvicide après 24h :

Doses	0 µ/ml	2µ/ml	4 µ/ml	6µ/ml	8µ/ml	10µ/ml
Nombre de larves mortes	0	3	3	4	5	7
Mortalité corrigée(%)	0	15	15	20	25	35

Tableau 11 : Résultats de l'activité larvicide après 48h :

Doses	0 µ/ml	2µ/ml	4µ/ml	6 µ/ml	8 µ/ ml	10 µ/ml
Nombrede larves mortes	0	3	4	7	7	7
Mortalité corrigée(%)	0	15	20	35	35	35

Tableau 12 : Résultats de l'activité larvicide après 72h :

Doses	0 µ/ml	2 µ/ml	4 µ/ml	6 µ/ml	8 µ/ml	10 µ/ml
Nombre de larves mortes	0	4	6	7	7	8
Mortalité corrigée(%)	0	20	30	35	35	40

**Tableau 13** : Résultats du test de NEWMAN et KEULS concernant l'effet de l'espèce sur le taux de mortalité des larves de *Tuta absoluta*

F1	LIBELLES	MOYENNES	GROUPES HOMOGENES	
2.0	H	2,13	A	
1.0	R	1,519		B

**Tableau 14**: Résultats du test de NEWMAN et KEULS concernant l'effet de la concentration sur le taux de mortalité des larves de *Tuta absoluta*

F2	LIBELLES	MOYENNES	GROUPES HOMOGENES	
6.0	c5	2,722	A	
4.0	c3	2,667	A	
2.0	c1	2,278	A	
5.0	c4	1,278		B
3.0	c2	1,111		B
1.0	c0	0,889		B

**Tableau 15**: Résultats du test de NEWMAN et KEULS concernant l'effet du temps sur le taux de mortalité des larves de *Tuta absoluta*

F3	LIBELLES	MOYENNES	GROUPES HOMOGENES	
3.0	h72	2,361	A	
2.0	h48	1,944	A	
1.0	h24	1,167		B

## Annexe 6 :

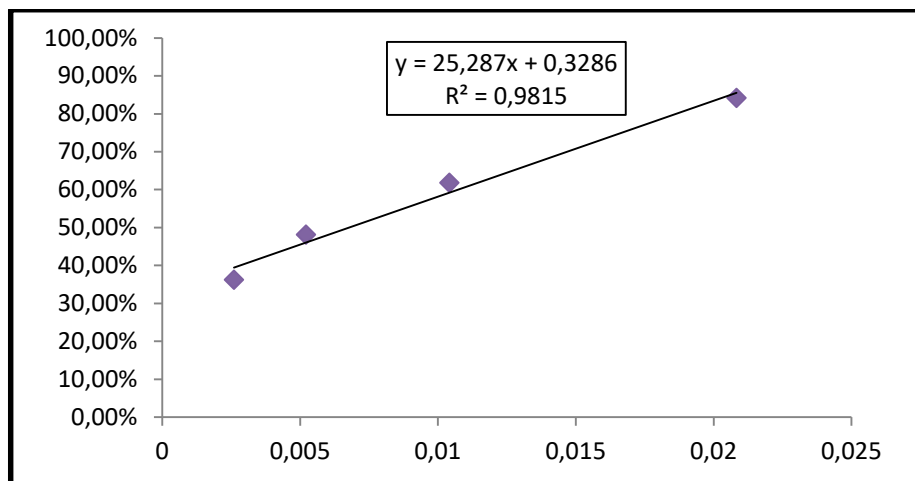


Figure 3: IC50 du témoin positif (DPPH).

**Préparation du milieu de culture « Potato Dextrose Agar (PDA) » :****Composition :**

Pomme de terre .....200g.

Agar agar .....20g.

Glucose .....20g.

L'eau distillé .....1000g.

- La pomme de terre est épluchée, puis coupée en petit morceaux, puis jetées dans une quantité suffisante d'eau distillée en ébullition et cuits pd 30min.
- Après décantation, nous filtrons sur papier filtre, ce filtrat est ensuite ajusté avec l'eau distillée jusqu'à un litre (1000ml).
- On y ajoute du glucose, puis on stérilise le milieu à 120°C, pendant 20min.

**Gélose de Mueller Hinton**

Infusion de viande de bœuf:.....300,0 ml

Peptone de caséine:.....17,5 g

Amidon de maïs:.....1,5 g

Agar:.....17,0 g

pH.....7,4

**Gélose nutritive (GN)**

Extrait de viande .....1g/l.

Extrait de levure ..... 2,5g/l

Peptone .....5g/l.

Chlorure de sodium.....5g/l

Agar.....5g/l

pH .....7

## Annexe 7 :

**Tableau 16 : Analyse de variance du Taux d'inhibition (%) d'*Alternaria solani* traité à l'extrait méthanoïque des feuilles et des tiges des trois espèces étudiées.**

	S.C.E	DDL	C.M.	TEST F	PROBA	E.T.	C.V.
VAR.TOTALE	627,103	29	21,624				
VAR.FACTEUR 1(plantes)	267,318	2	133,659	31,686	0,00023		
VAR.FACTEUR 2(organes)	20,901	1	20,901	4,955	0,05499		
VAR.FACTEUR 3 (doses)	202,315	4	50,579	11,991	0,00214		
VAR.INTER F1*2	20,136	2	10,068	2,387	0,153		
VAR.INTER F1*3	74,467	8	9,308	2,207	0,14168		
VAR.INTER F2*3	8,221	4	2,055	0,487	0,74701		
VAR.RESIDUELLE 1	33,746	8	4,218			2,054	2,16%

**Tableau 17: Analyse de variance du Taux d'inhibition (%) de *FORL* traité à l'extrait méthanoïque des feuilles et des tiges des trois espèces étudiées.**

	S.C.E	DDL	C.M.	TEST F	PROBA	E.T.	C.V.
VAR.TOTALE	3389,826	29	116,891				
VAR.FACTEUR 1(plantes)	516,627	2	258,313	51,358	0,00005		
VAR.FACTEUR 2(organes)	0,231	1	0,231	0,046	0,82967		
VAR.FACTEUR 3 (doses)	2442,674	4	610,669	121,413	0		
VAR.INTER F1*2	167,338	2	83,669	16,635	0,0016		
VAR.INTER F1*3	72,29	8	9,036	1,797	0,21208		
VAR.INTER F2*3	150,428	4	37,607	7,477	0,00869		
VAR.RESIDUELLE 1	40,237	8	5,03			2,243	2,85 %

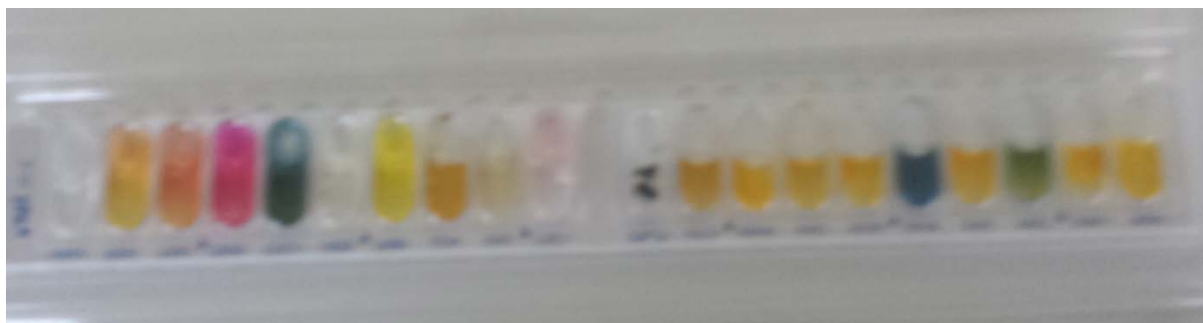
**Tableau 18: Analyse de variance du Taux d'inhibition des trois champignons traité à l'huile essentielle des trois espèces étudiées.**

	S.C.E	DDL	C.M.	TEST F	PROBA	E.T.	C.V.
VAR.TOTALE	77183,3 4	44	1754,167				
VAR.FACTEUR 1(plantes)	22177,6 3	2	11088,81	71,898	0		
VAR.FACTEUR 2(organes)	6939,02 3	2	3469,512	22,496	0,00003		
VAR.FACTEUR 3 (doses)	7623,75 8	4	1905,939	12,358	0,00011		
VAR.INTER F1*2	23948,7	4	5987,176	38,82	0		
VAR.INTER F1*3	12799,3 8	8	1599,923	10,374	0,00006		
VAR.INTER F2*3	1227,16 8	8	153,396	0,995	0,47633		
VAR.RESIDUELLE 1	2467,67 6	16	154,23			12,419	42,30 %

## Annexe 8 :

Photo 1 : Identification biochimique par API20E d'*Erwinia carotovora*

A : avant



B : après

Tableau 19 : Identification biochimique par API20E

FAIBLE DISCRIMINATION					
Galerie	API 20 E V4.1				
Profil	1 2 0 5 5 7 3				
Note(s)	POSSIBILITE D' <i>Erwinia</i> spp				
Taxons significatif(s)	% ID	T	Test(s) à l'encontre		
<i>Rahnella aquatilis</i>	78.4	1.0			
<i>Pantoea</i> spp 2	17.2	0.99			
<i>Serratia ficaria</i>	2.6	0.82	GEL 90%		
<i>Enterobacter cloacae</i>	1.1	0.72	ADH 82%	ODC 92%	
Taxon suivant	% ID	T	Test(s) à l'encontre		
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ssp <i>pneumoniae</i>	0.1	0.57	URE 75%	INO 99%	
Test(s) complémentaire(s)	GLUCOSEg	DNase	5KG	MOB	
<i>Enterobacter cloacae</i>	100%	0%	6%	94%	
<i>Pantoea</i> spp	20%	0%	24%	85%	
<i>Erwinia</i> spp	-(+)	-(+)	NT	85%	
<i>Rahnella aquatilis</i>	98%	0%	98%	6%	
<i>Serratia ficaria</i>	0%	100%	100%	100%	



## Chemical composition and antifungal activity of essential oils of *Haplophyllum tuberculatum* (Forssk.) A. Juss. from South Algerian

Saida Bergheul<sup>\*1</sup>, Abdellah Berkani<sup>1</sup>, Farida Saiah<sup>1</sup>, Rachid Djibaoui<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Department of Agricultural Science, University of Abdelhamid Ibn Badis, Mostaganem, Algeria

<sup>2</sup>Departments of Biology, University of Abdelhamid Ibn Badis, Mostaganem, Algeria

**Key words:** *Haplophyllum tuberculatu*, Antifungal activity, Essential oil, *Fusarium oxysporum f. sp. Radicis lycopersici*, *Botrytis cinerea*, *Alternaria solani*

<http://dx.doi.org/10.12692/ijb/10.5.97-105>

Article published on May 14, 2017

### Abstract

Utilization of natural products as control agents reveals a biological preventive approach to reduce significantly the use of pesticides and in particular fungicides. In the present study we determined chemical composition of an essential oil extracted from *Haplophyllum tuberculatum* (Forssk.) A. Juss. Three fungi tomato pathogens are tested to examine antifungal activity of the extracted oil. The essential oil was extracted by hydrodistillation and the chemical composition was determined by gas chromatography coupled with flame ionization detector (GC-FID). Various concentrations (2.5, 5, 10, 20 and 30 mg / ml) of the essential oil were used to investigate *in vitro* the antifungal activity on a solid agar medium against FORL, *B. cinerea* and *A. solani*. The percent of the fungal inhibition was calculated and the ranges of MICs were determined for each fungal isolate tested. The results indicate that the yield of essential oil obtained by hydrodistillation is 0.101%. The major components identified in the essential oil of *H. tuberculatum* were Piperitone (13.35%), Germacren-B (12.30%) and Beta-Phellandren (5.05%). In addition, the essential oil at 10mg / ml, 20mg / ml and 30mg/ml inhibited completely the growth of *B.cinerea*, *A.solani* and 90% of *FORL*. The two first concentrations were found to be the MIC of *A.solani* and *B.cinerea* respectively. The present study shows clearly the antifungal power of the essential oil of *H. tuberculatum*.

\* Corresponding Author: Saida Bergheul ✉ [Saidabergheul@yahoo.fr](mailto:Saidabergheul@yahoo.fr)

## Introduction

The use of essential oils in biological control becomes *very promising* and considered as one of scientific interest. The works carried out by some authors have noted the antiseptic properties of plants essential oils against clinical pathogens. However, very few studies have been carried out until this day on the antimicrobial effect of essential oil of *H. tuberculatum* against phytopathogenic microorganisms.

*Haplophyllum tuberculatum* (Forsk.) A. Juss. is a spontaneous perennial herb occurring throughout southern Algeria belonging to the *Rutaceae* family. This genus distributed throughout temperate and subtropical zones of Eurasia and the northern tropical zone of eastern Africa (Somalia) (Alatar *et al.*, 2012). The plant's chemical composition has been shown to vary as a function of geographic location and time of collection. It includes alkaloids, lignans, flavonoids and essential oils (Javidnia *et al.*, 2006).

Very few studies have been carried out until this date on the *Haplophyllum tuberculatum* products. This is why we found it interesting to analyze the essential oil of the cited plant and to study its antifungal activity against a number of plant pathogens belonging to *Fusarium oxysporium*, *Botrytic cinerea* and *Alternaria solani*.

## Material and methods

### Plant materials

The studied plant was harvested from Adrar during the flowering season in March 2014. The region of harvesting is situated in South Algeria (27 ° 52 '27 ") of the North and (0 ° 17' 37") of the West at an altitude of 257 meters. The botanical identification was made by Dr Sekkal.F / Z; the authenticated specimens were deposited in the herbarium of the plant ecology laboratory at Ahmed Ben Bella University 1 Oran (Algeria). The drying of the plant was carried out under the shade at an ambient temperature to preserve as much as possible the integrity of the molecules. They were then weighed and grinded with a mortar for further studies.

### Fungal strains tested

Three fungi belonged to *Fusarium Oxysporum f. sp. Radicis lycopersici* (FORL), *Botrytis cinerea* and *Alternaria solani* were used in the present study. They were isolated from a diseased tomato plant and characterized in Plant Protection Laboratory of Abd El Hamid Ibn Badis University (Mostaganem, Algeria). The three obtained fungi were activated and purified on PDA medium.

### Essential oil extraction and yield calculation

The extraction of the essential oil was carried out by hydrodistillation. 100 g of dry plant material were submitted to hydrodistillation with a Clevenger-type apparatus and extracted with 1000 ml of water for 120 minutes. The flask was surmounted by a column of 60 cm length connected to a refrigerant. The essential oil was obtained from organic phase using separating funnel and stored at 4 °C until used. The yield of essential oil was defined according to the Afnor standard (1988), it was calculated as the ratio between the mass of the essential oil obtained after extraction and the mass of the plant material used, using the equation:  $Y_{EO} \% = M_{EO} / M_{PM}$

$Y_{EO} \%:$  Extraction yield;

$M_{EO}:$  Mass in grams of the essential oil;

$M_{PM}:$  Mass in grams of plant material.

### Chemical analysis of essential oil

The analysis of the essential oil of the aerial part of *H. tuberculatum* was carried out by gas chromatography coupled with a flame ionization detector.

The essential oil were analysed on a AGILENT gas chromatograph Model 7890, coupled to a AGILENT MS model 5975, equipped with a DB5 MS column (20m X 0,18mm, 0,18µm), programming from 50°C (3.2 min) to 300°C at 8°C/mn, 5 min hold. Helium as carrier gas (1, 0 ml/min); injection in split mode (1: 150) at 300°C.

The MS working in electron impact mode at 70 eV; electron multiplier, 1800 V; ion source temperature, 230°C; mass spectra data were acquired in the scan mode in *m/z* range 33-550.

*Antifungal effect of the essential oil of H. tuberculatum*

*Determination of the inhibition rate and minimal inhibitory concentrations (MIC) of the essential oil of H. tuberculatum*

Essential oils are generally insoluble in water, making their biological study very difficult. The dimethylsulfoxide (DMSO) has been used as an appropriate solvent of essential oils and it also not show inhibition of the fungal species used (Duraffourd et Lapraz, 2002; Bajpai et al., 2004; Hili, 1997; Kolai et al., 2012).

The method of direct contact was adopted to evaluate the antifungal activity. The essential oil was diluted with DMSO (dimethyl sulfoxide) (%) and the concatenations of 2, 5 mg/ml, 5 mg/ml, 10 mg/ml, 20 mg/ml and 30mg/ml were prepared. 1 ml of each concentration is added to each Petri dish containing 15 ml of potato dextrose agar (PDA) medium, and then stirred for 5min to homogenize the medium PDA with essential oil. After solidification of the medium, explants of 5 mm diameter were taken from a seven-day old culture using a sterile punch. Each explant was deposited in a well dug at the center of the medium.

Three repetitions were realized for each concentration (Kolai et al., 2012; Haddouchi et al., 2013; Kanoun et al., 2014; Amri et al., 2014). The DMSO without essential oil was used as a negative control.

The cultures were incubated for seven days at 28 °C. Colony diameter measurements were made for each concentration to evaluate the level of inhibition of each fungal strain.

The antifungal action was evaluated by calculating the growth inhibition rate using the formula described by Leroux and Credet (Leroux and Credet, 1978).

$$T (\%) = ([L - I] / L) \times 100$$

T: Inhibition rate.

L: mycelial growth of the control.

I: mycelial growth of treated fungi

*Minimal Inhibitory Concentrations (MIC)*

The Minimal Inhibitory Concentrations (MIC) was determined by direct agar contact method (Mishra and Dubey, 1994; Cakir et al., 2004).

*Statistical analysis*

Research results were analyzed statistically by statistical software Statbox (version 6.4). All experimental measurements were performed five times and were expressed as (means ± SD). The results are significant when  $p < 0.05$ .

## Results and discussion

*Chemical composition and antifungal activity of essential oil of H. tuberculatum*

The yield of essential oil obtained by hydrodistillation of *H. tuberculatum* is 0.101%.

The results of essential oil analysis by gas chromatography coupled with a flame ionization detector (CG-FID) are summarized in Table 1 and Fig. 1. The chemical composition shows a quantitative and qualitative variation in the chemical profile were thirty-eight constituents were found. In the studied oil we can report the great richness in ketones, sesquiterpenes and terpenoides with a dominance of Piperitone (13.35%), Germacren-B (12.30%) and Beta-Phellandren (5.05%).

The study carried out on the antifungal activity of essential oil on *FORL*, *Alernari solani* and *Botrytis cinerea* showed remarkable efficacy at different concentrations of the essential oil studied (Fig. 2). Indeed, the doses 2.5mg/ml and 5mg/ml show a lower inhibition compared to the other doses. As for doses of 10mg/ml, 20mg/ml and 30mg/ml, they show complete inhibition against *A.solani* and *B. cinerea*.

The plant essential oil caused significant differences ( $p < 0.01$ ) on growth inhibition rates. A proportional relationship is observed between the two factors: inhibition rate and essential oil concentrations, where increasing of concentrations increased the rates of inhibition.

**Table 1.** Chemical composition of *Haplophyllum tuberculatum* essential oil identified by GC / FID.

Compounds	TR	%
Alpha-thujene	5,25	0,17
Alpha-Pinene	5,39	1,29
Camphene	5,72	0,50
Sabinene	6,19	0,45
Beta-Pinene	6,27	0,67
Myrcene	6,53	1,72
AlphaPhellandrene	6,83	2,76
Delta-3-Carene	6,87	1,86
Alpha-Terpinene	7,03	1,20
1,4-Cineol	7,17	0,20
Para-Cymene	7,17	0,27
Limonene	7,27	1,37
Beta-Phellandrene	7,29	5,05
Eucalyptol	7,33	0,42
(Z) -Beta-Ocimene	7,39	0,13
(E) -Beta-Ocimene	7,58	0,14
Gamma-Terpinene	7,77	0,08
1-Octanol	8,05	0,29
Terpinolene	8,24	0,18
2-nonanone	8,36	0,7
Cis-Thujone	8,62	0,19
Unknown beta-phellendrene	8,93	10,60
Unknown beta-phellendrene	9,22	6,84
Unknown beta-phellendrene	1,05	2,72
Unknown beta-phellendrene	10,24	5,44
Piperitone	10,91	13,35
Bornyl acetate	11,31	1,23
2-Undecanone	11,41	0,30
Unknown ditto Gamma-Terpinene	12,00	6,16
Beta-Bourbonene	12,65	0,32
Beta-Elemene	12,72	0,18
Beta-Caryophyllene	13,12	4,14
Gamma-Elemene	13,22	2,91
Alpha-Humulene	13,57	0,34
Germacrene-D	13,88	1,82
Germacrene-B	14,82	12,30
Total		88,73

RT : retention time.

#### Minimal inhibitory concentrations (MIC)

It corresponds to the minimal concentration inhibiting the fungal mycelia growth observed by naked eyes. Its determination was made by observing the total absence of the growth of the strains in the different concentrations of essential oil used. According to the recorded results, 100% inhibitory activity was observed by applying concentrations of

10, 20 and 30 mg/ml for *Alternaria solani* and 20 and 30 mg /ml for *Botrytis cinerea*. The MIC values obtained are summarized in Table 2.

Given the total inhibition of *Botrytis cinerea* and *Alternaria solani*, it was important to know whether the essential oil was fungistatic or fungicidal at these concentrations.

Indeed, the transfer of fungi discs, totally inhibited, to another PDA culture medium was necessary to evaluate the viability of these fungi. The results of the *in vitro* tests showed that mycelial growth reappeared

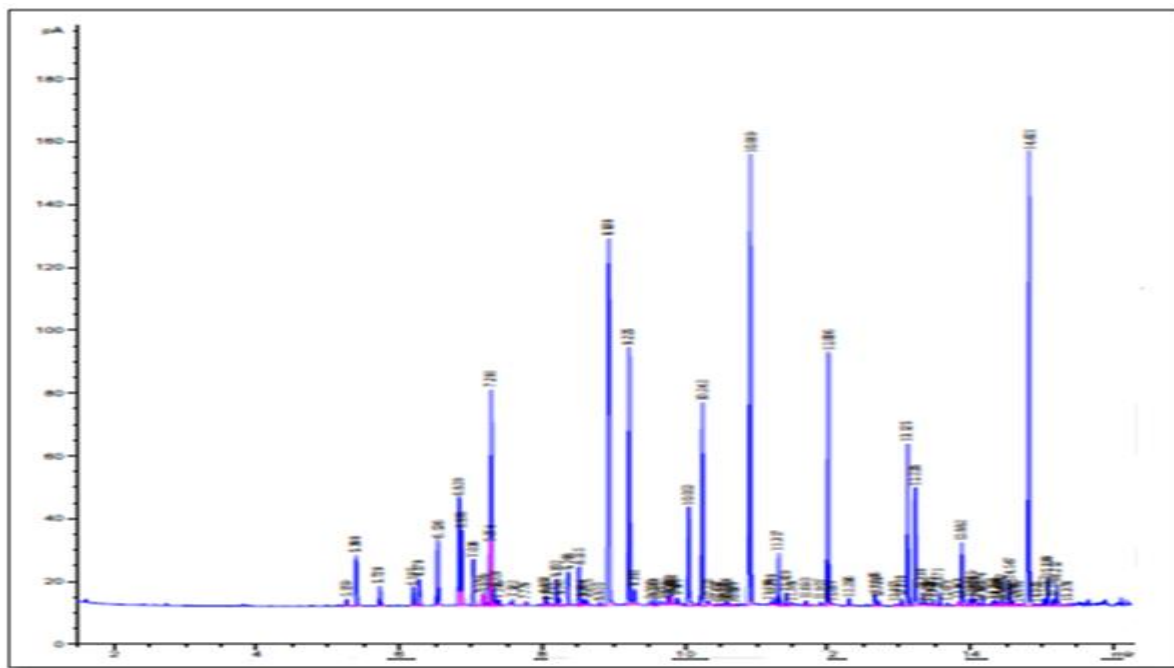
after the disc was exposed to the essential oil for 1, 3, 6 and 12 days. Thus, the results obtained reveal that the effect represented by the essential oil of the three species exerts a fungistatic effect towards the fungi tested.

**Table 2.** Fungicidal/fungistatic effect and MIC of the essential oil of *H. tuberculatum*.

MIC	<i>H. tuberculatum</i>	Fungicidal/fungistatic effect
<i>FORL</i>	-	-
<i>Botrytis cinerea</i>	20mg/ml	Fungistatic effect
<i>Alternaria solani</i>	10mg/ml	Fungistatic effect

The presented results are in agreement with those of Hadouchi *et al.* (2013) who reported that the essential oil of *Haplophyllum tuberculatum* obtained by hydrodistillation from the West of the Algerian

Sahara (Béchar: South Algerian) has a yield of 0.11%. The chemical profile of the oil studied is relatively different quantitatively from what has been reported in the literature.



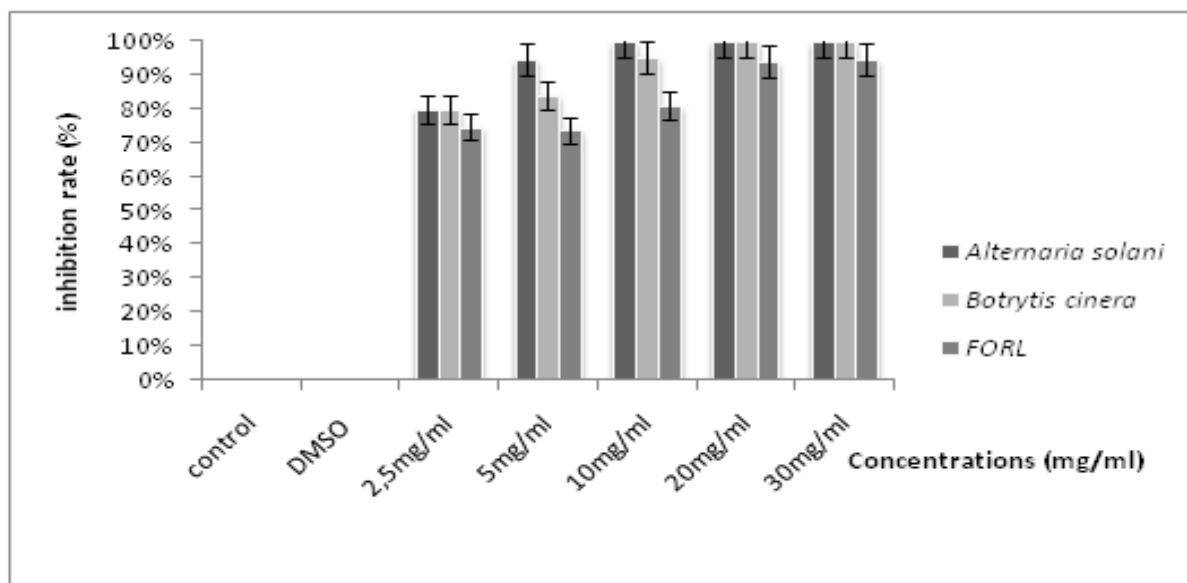
**Fig. 1.** Gas chromatography coupled with a flame ionization detector of the essential oil of *H. tuberculatum*.

Indeed, other studies have indicated that the essential oil extracted from *H. tuberculatum* originating from Egypt is characterized by the abundance of monoterpenes and sesquiterpenes where Trans-p-Menth-2-ene-1-ol represented (9.7-14.1%) as the most dominant group representing (El-Naggar *et al.*, 2014). However, the work of Al-Rehaily *et al.* (2014) on the same plant originally from Saudi Arabia reported two major constituents: trans-p-menth-2-en-1-ol (19.2%), cis-p-menth-2-1-ol (13.2%), myrcene (10.1%).

Gas chromatography/mass spectrometry analysis of extracted essential oil *H. tuberculatum* from Tunisia revealed 18 identified components representing 93.46 % of total oil. The major components were hexadecanoic acid (40.21 %) and oleic acid (26.75 %) (Debouba *et al.*, 2014). The quantitative and qualitative difference in the chemical composition of the essential oil of the studied plant could be explained by the impact of many biotic and abiotic factors, such as: origin of samples, geographical

factors such as altitude, Soil type, environmental conditions (temperature, luminosity, rainfall) and the vegetative plant stage (Pandey *et al.*,1982; Bruneton ,1999 ; Panizzi *et al.*,1993; Abu-Darwish and Abu-Dieyeh,2009; Merghache *et al.*,2006; Rodolfo *et al.*,2006). Other factors can also influence chemical

composition of the essential oil, like crops conditions (sowing and harvesting dates), phytosanitary treatments, use of fertilizers, and techniques of plant harvesting and extraction as indicated by several authors (Zellagui *et al.*,2007; Ferhat *et al.*,2014; Riahi *et al.*,2015; Ghazghazi *et al.*,2015).



**Fig. 2.** Inhibition rate of mycelial growth of the three fungal strains by essential oil of *H. tuberculatum*.

The results of antifungal tests activity indicate that the essential oils of *H. tuberculatum* possess a very interesting antifungal power. Similarly, antifungal activity of essential oil of Rutaceae was also confirmed by Sharma and Tripathi (2006) and Al-Burtamani *et al.* (2005).

The richness of the essential oil of the plant in terpenic and ketonic compounds could be responsible for the antifungal effect of this oil on the three fungi tested. Indeed, several studies show the efficacy of oxygenated monoterpenes as antifungal compounds (Salamci *et al.*, 2007). The chemical diversity of essential oil of *H. tuberculatum* in compounds make it affecting several targets simultaneously and rare microbes could be resistant (Bakkali *et al.*, 2008).

The compounds act by hydration and by degradation with enzymes such as chitinase and  $\alpha$  and  $\beta$  - glucanases leading to decomposition of the cell wall of the thickened conidia and mycelia. Once this event takes place, there is a balance between the lytic and

synthetic systems of enzymes necessary for the normal prolongation of hyphae. As such, the active compounds attack the cell wall and membrane, thereby affecting the permeability and release of intracellular constituents, also interfering with membrane function (Bajpai and Kang, 2010). Perturbation of this matrix may result in a defective wall, which becomes sensitive to osmotic and sensitive to antifungal agents (Yen and Chang, 2008).

Derwich *et al.* (2010) reported that antimicrobial activity is related to the ability of terpenes to affect not only permeability but also other functions of the cell membrane.

The terpenes also act by binding to amine and hydroxylamine groups of membrane proteins causing impaired permeability and leakage of intracellular constituents.

Several authors, notably Mares *et al.* (2004); Rasooli and Abyaneh (2007) and Sharma and Tripath (2004)

found that essential oils can cause morphological changes including inadequate sporulation, loss of pigmentation, abnormal development of conidiophores and deformation of hyphae. It seems that the terpenes exert a dysfunction of the ATPase proton pumps leading to cells death (Viuda-Martos *et al.*, 2008). Similarly, it has been shown that some sesquiterpene are antifungal (Mitscher and Hasenhuettl, 1975; Alilou *et al.*, 2016).

The inhibitory activity may also be due to the different modes of action and synergistic effect of all the components of the essential oil on the fungi. According to Randrianarivelo *et al.* (2008) the minority constituents in studied essential oil such as Alcohols, aldehydes and esters are also known for their antimicrobial activity.

### Conclusion

As a conclusion we consider that the present work is interesting and the results obtained are encouraging. The extraction of the essential oil from *H. tuberculatum* by hydrodistillation provided a yield of 0.101% and its identification by GC-MS showed the presence of Piperitone (13.35%), Germacrene-B (12.30%) and Beta-Phellandrene (5.05%) with richness in ketones, sesquiterpenes and terpenoids. The essential oil of the plant proved to be an effective antifungal agent against the three fungi tested with a total inhibition of 100% at a dose of 20 mg/ml for *Botrytis cinerea* and 10mg /ml for *Alternaria solani*. The MIC is estimated to be 20m g /ml for *Botrytis cinerea* and 10mg/ml for *Alternaria solani*. The antifungal activity can be attributed to the chemical composition of the essential oil.

Accordingly, the results of the present work suggest the possibility to use the essential oil of *Haplophyllum tuberculatum* (Forsk.) A. Juss. as a natural fumigant antifungal in open fields.

### References

**Abu-Darwish MS, Abu-Dieyeh ZHM.** 2009. Essential oil content and heavy metals composition of *Thymus vulgaris* cultivated in various climatic regions of Jordan. *International Journal of Agriculture and Biology* **11**, 59-63.

**AFNOR.** (Association Française de normalisation). 1988. Huiles essentielles. Recueil des normes françaises, 3<sup>ème</sup> Édition AFNOR, Paris.

**Alatar AA, El-Sheikh M, Thomas J.** 2012. Vegetation analysis of Wadi Al-Jufair, a hyper-arid region in Najd, Saudi Arabia. *Saudi Journal of Biological Sciences* **19**, 357-68.  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.sjbs.2012.04.003>

**Al-Burtamani SK, Fatope MO, Marwah RG, Onifade AK, Al-Saidi SH.** 2005. Chemical composition, antibacterial and antifungal activities of the essential oil of *Haplophyllum tuberculatum* from Oman. *Journal of Ethnopharmacology* **96**, 07-12.  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2004.08.039>

**Alilou H, Bencharki B, Akssira M, Idrissi Hasnia LM, Barka N.** 2016. Isolement, identification et activité antifongique de deux sesquiterpenes D'*Asteriscus graveolens* Subsp. Odonus (Schousb.) Greuter. *European Scientific Journal* **12(33)**, 1857 – 7881.  
<http://dx.doi.org/10.19044/esj.2016.v12n33p11>

**Al-Rehaily AJ, Alqasoumi SI, Yusufoglu HS Al-Yahya MA, El-Ferally S, Hufford DC, McPhail AT.** 2014. Chemical Composition and Biological Activity of *Haplophyllum tuberculatum* Juss. essential Oil. *Journal of Essential Oil Bearing Plants* **17**, 3.  
<http://dx.doi.org/10.1080/0972060X.2014.895211>

**Amri I, Hamrouni L Hamama M, Gargouri S.** 2014. Propriétés antifongiques des huiles essentielles de Biota orientalis. *Phytotherapie* **3**, 170-4.  
<http://dx.doi.org/10.1007/s10298-013-0816-4>

**Bajpai V, Shin SY, Kim MJ, Sun Chul L.** 2004. Anti-fungal activity of bioconverted oil extract of linoleic acid and fractionated dilutions against phytopathogens *Rhizoctonia solani* and *Botrytis cinerea*. *Agricultural chemistry & biotechnology*. **47(4)**, 199-204.

- Bajpai VK, Kang SC.** 2010. Antifungal activity of leaf essential oil and extracts of *Metasequoia glyptostroboides* Miki ex Hu. Journal of the American Oil Chemists Society **87**, 327-336.  
<http://dx.doi.org/10.1007/s11746-009-1500-6>
- Bakkali F, Averbeck S, Averbeck D, Idaomar M.** 2008. Biological effects of essential oils- a review. Food and Chemical Toxicology **46**, 446-475.  
<http://doi.org/10.1016/j.fct.2007.09.106>
- Bruneton J** .1999. Pharmacognosie, Phytochimie, Plantes médicinales, Editions Tec & Doc, Éditions médicales internationales, Paris 483-560 p.
- Cakir A, koradali S, Zengin H, Izumi S, Hirata T.** 2004. Composition and antifungal activity of essential oils isolated from *Hypericum lyssoifolium* and *Hypericum eterophyllum*. Flavour and Fragrance Journal **19**, 62-8.  
<http://dx.doi.org/10.1080/0972060X.2014.958545>
- Debouba M, Khemakhem B, Zouari S, Meskine A, Gouia H.** 2014. Chemical and Biological Activities of *Haplophyllum tuberculatum* Organic Extracts and Essential Oil. Journal of Essential Oil Bearing Plants **17**, 5.  
<http://dx.doi.org/10.1080/0972060X.2014.958545>
- Derwich E, Manar A, Benziane Z, Boukir A.** 2010. GC/MS analysis and in vitro antibacterial activity of the essential oil isolated from leaf of *Pistacia lentiscus* growing in Morocco. World Applied Sciences Journal **8**, 1267-1276.
- Duraffourd C, Lapraz JC.** 2002. Traité de phytothérapie clinique : Médecine et endobiogénie. Edition Masson.
- El-Naggar EMB, El-Darier SM, Abdalla A, El-Mekane S, Švajdlenka E, Emlièka M.** 2014. Chemical Composition of Essential Oil of *Haplophyllum tuberculatum* (Rutaceae) Grow Wild in Different Habitats of Egypt. Global Journal of Pharmacology **8(3)**, 385-393.
- Ferhat M, Kabouche A, Kabouche Z.** 2014. Comparative compositions of essential oils of three *Ruta* species growing in different soils. Journal of Materials and Environmental Science **5**, 3735-738.
- Javidnia K, Miri R, Banani A.** 2006. Volatile oil constituents of *Haplophyllum tuberculatum* (Forssk.) A. Juss. (Rutaceae) from Iran. Journal of Essential Oil Research **18**, 355-6.  
<http://dx.doi.org/10.1080/10412905.2006.969911>
- Ghazghazi H, Aouadhi C, Weslati M, Trakhna F, Maaroufi A, Hasnaoui B.** 2015. Chemical Composition of *Ruta chalepensis* Leaves Essential Oil and Variation in biological activities between Leaves, Stems and roots methanolic extracts. Journal of essential oil bearing plants **18**, 3.  
<http://dx.doi.org/10.1080/0972060X.2014.905757>
- Haddouchi F, Chaouche TM, Zaouali Y, Ksour R, Attou A, Benmansour A.** 2013. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oils from four *Ruta* species growing in Algeria. Food Chemistry **141**, 253-258.  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.03.007>
- Hili P, Evans C S, Veness RG.** 1997. Antimicrobial action of essential oils: the effect of dimethylsulphoxide on the activity of cinnamon oil. Letters in Applied Microbiology **24**, 269-275.
- Kanoun K, Abbouni B, Bénine ML, Benmahdi FZ, Marouf B.** 2014. Etude de l'efficacité l'extrait éthanolique d'écorces de *Punica Granatum* LINN sur deux souches phytopathogènes: *Ascochyta Rabiei* (PASS.) LABR. et *Fusarium oxysporum f.sp.radicis - lycopersici*. European Scientific Journal **10(12)**, 1857-7881.
- Kolai N, Saiah F, Boudia A.** 2012. Effet inhibiteur *in vitro* de l'huile essentielle D' *Artemisia herba alba* sur deux souches de *Fusarium oxysporum f. sp. radicis-lycopersici*. Algerian journal of arid environment **2(1)**, 71-76.
- Leroux P, Credet A.** 1978. Document sur l'étude de l'activité des fongicide, INRA, Versailles France, 12 p.

- Mares D, Tosi B, Poli F, Andreotti E, Romagnoli C.** 2004. Antifungal activity of *Tagetes patula* on some phytopathogenic fungi ultrastructural evidence on *phythium ultimum*. Microbiological Research **859**, 295-3.  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.micres.2004.06.001>
- Merghache S, Hamza M, Tabti B.** 2009. Etude physicochimique de l'huile essentielle de *Ruta chalepensis* L. de Tlemcen, Algérie. Afrique Science **5 (1)**, 67
- Mishra AK, Dubey NK.** 1994. Evaluation of some essential oils for their toxicity against fungi causing deterioration of stored food commodities. Applied and environmental Microbiology **60**, 1101-5.
- Mitscher LA, Hasenhuettl G.** 1975. Phytochemistry **9**, 243-283.
- Pandey DK, Tripathi NN, Tripathi RD, Dixit SN.** 1982. Fungitoxic and phytotoxic properties of the essential oil of *Hyptis suaveolens*. Z. Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz **89**, 344-349.
- Panizzi L, Flamini G, Cioni PL, Morelli I.** 1993. Composition and antimicrobial properties of essential oils of four Mediterranean Lamiaceae. Journal of Ethnopharmacology **39**, 167-170.
- Randrianarivelo R, Sarter S, Odoux E, Brat P, Lebrun M, Romestand B, Menut C, Andrianoelisoa HS, Raherimandimby M, Danthu P.** 2008. Composition and antimicrobial activity of essential oils of *Cinnamosma fragrans*. Food Chemistry **114**, 680-684.  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.10.007>
- Rasooli I, Abyaneh MR.** 2004. Inhibitory effect of Thyme oils on growth and aflatoxin production by *Aspergillus parasiticus*. Food Control **15**, 479-483.  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2003.07.002>
- Riahi L, Ghazghazi H, Ayari B, Aouadhi C, Klay I, Chograni H, Cherif A, Zoghlami N.** 2015. Effect of environmental conditions on chemical polymorphism and biological activities among *Artemisia absinthium* L. essential oil provenances grown in Tunisia. Industrial Crops and Products **66**, 96-102.  
<http://doi.org/10.1016/j.indcrop.2014.12.036>
- Rodolfo J, Koroch A, Simon J, Hitimana.** 2006. Quality of geranium oils: case studies in southern and eastern Africa. Journal of Essential Oil Research **18**, 116-121.
- Salamci E, Kordali S, Kotan R, CaKir A, Kaya Y.** 2007. Chemical composition, antimicrobial and herbicidal effects of essential oils isolated from Turkish *Tanacetum aucheranum* and *Tanacetum chiliophyllum* var. *chiliophyllum*. Biochemical Systematics and Ecology **35**, 569-581.
- Sharma N, Tripathi A.** 2006. Fungitoxicity of the Essential oil *Citrus sinensis* on postharvest pathogens. World Journal of Microbiology and Biotechnology **22**, 587-593.  
<http://dx.doi.org/10.1007/s11274-005-9075-3>
- Sharma N, Tripathi A.** 2007. Effects of *Citrus* (L.) Osbeck epicarp essential oil on growth and morphogenesis of *Aspergillus niger* (L.) Van Tieghem. Microbiological Research **163(3)**, 337-4.  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.micres.2006.06.009>
- Viuda-Martos M, Ruiz-Vavajas Y, Fernandez-Loez, Perez-Alvarez J.** 2008. Antifungal activity of lemon (*Citrus lemon* L.), mandarin (*Citrus reticulata* L.), grapefruit (*Citrus paradisi* L.) and orange (*Citrus sinensis* L.) essential oils. Food control **19**, 1130-8.  
<http://doi.org/10.1016/j.foodcont.2007.12.003>
- Yen TB, Chang ST.** 2008. Synergistic effects of cinnamaldehyde in combination with eugenol against wood decay fungi. Bioresource Technology **99**, 232-236.
- Zellagui A, Belkassam A, Belaidi A, Gerraf N.** 2012. Environmental impact on the Chemical Composition and yield of essential oils of Algerian *Ruta Montana* (Clus.) L and their antioxidant and antibacterial activities. Advances in Environmental Biology **6(10)**, 2684-2688.