

République Algérienne Démocratique et Populaire  
Université Abdelhamid Ibn Badis-Mostaganem  
Faculté des Sciences de la nature et de la vie



DEPARTEMENT DE BIOLOGIE



## Mémoire de fin d'étude

Pour l'obtention du diplôme de Master en Biologie  
Spécialité : Biotechnologie et Valorisation des Plantes

Présenté par

**Mr Bendjelloul Fethi**

**THÈME**

**Détermination du pouvoir antibactérien et antifongique de  
l'huile essentielle de *Mentha pulegium L.* sur quelques  
microorganismes phytopathogènes**

Soutenue le 15 /09/2018

### Devant le jury

Présidente : BOUELAM M.

Maitre Conférence A à U. Mostaganem

Encadreur : CHADLI R.

Professeur à U. Mostaganem

Examineur : BEKKADA A. M.A.

Professeur à U. Tissemsilet

*Thème réalisé au laboratoire du « Microbiologie et Biologie Végétale »*

Année Universitaire : 2017-2018

---

## *Remerciements*

Au final de ce travail,

**C'**est avec un grand plaisir que je remercie mon Directeur de mémoire Mr. CHADLI R. professeur à l'université de Mostaganem pour m'avoir proposé ce sujet de recherche, pour sa présence, son dévouement, sa rigueur, ses précieux conseils et ses encouragements.

Je tiens à exprimer ma profonde reconnaissance au Directeur du laboratoire de « Microbiologique et biologie végétale », Mr. MEKHALDI. Professeur à l'université de Mostaganem et toute l'équipe du centre de recherche CRAPC à Bousmail. Je remercie au même titre le laboratoire de recherche « Protection des Végétaux » pour leur aide concernant les souches.

Je remercie très sincèrement Mr. Bekkada M. A. Professeur à l'université de Mostaganem pour le temps qu'il me consacre en examinant ce mémoire. .

Je remercie Me. BOUELEM M. Maître de conférences à l'université de Mostaganem, qui ma fait l'honneur d'évaluer ce travail et de présider le jury

Je remercie Mr BOUCHMA A. responsable de plateau technique PTAPC Mostaganem, Me HAMED D. et Me BENATI F. pour leur soutien scientifique.

Je remercie qui me fait l'honneur de participer au jury.

Enfin, que tous ceux qui m'ont accordé un soutien, une aide technique ou un conseil, trouvent ici l'expression de ma profonde reconnaissance.

***Bendjelloul Fethi.***

*Dédicace*

*A ma chère famille du petit au grand*

*A mes enseignants et professeurs du  
primaire à l'université*

*A tous mes amis*

*Je dédie ce modeste travail*

*Fethi*

---

## Table des matières

Résumé	
Liste des tableaux	
Liste des figures	
Liste des photos	
Introduction.....	01
<b>Partie bibliographique</b>	
<b>Chapitre I</b>	
<b>L'espèce végétale étudiée</b>	
1. La <i>Menthe pulegium</i> .....	02
1.1 Généralité .....	02
1.2 Description botanique <i>Mentha pulegium</i> .....	03
1.3 Systématique .....	04
1.4 Habitat et origine.....	04
<b>chapitreII</b>	
<b>L'huile essentielle</b>	
1. Généralités sur les huiles essentielles.....	05
1.1 Définition d'huile essentielle.....	05
1.2 Localisation et lieu de synthèse .....	05
1.3 Composition Chimique .....	06
2. Rôle des huiles essentielles chez les plantes .....	06
3. Domaine d'application en Agriculture.....	07
4. Techniques d'extraction des huiles essentielles.....	07
4.1 Extraction par hydrodistillation.....	09
4.2 Extraction par entraînement à la vapeur d'eau .....	10
4.3 L'hydro diffusion.....	10
4.4 L'extraction à froid .....	11
4.5 Extraction par solvants .....	11
4.6 Extraction par les corps gras.....	13
4.7 Extraction par les fluides supercritiques .....	13
4.8 Extraction par micro-ondes .....	14
5. Activité microbiennes des huiles essentielles .....	14
5.1 Activité antibactérienne .....	14
5.2 Activité antifongique.....	16
<b>Chapitre III :</b>	
<b>Les agents phytopathogènes étudiées</b>	
1. <i>Fusarium oxysporum</i> .....	18
1.1 Généralité .....	18
1.2 Taxonomie .....	18
1.3 Systématique .....	19
1.4 Caractères morphologiques de <i>Fusarium oxysporum</i> .....	19
1.5 Incidences .....	20
2. <i>Botrytis cinerea</i> .....	21

2.1 Généralités.....	21
2.2 Taxonomie .....	22
2.3 Systématique.....	22
2.4 Caractères morphologiques de <i>Botrytis cinerea</i> .....	23
2.5 Incidences .....	23
3. <i>Erwinia carotovora</i> .....	24
3.1 Généralité .....	24
3.2 Taxonomie.....	24
3.3 Systématique.....	25
3.4 Caractères morphologiques d' <i>Erwinia carotovora</i> .....	26
3.5 Incidences .....	26
<b>Partie expérimentale</b>	
<b>Matériel et méthodes</b>	
1 .Bute de travail.....	28
2. Matériel végétal.....	28
2.1 Préparation de l'échantillon la <i>Menthe pulegium</i> .....	28
2.1.1 Procédés d'extraction de l'Huile essentielle par Hydro distillation....	29
2.1.2 Calcul du rendement.....	30
3Matériel biologique.....	31
3.2 Origine des souches phytopathogènes .....	31
3.2.1 Revivification et repiquage des souches microbiennes.....	31
3.2.2 Préparation de l'inoculum .....	32
4. Etude de l'activité antimicrobienne des huiles essentielles.....	33
4.1 Technique d'aromatogramme .....	33
4.2 Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI).....	34
4.3 Détermination de la concentration minimale fongicide (CMF).....	36
4.4 Détermination de la concentration minimale bactéricide (CMB).....	37
<b>Résultats et discussion</b>	
1. Rendement en huile essentielle.....	38
2. Etude de l'activité antimicrobienne des huiles essentielles.....	38
2.1 Technique de l'aromatogramme (Méthode de Vincent).....	38
2.2 Détermination des concentrations minimales inhibitrice, bactéricide (CMB) et fongicide (CMF).....	40
<b>Conclusion.....</b>	<b>44</b>
Références bibliographiques.....	46
Annex	



---

## Résumé

*Mentha pulegium* est une plante aromatique, répandue en Algérie. L'extraction de l'huile essentielle a été effectuée par hydrodistillation. Le rendement obtenu à partir des feuilles est 0.38 % est intéressant, l'huile essentielle a révélée une grande action inhibitrice sur la croissance des germes testés et signalée aussi des résultats significatifs, *Fusarium oxysporum* est le plus sensible à l'huile de la *Mentha* avec une zone d'inhibition de 35mm contre 8 mm pour *Erwinia carotovora*. L'activité antimicrobienne de l'huile essentielle de *Mentha pulegium* sur les souches testées, par la technique de Vincent (Aromatogramme) montre que le pouvoir antimicrobien de cette huile se caractérise par une action fongicide sur les champignon *Fusarium oxysporum* et *Botrytis cinerea*. Et une action bactériostatique sur *Erwinia carotovora*. La plus faible concentration d'huile essentielle pour laquelle il y a un effet fongicide sur le *Fusarium oxysporum* est 0.016 mg/μl.

Les CMI, viennent aussi confirmer cette bonne activité, avec des valeurs ne dépassant pas 0.0625mg/μl, ce qui a donné des rapports CMB/CMI  $\leq 4$  dont les champignons et CMF/CMI environ de 8mg/μl pour la bactérie. Cette activité est plus importante sur les champignons que sur la bactérie. Ce pouvoir dépend de la nature de l'huile et du germe lui même. Ces résultats peuvent aider les industriels à mieux choisir les lieux et période de récolte de cette plante aromatique à fin de produire leur huile essentielle à l'échelle industrielle.

**Mots-clés :** l'huile essentielle, *Mentha pulegium*, *Fusarium oxysporum*, *Botrytis cinerea*, *Erwinia carotovora*.

## ملخص

*Mentha pulegium* هو نبات عطري منتشر في الجزائر. استخلاص الزيت الأساسي تم عن طريق التقطير بالبخار إن المردود الذي تم الحصول عليه من الأوراق هو 0.38%. وهذه النسبة مثيرة للاهتمام، الزيت الأساسي اظهر تأثيرا كبيرا و مثبتا على نمو الجراثيم الذي تم اختباره *Fusarium oxysporum* هو أكثر حساسية للزيت الأساسي لنبتة النعناع مع منطقة تثبيط قطرها 35 مم مقابل 8 مم

*Erwinia carotovora* النشاط المضاد للميكروبات من الزيت الأساسي لهذه النبتة على السلالات التي تم اختبارها ، بواسطة تقنية فينسنت (اروماتوغرام) تظهر أن القوة المضادة للميكروبات لهذا الزيت تتميز بنشاط مبيد للفطريات *Fusarium oxysporum* و *Botrytis cinerea* .

كما تؤكد قيم CMI على هذا النشاط الجيد ، مع قيم لا تتجاوز 0.0625 مغ/ميكرو لتر ، والتي أعطت النسب CMB  $CMI \leq 4$  / فيما يخص الفطريات و CMI / CMF حوالي 8 مغ ميكرو لتر للبكتيريا . هذا النشاط هو أكثر أهمية على الفطريات منه على البكتيريا . اقل تركيز للزيت الأساسي له تأثير مبيد للفطريات على *Fusarium oxysporum* هو 0.016 مغ/ميكرو لتر.

هذه القوة تعتمد على طبيعة الزيت والجراثيم نفسها هذه النتائج يمكن أن تساعد الشركات المصنعة لاختيار أفضل موقع وفترة الحصاد لهذه النبتة العطرية لإنتاج الزيوت الأساسية على نطاق صناعي.

## الكلمات المفتاحية

*Mentha pulegium*, *Fusarium oxysporum*, *Botrytis cinerea* , *Erwinia carotovora* , الزيت الأساسي.

---

## Liste des tableaux

Tableaux	Pages
<b>Tableau 1</b> : Organes de certaines plantes riches en huiles essentielles ( <b>Garneau, 2005</b> ).	6
<b>Tableau 2</b> : Rendements en huiles essentielles chez certaines plantes ( <b>Anonyme, 2011</b> ).	8
<b>Tableau 3</b> : Les différentes souches phytopathogènes utilisées.....	31
<b>Tableau 4</b> : Transcription des diamètres d'inhibition des disques imprégnés ( <b>Moreira, et al, 2005</b> ).....	34
<b>Tableau 5</b> : Le rendement en huile essentielle de <i>Mentha pulegium L</i> .....	38
<b>Tableau 6</b> : Valeurs des paramètres antimicrobiens de l'huile essentielle de <i>Mentha pulegium L</i> exprimées en mg/μl.....	41

---

## Listes des figures

Figures	Pages
<b>Figure 1</b> : Photo et schéma représente les Caractéristiques botaniques de <i>Mentha pulegium</i> (Anonyme, 2010).....	3
<b>Figure 2</b> : Les étapes de l'obtention d'une huile essentielle.....	9
<b>Figure 3</b> : Montage d'extraction par Hydrodistillation (Anonyme 2015).....	9
<b>Figure 4</b> : Montage d'extraction par entraînement à la vapeur d'eau (Anonyme 1 ,2018)..	10
<b>Figure 5</b> : Montage d'extraction par hydro diffusion (Anonyme 1,2010).....	11
<b>Figure 6</b> :Technique d'extraction par solvants (Anonyme 2,2010) .....	12
<b>Figure 7</b> : Technique d'extraction par les corps gras (Anonyme 2,2018).....	13
<b>Figure 8</b> : Montage d'extraction par les fluides supercritiques (Anonyme 3,2018).....	13
<b>Figure 9</b> : Extraction assisté par micro-ondes. (Anonyme 4,2018).....	14
<b>Figure 10</b> : Sites d'action des huiles essentielles sur la cellule bactérienne .....	16
<b>Figure 11</b> : Stations de récolte de la <i>Menthe pulegium</i> .....	27
<b>Figure 12</b> :Schéma représentatif les étapes de CMI.....	35
<b>Figure 13</b> : Résultats de l'activité antimicrobienne de l'huile essentielle de <i>Mentha pulegium L</i> .....	38

---

## Liste des photos

Photos	Pages
<b>Photo 1</b> : Symptômes de <i>Fusarium oxysporum</i> sur les feuilles de bananier (Anonyme, 2011).....	21
<b>Photo 2</b> : Symptômes de <i>Botrytis cinerea</i> sur une grappe de raisin (Anonyme 2018).....	24
<b>Photo 3</b> : Symptômes d' <i>Erwinia carotovora</i> sur tubercule de pomme de terre (Anonyme, 2005).....	27
<b>Photo 4</b> : Feuille fraîche de <i>Mentha pulegium</i> (Fliou) (photo originale) avant et après séchage.....	29
<b>Photo 5</b> : Montage d'un Hydro distillateur de type Clevenger pour l'extraction de l'huile essentielle (photo originales).....	30
<b>Photo 6</b> : Revivification des souches A Vue macroscopique de <i>Botrytis cinerea</i> sur PDA (Culture jeune) B : Vue macroscopique de <i>Fusarium oxysparum</i> sur PDA (Culture jeune) (photos originales).....	32
<b>Photo 7</b> : Mesure de la densité optique de l'inoculum (photo originales).....	33
<b>Photo 8</b> : préparation des disques d'aromatogramme (photosoriginales).....	34
<b>Photo 9</b> : Résultats de l'aromatogramme de l'huile essentielle de <i>Mentha pulegium</i> sur les trois germes étudiés (photo originales).....	40
<b>Photo 10</b> : Détermination de la CMI de l'huile essentielle de la <i>Mente pulegium</i> sur les trois germes étudiés (photos originales).....	41
<b>Photo 11</b> : Détermination de CMF de l'huile essentielle de la <i>Mente pulegium</i> sur <i>Fusarium oxysporum</i> . (Photos originales).....	42
<b>Photo 12</b> : A détermination de CMF de l'huile essentielle de la <i>Mente pulegium</i> sur <i>Botrytis cinerea</i> B : détermination de CMB de l'huile essentielle de la <i>Mente pulegium</i> sur <i>Erwinia carotovora</i> (photos originales).....	43

## Introduction

Les germes phytopathogènes causent des dégâts très importants du point de vue économique et agroalimentaire, ils infectent les champs et les cultures au cours du stockage. Ce qui se traduit non seulement par une réduction du rendement des cultures, mais aussi par la production d'une large gamme de mycotoxines.

Pour la lutte chimique en utilisant des fongicides présente plusieurs inconvénients tels que les problèmes de pollution environnementale qui est aussi considérée comme un problème sérieux pour la santé humaine. De plus, l'utilisation de ces produits de synthèse peut stimuler la biosynthèse des mycotoxines et entraîner le développement des souches.

La recherche d'autres méthodes en prenant en considération d'autres critères que l'efficacité est devenue indispensable. La lutte biologique par l'utilisation de substances naturelles antibactérienne et antifongiques, peut constituer une alternative aux produits chimiques. Parmi ces substances naturelles, figurent les huiles essentielles extraites des plantes aromatiques **(Maihebiau P., 1994)**.

Dans ce sens, cette étude vise le pouvoir antibactérien et antifongique de l'huile essentielle de la Menthe pouliot (*Mentha pulegium* L.); pousse spontanément dans notre région; par la détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI), la concentration minimale fongicide (CMF) et la concentration minimale bactéricide (CMB) sur différents agents responsable de maladies phytopathogènes : *Fusarium oxysporum*, *Botrytis cinerea* et *Erwinia carotovora*.



## 1. La *Mentha pulegium* :

### 1.1 Généralité :

La *Mentha pulegium* Linné, 1753 appelée localement « Fliou » (**Lemordant et al, 1977 ; Bellakhdar J., 1978**), est également appelée pouliot, pouliot royal, herbe aux puces, chasse puce, herbe de Saint Laurent ou frétille. Le nom de *pulegium* vient de latin de *pulex*, la puce car la plante a la propriété d'éloigner les puces (**Bekhechi C., 2008**).

Les Menthes désignent un genre de dicotylédones gamopétales, de l'ordre des Lamiales et de la famille des Lamiacées, La *Mentha* formée de près de 3500 espèces réparties sur 8 sous-familles. Près de la moitié (47 %) des Lamiaceae sont regroupées dans la sous-famille des Nepetoideae (**Bruneton J., 1993**). Au sein de la sous-famille des Nepetoideae, le genre *Mentha* est représenté par 18 espèces et environ 11 hybrides. L'hybridation intra spécifique est relativement aisée et rend la taxonomie particulièrement délicate.

Elle est toxique à forte dose et peut provoquer l'avortement. Cette plante a aussi la particularité d'être insecticide puisqu'elle a été déjà utilisée pour faire éloigner les insectes.

Le genre *Mentha*, est responsable d'environ 2000 tonnes d'huile essentielle dans le monde entier, ce qui en fait le deuxième genre producteurs des huiles essentielles les plus importantes, après le genre *Citrus*.

Les Menthes, du nom latin *Mentha*, sont des plantes vivaces, herbacées indigènes et très odorantes appartenant à la famille des Lamiacées (**Bruneton J., 1993**)

Parmi toutes les *labiées* (*Lamiaceae*), les Menthes se reconnaissent, en plus de leur odeur spéciale, à leurs fleurs très petites, à leurs corolles presque régulières à quatre lobes presque égaux et leurs quatre étamines également presque égales. Les menthes ne dépassant pas 1 m, à tiges quadrangulaires, à feuilles pétiolées ou sessiles, arrondies ou ovales, plus ou moins dentées, à fleurs presque régulières

mauves, roses ou blanches. Les quatre parties des fruits sont ovoïdes, parfois verruqueuses, l'odeur est forte et agréable, plus ou moins fine, à tiges fortifiées terminées par les fleurs inflorescences en tête arrondie.

## 1.2 Description botanique *Mentha pulegium*:

*Mentha pulegium* Famille des *Lamiacées* (*Lamiaceae*) ou *Labiées* (*Labiatae*), vivace, pubescente, couchée, parfois dressée de petite taille à taille moyenne (10 à 30 cm de haut, 45 de large) radicante, généralement poilue, à tiges florifères dressées, fortement aromatique à odeur piquante avec des petites feuilles étroites elliptiques à ovales, à peine dentées, à pétiole court, souvent poilues au revers avec des bractées foliacées .

Elle possède des fleurs lilas, de 4,5 à 6 mm de long, qui apparaissent l'été, de juillet à fin septembre, parfois rose et d'autres fois blanches échelonnées le long de la tige. Ses corolles ont 4 lobes presque égaux et 4 étamines saillantes, en verticilles denses, très espacés mais pas en capitule terminal (sommet de la tige non fleuri).

Elle possède des verticilles à l'aisselle des feuilles supérieures et moyennes avec un calice velu, nettement cannelé, poilu dans la gorge, les 2 dents inférieures plus étroites. Sa floraison étant de juillet à octobre (**Figure 1**)



**Figure 1** : A : Photo et B : schéma représente les Caractéristiques botaniques de *Mentha pulegium* (Anonyme, 2010)

Les parties aériennes de la plante sont pubescentes portant trichomes glandulaires qui sont responsables de la sécrétion d'huile essentielle. La morphologie, la distribution et la fréquence de ces trichomes glandulaires sont des caractéristiques distinctives entre les espèces de Lamiacées. L'odeur caractéristique qui se dégage par simple touché.

### 1.3 Systématique :

D'après **Quézel P. et Santa S. en 1963** et **Guignard J.L. et Dupont F. en 2004**, la classification systématique de la *Mentha pulegium* est la suivante :

<b>Règne</b>	<i>Végétal</i>
<b>Embranchement</b>	<i>Spermaphytes</i>
<b>Sous-embranchement</b>	<i>Angiospermes</i>
<b>Classe :</b>	<i>Dicotylédones</i>
<b>Sous-classe</b>	<i>Gamopétales</i>
<b>Ordre</b>	<i>Lamiales</i>
<b>Famille</b>	<i>Labiacées</i>
<b>Genre</b>	<i>Mentha</i>
<b>Espèce :</b>	<i>pulegium</i>

---

### 1.4 Habitat et origine :

Cette espèce sauvage pousse dans les zones humides et généralement marécageuses, près des routes, et elle est plus abondante dans les pâturages de montagnes (**Chalchat J.C. et al, 2000**) Elle pousse dans des montagnes jusqu'à 2200 mètres d'altitude. Il existe de nombreuses espèces de *Menthe* sauvage telle *Mentha Pulegium L.* est très abondante et pousse spontanément en Algérie (**Quézel P. et Santa S., 1963**). La plupart des menthes sont originaires de l'Europe et de l'Asie. Cependant, en suivant les flux de migration, les menthes sont présentes sur la quasi-totalité des continents.

## **1. Généralités sur les huiles essentielles**

### **1.1 Définition d'huile essentielle :**

Une huile essentielle est un mélange naturel complexe de métabolites secondaires lipophiles, volatils, odorants et souvent liquides contenus dans des tissus végétaux spécialisés (**Bruneton J., 1993 ; Kalemba D. et Kunicka A., 2003**). Selon la norme AFNOR NF'T 75-006, « l'huile essentielle désigne le produit obtenu à partir d'une matière première d'origine végétale, soit par entraînement à la vapeur, soit par des procédés mécaniques à partir de l'épicarpe, soit par distillation sèche. Elle est ensuite séparée de la phase aqueuse par des procédés physiques » (**AFNOR, 2000**).

L'huile essentielle ne contient pas de corps gras comme l'huile végétale (**Anton R. et Lobstein A., 2005**). Elles proviennent d'une sécrétion naturelle élaborée par certains végétaux pour se protéger des insectes et des maladies, mais aussi pour éliminer les substances issues de leur métabolisme.

### **1.2 Localisation et lieu de synthèse :**

Les huiles essentielles se localisent dans toutes les parties vivantes de la plante et se forment dans le cytoplasme de cellules sécrétrices variables selon l'organe végétal considéré. Puis, elles s'accumulent en général dans des cellules glandulaires spécialisées recouvertes d'une cuticule. Ensuite, elles sont stockées et emmagasinées dans des structures histologiques spécialisées, souvent localisées sur ou à proximité de la surface de la plante, à savoir, des cellules à huiles essentielles. (**Tableau1**)

**Tableau 1** : Organes de certaines plantes riches en huiles essentielles  
(Garneau F.X., 2005)

Organe	Exemples
Feuilles d'Angiospermes	Romarin, sauge, menthe
Feuille de Gymnospermes	Sapin, cèdre
Tiges	Citronnelle, lemon-grass
Ecorces	Cannelier
Racines	Angelica, vétiver
Rhizomes	Acorus, gingembre
Bulbes	Oignon, ail
Bois	Santal
Fruits	Bleuet, citron
Fleurs	Jasmin, rose
Graines	Aneth, carvi

### 1.3 Composition Chimique :

Les huiles essentielles de *Mentha pulegium* sont généralement considérées comme riches en pulégone, un composé toxique, sont constituées de différents composants terpènes, esters, cétones, phénols, et d'autres éléments. Elles sont solubles dans les solvants des lipides (acétone, sulfure de carbone, chloroforme, etc.) et dans l'alcool.

### 2. Rôle des huiles essentielles chez les plantes :

Le rôle des huiles essentielles dans la physiologie de la plante reste encore mal connu. Toutefois, Elles sont en général considérées comme des déchets du métabolisme ou des sous produits de l'activité métabolique d'une plante (Amiot J., 2005). Cependant, plusieurs effets apparents utiles ont été décrits telles que la réduction de la compétition des autres espèces de plantes (allélopathie) par inhibition chimique de la germination des graines. Certains auteurs pensent que les huiles essentielles pourraient avoir un rôle

attractif vis-à-vis des insectes pollinisateurs et les microorganismes, favorisaient ainsi la pollinisation (**Bruneton J., 1999, Guignard J., 2000**). D'autres auteurs affirment que les huiles essentielles jouent un rôle hormonal, régulateur et catalyseur dans le métabolisme végétal, assurer leur ultime défense et semblent aider la plante à s'adapter à son environnement (**Fouché J.G., 2000**).

### **3. Domaine d'application en Agriculture**

La volonté de réduire l'utilisation des pesticides de synthèse dans l'agriculture moderne en faveur de l'écologie, du développement et de l'aménagement durables, s'est affermie ces dernières années. Concernant les pesticides, l'un des projets de loi vise à réduire la consommation en produits phytosanitaires de 50% en dix ans, l'échéance étant 2018 (**Ministère de l'agriculture et de la pêche, 2008**).

Dans ce contexte environnemental, les pesticides naturels basés notamment sur les huiles essentielles, représentent une alternative intéressante pour la protection des cultures contre les insectes mais également contre les adventices et les champignons (**Isman M.B., 2000**). Les modes d'application sont très variés soit par fumigation, attractif ajouté aux pièges à phéromones, répulsif ou par contact (**Regnault Roger C. et Hamraoui A., 1995**).

### **4. Techniques d'extraction des huiles essentielles :**

La quantité des huiles essentielles contenues dans les plantes est toujours faible, parfois très faible. Il faut parfois plusieurs tonnes de plantes pour obtenir un litre d'huile essentielle, ce qui explique leur coût élevé. (**Tableau 2**) Cependant, les huiles essentielles sont généralement diluées avant d'être utilisées à cause de leur toxicité à trop fortes concentrations (**Couic-Marinier F. et Lobstein A., 2013**).

**Tableau 2** : Rendements en huiles essentielles chez certaines plantes (Anonyme, 2011).

Pour 100 kg de plantes fraîches	Quantité d'huile essentielle obtenue à la distillation
Eucalyptus globuleux	2 à 3 kg
Lavande officinale	Env. 1 kg
Géranium rosat	100 à 300 grammes
Marjolaine à coquilles	300 à 400 grammes
Rose de Damas	3 à 8 grammes
Mélisse officinale	15 à 20 grammes

Les différentes méthodes principales pour l'extraction des huiles essentielles sont

- Hydrodistillation
- L'entraînement à la vapeur d'eau
- L'hydro diffusion
- L'expression à froid
- Extraction par solvant
- Extraction par les corps gras
- Extraction par les fluides supercritiques
- Extraction par micro- onde.

Quel que soit le type d'extraction utilisé, Les étapes de l'extraction des huiles essentielles d'origine végétale restent identiques. Il est nécessaire dans un premier temps d'extraire de la matière végétale les molécules aromatiques constituant l'huile essentielle, puis dans un second temps de séparer ces molécules du milieu par distillation comme cela est illustré dans la figure. (**Figure 2**)

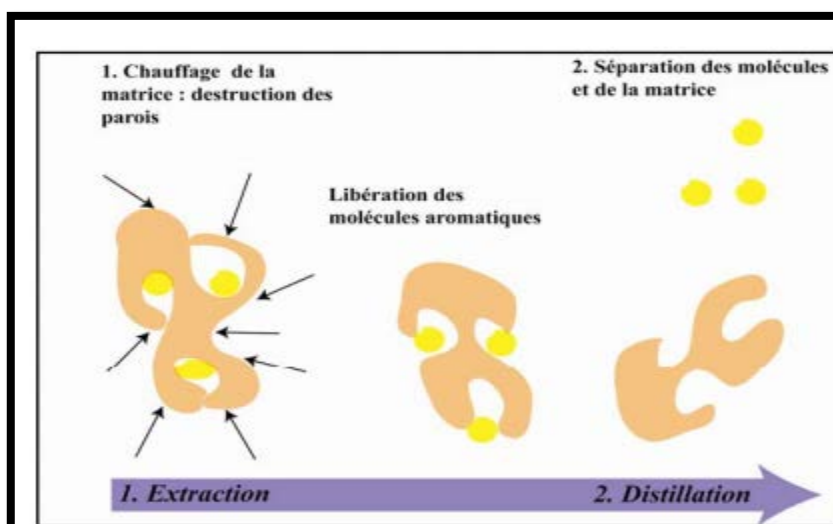


Figure 2: Les étapes de l'obtention d'une huile essentielle

#### 4.1 Extraction par hydrodistillation :

La plante est mise en contact avec de l'eau dans un ballon lors d'une extraction au laboratoire ou dans un alambic industriel. Le tout est ensuite porté à ébullition. Les vapeurs sont condensées dans un réfrigérant et les HE se séparent de l'eau par différence de densité, les parties insolubles dans l'eau de condensation sont décantées et, en raison de sa plus faible densité, l'huile essentielle se place au dessus de la phase aqueuse. La phase aqueuse contenant les composés hydrosolubles est appelée eau de distillation (ou hydrolat). (Figure3)

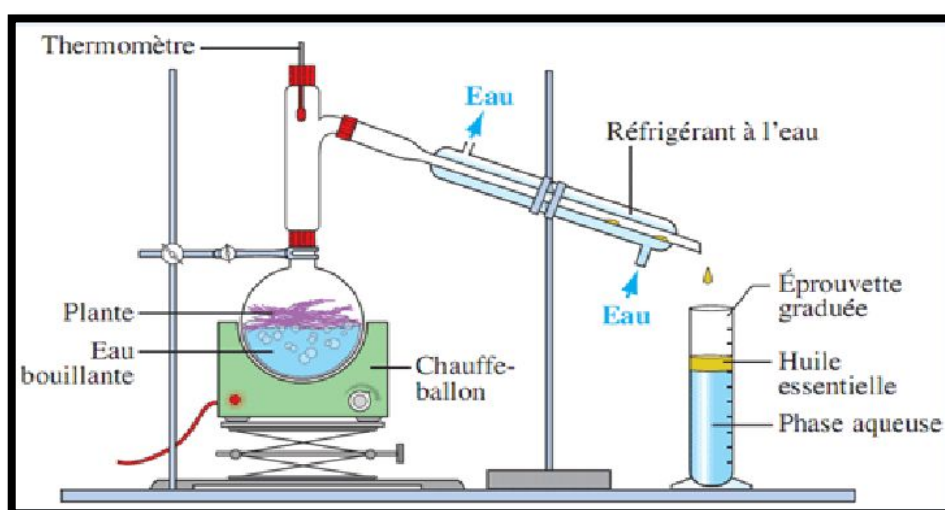


Figure 3: Montage d'extraction par Hydrodistillation. (Anonyme, 2015)

## 4.2 Extraction par entraînement à la vapeur d'eau :

A la différence de l'hydrodistillation, cette technique ne met pas en contact direct l'eau et la matière végétale à traiter. Le but de cette méthode est d'entraîner avec la vapeur d'eau les constituants volatils des produits bruts. La vapeur détruit la structure des cellules végétales, libère les molécules contenues et entraîne les plus volatiles en les séparant du substrat cellulosique. La vapeur, chargée de l'essence de la matière première distillée, se condense dans le serpentin de l'alambic avant d'être récupérée dans un essencier (vase de décantation pour les huiles essentielles). Les parties insolubles dans l'eau de condensation sont décantées pour donner l'huile essentielle surnageant. (Figure 4)

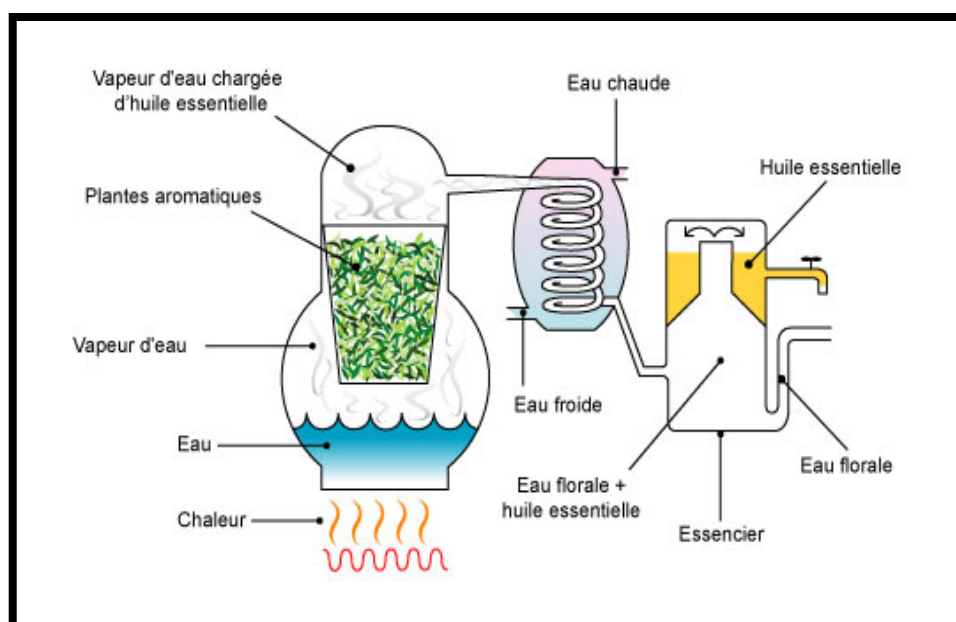


Figure 4: Montage d'extraction par entraînement à la vapeur d'eau (Anonyme 1, 2018).

## 4.3 L'hydro diffusion :

Consiste à faire passer un courant de vapeur d'eau à très faible pression à travers la masse végétale. La composition des produits obtenus est sensiblement différente au plan qualitatif de celle des produits obtenus par les méthodes précédentes. L'industrie des parfums a utilisé jadis l'enfleurage, pour les organes fragiles comme les fleurs, c'est-à-dire le contact avec un corps gras qui se sature d'essence. Le corps gras est épuisé par l'alcool absolu et ce solvant est évaporé sous vide à 0°C. (Figure5)

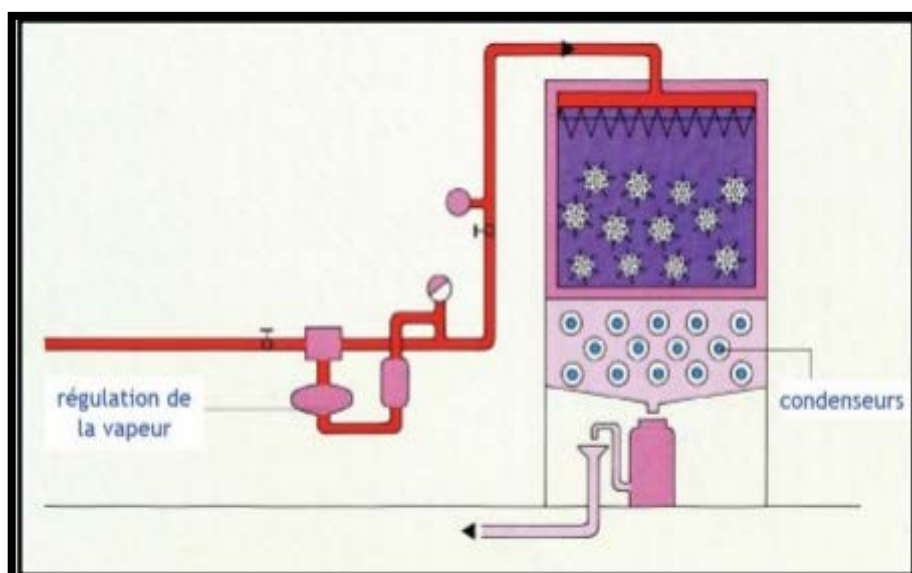


Figure 5: Montage d'extraction par hydrodiffusion (Anonyme 1,2010)

#### 4.4 L'extraction à froid :

L'extraction par expression à froid, est souvent utilisée pour extraire les huiles essentielles des agrumes comme le citron, l'orange, la mandarine, etc. Son principe consiste à rompre mécaniquement les poches à essences. L'huile essentielle est séparée par décantation ou centrifugation. D'autres machines rompent les poches par dépression et recueillent directement l'huile essentielle, ce qui évite les dégradations liées à l'action de l'eau (Chaintreau A., 2003).

#### 4.5 Extraction par solvants :

Cette méthode est utilisée pour les organes végétaux présentant une concentration en essence relativement faible ou pour les essences que l'on ne peut extraire par distillation. Elle est basée sur le pouvoir qu'ont certains solvants organiques à dissoudre les composants des huiles essentielles. Grâce à des lavages successifs, le solvant va dissoudre et extraire les constituants solubles contenus dans la plante avant d'être envoyé au concentrateur pour y être distillé à pression atmosphérique dont l'évaporation laisse un résidu cireux, très coloré et très aromatique appelé «concrète». Le traitement de cette concrète par l'alcool absolu conduit à «l'absolue» (Belaïche P., 1979) et (Mebarka L., 2007) (Figure 6 )



Figure 6 : Technique d'extraction par solvant (Anonyme 2 ,2010)

#### 4.6 Extraction par les corps gras :

La méthode d'extraction par les corps gras est utilisée en fleurage dans le traitement des parties fragiles de plantes telles que les fleurs, qui sont très sensibles à l'action de la température. Elle met à profit la liposolubilité des composants odorants des végétaux dans les corps gras. Le principe consiste à mettre les fleurs en contact d'un corps gras pour le saturer en essence végétale. Le produit obtenu est une pommade florale qui est ensuite épuisée par un solvant qu'on élimine sous pression réduite. Dans cette technique, on peut distinguer l'enfleurage où la saturation se fait par diffusion à la température ambiante des arômes vers le corps gras et la digestion qui se pratique à chaud, par immersion des organes végétaux dans le corps gras (Lawrence B.M., 1995). (Figure 7)

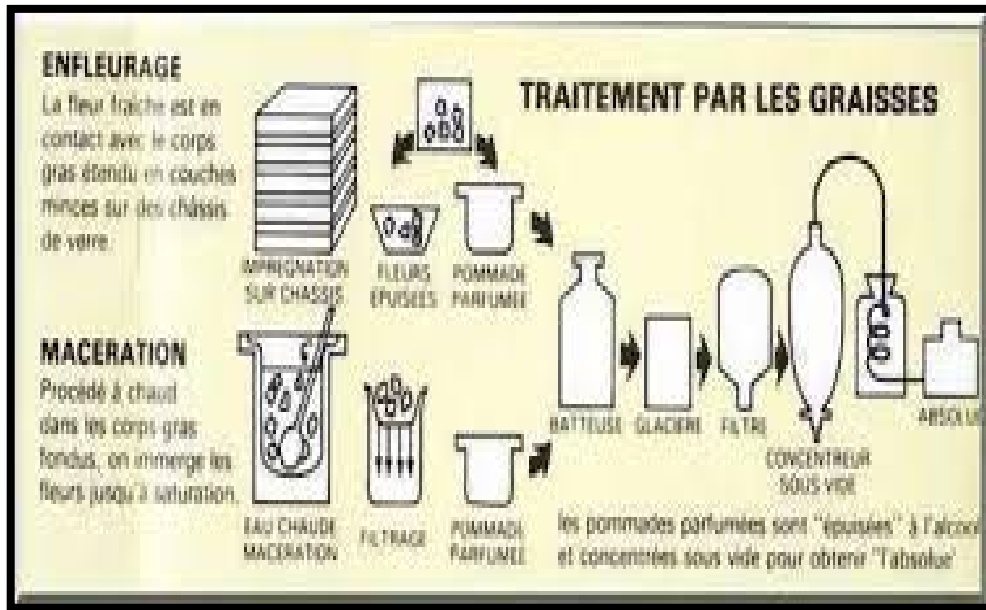


Figure 7: Technique d'extraction par les corps gras. (Anonyme 2,2018)

#### 4.7 Extraction par les fluides supercritiques :

L'originalité de cette technique repose sur le solvant utilisé, il s'agit de CO<sub>2</sub> supercritique. A l'état supercritique (à T= 31°C et P = 73bars), le CO<sub>2</sub> possède un bon pouvoir d'extraction. Dans ce système, le solvant est utilisé en boucle par interposition d'échangeurs de chaleur, d'un compresseur et d'un détendeur afin de porter le solvant à l'état désiré à chaque stade du processus. La séparation de l'extrait a lieu en phase gazeuse par simple détente. L'avantage de cette méthode est la possibilité d'éliminer et de recycler le solvant par simple compression détente. (Figure 8)

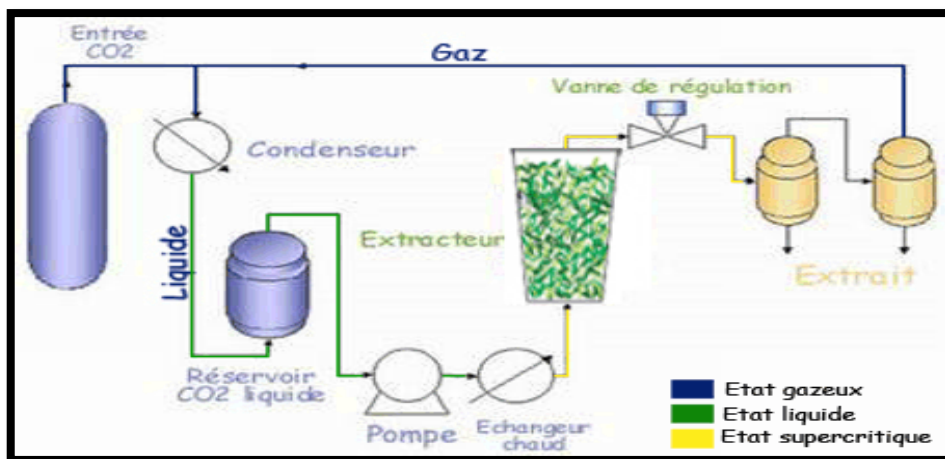


Figure 8: Montage d'extraction par les fluides supercritiques. (Anonyme 3,2018)

#### 4.8 Extraction par micro-ondes :

Le procédé d'extraction par micro-ondes appelée Solvent Free Microwave Extraction ou SFME consiste à extraire l'huile essentielle à l'aide d'un rayonnement micro-ondes d'énergie constante et d'une séquence de mise sous vide. Ce procédé est basé sur l'absorption de l'énergie de micro-onde par les composantes du matériel végétal et qui sont mesurées par une constante diélectrique, cette absorption dépend aussi de la fréquence de l'onde et de la température du matériel végétal. (Figure 9)

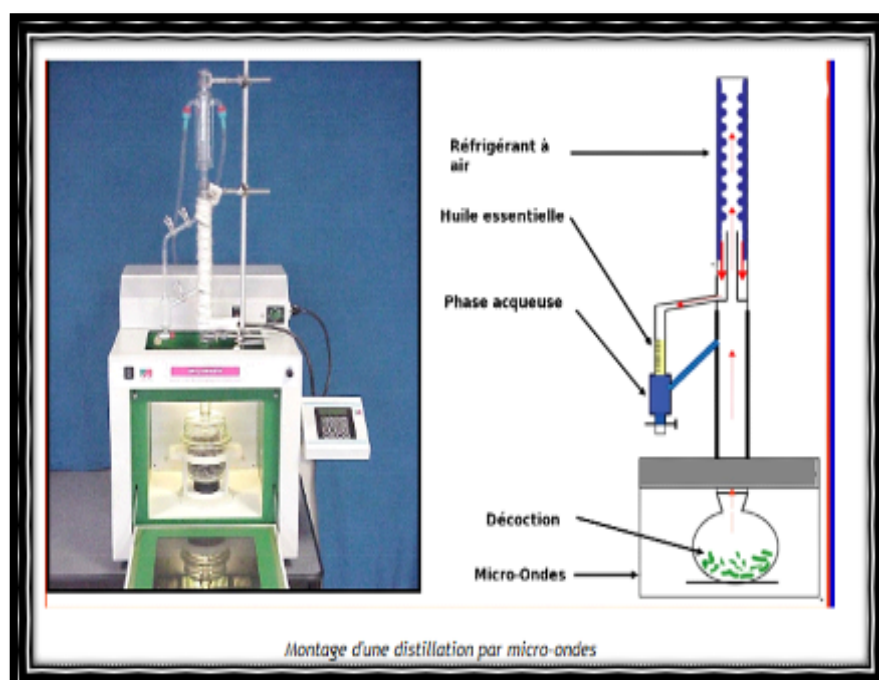


Figure 9 : Extraction assisté par micro-ondes. (Anonyme 4,2018)

### 5. Activité microbiennes des huiles essentielles

#### 5.1 Activité antibactérienne :

Un agent antimicrobien est une substance d'origine synthétique ou naturelle, utilisée pour la destruction ou l'inhibition de la croissance de micro-organismes, notamment des bactéries (Courvalin P. et al., 1990). Beaucoup de plantes aromatiques et leurs huiles essentielles montrent une activité antimicrobienne qui pourraient empêcher la

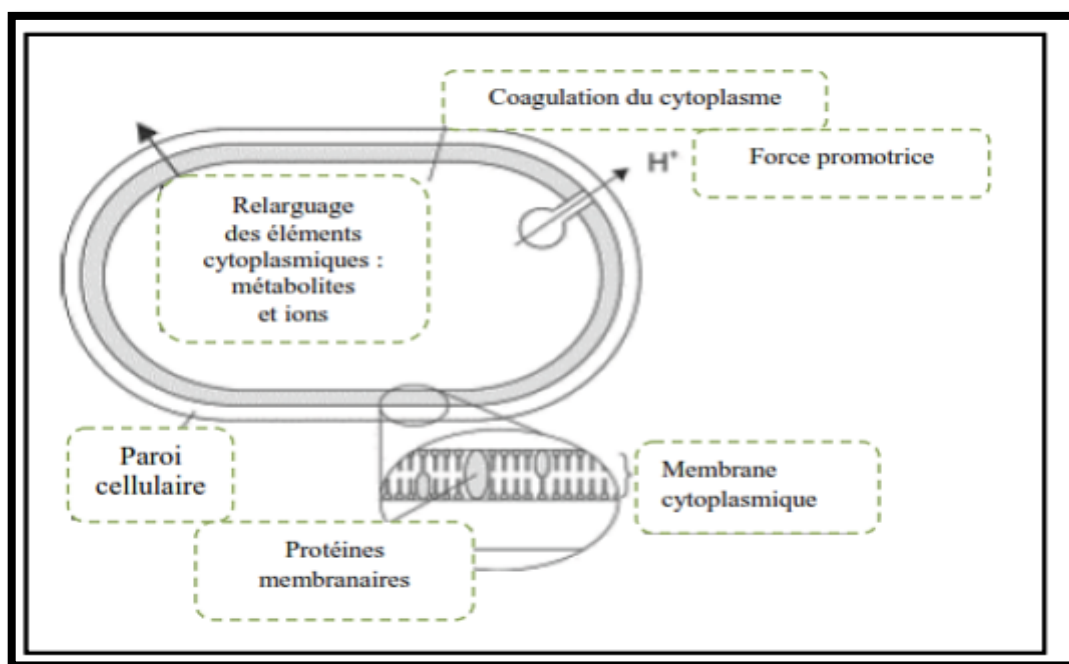
croissance des microorganismes d'altération et pathogènes, améliorant de ce fait la sécurité alimentaire. (**Sacchetti G. et al., 2005**).

Il est très probable que chacun des constituants des huiles essentielles et son propre mécanisme d'action.

Les caractéristiques des huiles essentielles sont attribuées aux dérivés terpénoïdes et phénylpropanoïdes dont elles sont constituées. L'activité de ces molécules bioactives dépend, à la fois, du caractère lipophile de leur squelette hydrocarboné et du caractère hydrophile de leurs groupements fonctionnels. Les molécules oxygénées sont généralement plus actives que les molécules hydrocarbonées (**Guinoiseau E., 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. (**Figure 10**)

D'une manière générale, l'action des huiles essentielles 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.



**Figure 10:** Sites d'action des huiles essentielles sur la cellule bactérienne

(Burt S., 2004)

## 5.2 Activité antifongique :

Dans le domaine phytosanitaire et agro-alimentaire, les huiles essentielles ou leurs composés actifs pourraient également être employés comme agents de protection contre les champignons phytopathogènes et les microorganismes envahissant la denrée alimentaire (Lis-Balchin M., 2003)

Les huiles essentielles agissent sur un large spectre de moisissure et de levure en inhibant la croissance des levures et la germination des spores, l'élongation du mycélium, la sporulation et la production de toxines chez les moisissures.

Le pouvoir antifongique est attribué à la présence de certaines fonctions chimiques dans la composition des huiles essentielles.

L'action antifongique de ces composées est due à une augmentation de la perméabilité de la membrane plasmique suivie d'une rupture de celle-ci entraînant une fuite du contenu cytoplasmique et donc la mort de la levure. (Cox S. et al., 2000)

En effet, les composés terpéniques des huiles essentielles et plus précisément leurs groupements fonctionnels tels que les phénols et les aldéhydes réagissent avec les enzymes membranaires et dégradent la membrane plasmique des levures. **(Knobloch K. et al., 1989).**

## 1. *Fusarium oxysporum* :

### 1.1 Généralité :

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 H.F. en 1809**, ce dernier a créé le genre pour des espèces présentant des spores macro conidies cloisonnées, fusiformes, formées sur des stromas.

Les espèces de *Fusarium oxysporum* se caractérisent par une large gamme de plante hôtes et la plus part des souches pathogène de *Fusarium oxysporum* envahissent le système vasculaire de ces plantes et présente une spécificité parasitaire c-à-d que l'espèce ne peut attaquer qu'un hôte déterminée. (**Ozenda P., 1990**)

### 1.2 Taxonomie :

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

Ainsi, les travaux de **Wollenweber H.W. et Rincking O.A., 1935**, qui ont servi de références, ont pu décrire 65 espèces 55 variétés et 22 formes rassemblées en 16 sections et 06 sous sections.

Le genre *Fusarium* a été profondément revu par **Snyder W. C. et Hansen H. N. en 1940**, **Messiaen C. N. et Cassini R. en 1968**, ils ont simplifiés la classification pour ne retenir que 09 espèces dont le but de détermination rapide des parasites rencontrés (**Bounaga N., 1985**). 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. Ce champignon dispose d'une large répartition géographique mais est plus adapté aux climats tempérés, se développe à des

températures comprises entre 5 et 37° C avec un optimum entre 25 et 30° C. Il est présent dans les sols sous forme sporulée.

### 1.3 Systématique :

*Fusarium oxysporum* est considéré comme ascomycète proche du groupe télé morphique Gibberella que Nectria (Di Pietro M. et al., 2003 , Michielse M. et Rep C. B. ,2009) et ayant plus de 120 formes spéciales.

<b>Règne</b>	<i>Fungi</i>
<b>Division</b>	<i>Ascomycota</i>
<b>Classe</b>	<i>Sordariomycetes</i>
<b>Sous-classe</b>	<i>Hypocreomycetidae</i>
<b>Ordre</b>	<i>Hypocreales</i>
<b>Famille</b>	<i>Nectriaceae</i>
<b>Genre</b>	<i>Fusarium</i>
<b>Espèce</b>	<i>Fusarium oxysporum</i>

### 1.4 Caractères morphologiques 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 (violet, mauve, orange ou beige) qui sont dues à la formation d'une multitude de spores en surface par des organes fructifère, ainsi qu'aux variations de la lumières du milieu de culture.

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 sporochies ou des sclérotés, les microconidies, les chlamydospores, et les macroconidies .

- Microconidies fusiformes à réniformes, présentant de 0 à 2 septa, agglomérées en fausses têtes, produites par de petites phi-alides lagéniformes dans le mycélium aérien. (5 - 12 x 2.2 - 3.5  $\mu\text{m}$ ).
- Macroconidies légèrement arquées, présentant cellule basale pédicellée, cellule apicale en crochet, produites par des phialides sur des conidiophores ramifiés ou en sporodochies. (27 - 46 x 3 - 4.5  $\mu\text{m}$ ).
- Chlamydospores hyalines lisses ou rugueuses, globuleuses, terminales ou intercalaires, en chaîne, en paire ou isolées, formées dans l'hyphe ou les macroconidies. (5 - 15  $\mu\text{m}$  de diam.).

Les champignons du genre *Fusarium* synthétisent des toxines responsable de l'augmentation de la perméabilité cellulaire et d'une importante transpiration des plantes atteintes comme les lycomarasmines et de l'Acide fusarique et qui facilite la classification des différentes espèces du champignon (**Corbaz R., 1990**).

### **1.5 Incidences :**

*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 G.M. et Armstrong J.K., 1965**).

Il est responsable de diverses maladies, la principale étant le flétrissement vasculaire caractérisée par un flétrissement des plantes dû à l'envahissement des vaisseaux du xylème par le pathogène, il provoque une pourriture des tissus avec apparition d'un mycélium blanc rosé à la surface. (**Photo1**)



**Photo 1** : Symptômes de *Fusarium oxysporum* sur les feuilles de bananier

(Anonyme, 2011)

## 2. *Botrytis cinerea*

### 2.1 Généralités :

Le terme *Botrytis cinerea* dérive du Grec “*botrys*”, qui signifie “grappe de raisin” et du Latin “*cinerea*”, qui fait référence à la couleur gris cendré du champignon. Au microscope, en faisant preuve d’un peu d’imagination, les structures transportant les spores fongiques ont effectivement l’allure d’une grappe de raisin.

Le champignon peut infecter plus de 200 espèces de plantes, mais il provoque des ravages et des pertes de rendement principalement chez les fraises et les raisins.

Le *Botrytis* préfère les fleurs et les fruits, mais il peut également pousser sur les tiges, les feuilles et les graines. Les graines infectées transportent le champignon qui ne se développera que lorsque les conditions seront propices, généralement lors de la germination.

### 2.2 Taxonomie :

*Botrytis cinerea* est un espèce de champignon haploïde de la famille des Sclerotiniaceae de la division des Ascomycota .Ce champignon phytopathogène est

responsable de la pourriture grise ; maladie cryptogamique qui sévit sur plusieurs cultures d'intérêt agronomique majeur comme la vigne, le tournesol, la tomate, la fraise.

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

- une forme parfaite (téléomorphe), *Botryotinia fuckeliana*, c'est un Ascomycète, de la classe des Discomycètes, de l'ordre des Léotiales, famille des Sclerotiniaceae.
- 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 F. et al., 2005**).

### 2.3 Systématique :

La classification de *Botrytis cinerea* selon **Christiaan Hendrik Persoon (1974)**, est la suivante :

<b>Règne</b>	<i>Fungi</i>
<b>Division</b>	<i>Ascomycota</i>
<b>Classe</b>	<i>Leotiomycetes</i>
<b>Ordre</b>	<i>Helotiales</i>
<b>Famille</b>	<i>Sclerotiniaceae</i>
<b>Genre</b>	<i>Botrytis</i>
<b>Espèce</b>	<i>Botrytis cinerea.</i>

## 2.4 Caractères morphologiques de *Botrytis cinerea*

Au cours de son cycle biologique, *Botrytis cinerea* peut produire du mycélium, des spores asexuées ou conidies, des spores sexuées ainsi que des sclérotés. Le mycélium de *Botrytis 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".

Lorsque les conditions deviennent favorables, *Botrytis 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 G. et al., 2004**). Les spores germent à partir de 18-23° C et un taux d'humidité relative à plus de 95%.

## 2.5 Incidences :

Plantes hôtes *Botrytis cinerea* est un champignon polyphage capable d'attaquer plus de 230 espèces de plantes (**Jarvis W.R., 1980**). Il affecte de nombreuses productions végétales d'importance économique en culture sous serre ou en plein champ, comme par exemple: le raisin (**Photo 2**), 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 M.L., 1992**).

*Botrytis cinerea* est l'agent responsable de la pourriture grise Le champignon à plusieurs armes chimiques à sa disposition:

- des enzymes qui percent la paroi et la membrane cellulaire
- Des toxines ses quiterpéniques 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.



**Photo 2:** Symptômes de *Botrytis cinerea* sur une grappe de raisin  
(Anonyme, 2018)

### 3. *Erwinia carotovora* :

#### 3.1 Généralités

Cette espèce cosmopolite peut survivre dans le sol soit sous forme libre, soit sur les débris marcescents de plantes atteintes, soit encore dans de plusieurs insectes. L'infection se fait par blessures. Après une phase de multiplication dans les tissus parenchymateux ou les espaces intercellulaires, la bactérie produit des enzymes pectolytiques et, en moindre mesure, cellulolytiques : les premiers causent la rupture de la lamelle moyenne et par conséquent la désagrégation des tissus et des organes (pourriture molle). Sur ceux-ci s'installent aussi d'autres micro-organismes protéolytiques, responsables de l'odeur pestilentielle.

#### 3.2 Taxonomie

Le genre *Erwinia carotovora* est un groupe de bactéries pectinolytiques isolé pour la première fois en **1901 par Jones L.R.**, sous le nom de *Bacillus carotovorus* d'une pourriture humide de carotte (**Skerman B.D. et al., 1980**). En

1920, en honneur du phytopathologiste Erwin F. Smith, Winslow classe 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. (Perombelon M.C.M. et Kelman A., 1980), Toth I.K. et Birch P.R.J., 2005).

Des récentes études de taxonomie ont conduit les auteurs à distinguer clairement trois genres différents : *Pectobacterium spp*, *Dickeya spp* et *Brenneria spp*. Pendant plusieurs décennies, les entérobactéries causant les maladies de la pourriture molle ont été rangées dans le groupe des *Carotovoras*, bien qu'il était évident que les *Erwinias* responsables de la pourriture molle et de la nécrose des organes végétaux de diverses cultures ne puissent pas être décrites par le même genre (Charkowski A.O., 2006).

### 3.3 Systématique :

La classification d'*Erwinia carotovora* selon Jones L.R., 1901 est la suivante :

<b>Règne</b>	<i>Bacteria</i>
<b>Division</b>	<i>Ascomycota</i>
<b>Classe</b>	<i>Gamma Proteobacteria</i>
<b>Ordre</b>	<i>Enterobacteriales</i>
<b>Famille</b>	<i>Enterobacteriaceae</i>
<b>Genre</b>	<i>Pectobacterium</i>
<b>Espèce</b>	<i>Erwinia carotovora</i>

### 3.4 Caractères morphologiques d'*Erwinia carotovora*

Ce sont des bactéries phytopathogènes Gram (-), anaérobiques facultatives, non sporulées ayant une forme de bâtonnet (0,5-1  $\mu\text{m}$  de diamètre sur 1-3  $\mu\text{m}$  de longueur). Ainsi, ils sont munis de flagelles péri triches (**Charkowski A.O., 2006**).

Elles peuvent être isolées, par paires ou en courtes chaînes, oxydase négative, catalase positive et nitrate réductase positive. La température optimale de croissance de ces espèces est de 27 et 30 à 32°C, leur température maximale varie de 32 à 42°C. Elles possèdent une forte activité pectinolytique due à la production de pectinases (**Murashi T.F. et al., 1965 ; Yahiaoui-Zaidi R. et al., 2003 ; Lautier T., 2007**).

### **3.5 Incidences :**

*Erwinia carotovora* est distribuée sur une aire géographique plus vaste et la cause de la pourriture molle d'une diversité de fruits et de légumes à savoir la pomme de terre, le chou de Bruxelles, le poivre, la carotte, etc. elle infecte les plantes en pénétrant par les plaies ouvertes . Elle ne peut pas infecter de jeunes feuilles saines, mais peut se développer sur des feuilles plus âgées et, de là, atteindre la tige principale en passant par le pétiole et les vaisseaux conducteurs constituant le xylème.

Cette maladie intéresse surtout les cultures pluriannuelles. L'appareil aérien des plantes atteintes montre un flétrissement et un dessèchement progressifs à partir des feuilles extérieures. L'appareil racinaire et le collet sont le siège d'une pourriture qui commence avec des brunissements de la moelle et aboutit à la désagrégation totale des tissus ; ces derniers exhalent une odeur pestilentielle. Au fur et à mesure de l'extension de l'épidémie, la parcelle présente de grandes zones dépourvues de plantes

*Erwinia carotovora* est un agent pathogène de nombreux fruits et légumes (pomme, carotte, betterave, navet, tomate, pomme de terre). ( **Photo 3** )

(Pérombelon M.C.M. & Kelman A., 1980). L'arsenal de pathogénicité des *Erwinia 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 N.A. et al., 2001).



**Photo 3** : Symptômes d'*Erwinia carotovora* sur tubercule de pomme de terre (Anonyme ,2005)

Notre travail est réalisé au niveau de Laboratoire de Recherche

« Microbiologie et Biologie Végétale »

1. But de travail :

Il porte sur le pouvoir antibactérien et antifongique de l'huile essentielle de la *Mentha pulegium L.* sur les microorganismes phytopathogènes.

2. Matériel végétal :

2.1 Préparation de l'échantillon la *Menthe pulegium*:

La plante sur laquelle nous avons travaillé est : *Mentha pulegium* son origine de la région « Achaacha » à Ain Bahara à l'ouest de Mostaganem (Figure11), la récolte a été faite au début de mars, manuellement et la menthe a été acheminée vers notre laboratoire de recherche. La plante a d'abord été séchée à l'air libre, à l'abri de la lumière et à l'ombre pendant quelques jours.

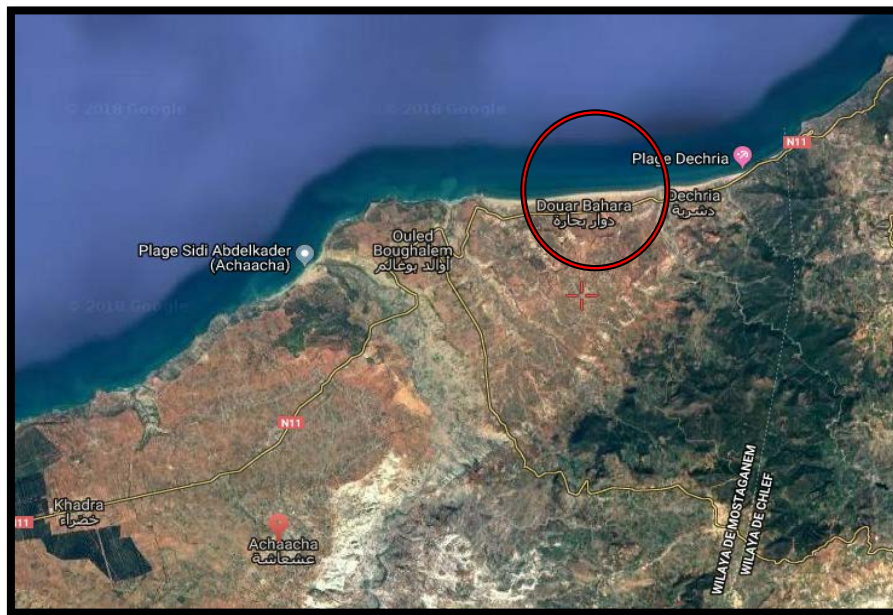


Figure 11 : Stations de récolte de la *Menthe pulegium* (Google Earth)

Après séchage de la plante (Photo 4), le taux d'humidité est stable, exprimé en pourcentage et calculé par la formule suivante :

$$H(\%) = ((M_1 - M_2) / M_1) * 100$$

Considérons :

H% : taux d'humidité exprime en pourcentage.

$M_1$  : poids de plante fraîche en gramme.

$M_2$  : poids de plante sèche en gramme.

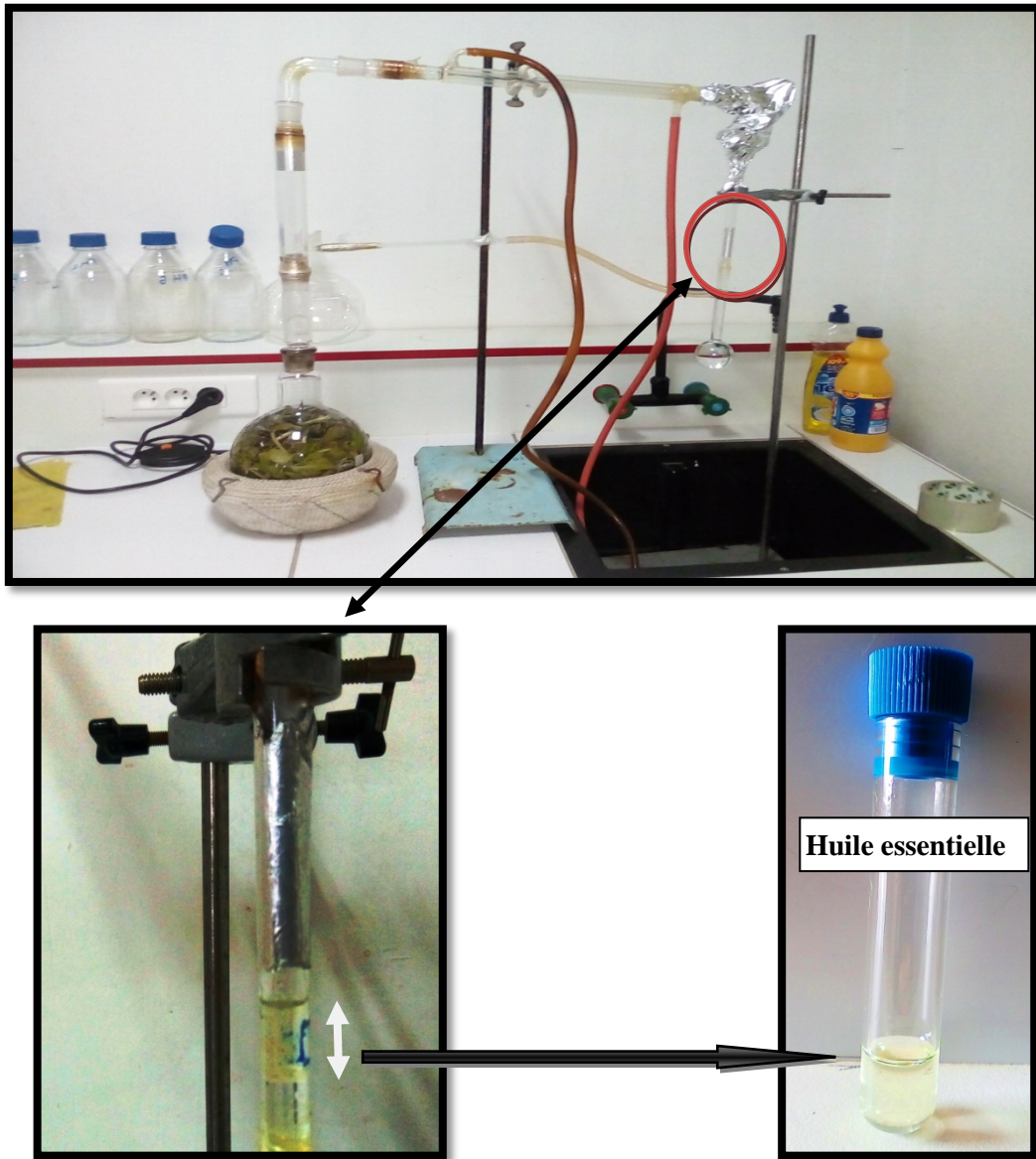


**Photo 4:** Feuille fraîche de *Mentha pulegium*(*Fliou*) (photo originale) avant et après séchage.

### 2.1.1 Procédés d'extraction de l'huile essentielle par Hydro distillation

L'extraction de l'huile essentielle a été réalisée par la méthode hydro distillation concernant les feuilles de la *Mentha pulegium L.*

L'hydrodistillation est assurée grâce un appareil de type Clevenger (**Photo 5**). Cela consiste à introduire 100 g de matériel végétal dans un ballon de 2 Litres contenant de l'eau distillée. L'ensemble est porté à l'ébullition pendant 3H à l'aide d'une chauffe ballon. Les vapeurs chargées d'huile essentielle, traversent le réfrigérant et se condensent ainsi avant de chuter dans une ampoule de décantation, l'huile se sépare par la suite de l'eau par différence de densité. L'huile obtenue est conservée à 4°C dans des tubes en verre opaques, fermés hermétiquement pour la préserver de l'air et de la lumière jusqu'à son usage.



**Photo 5 :** Montage d'un Hydro distillateur de type Clevenger pour l'extraction de l'huile essentielle (photos originales)

### 2.1.2 Calcul du rendement

Selon la norme **AFNOR (1986)**, le rendement en huile essentielle est défini comme étant le rapport entre la masse d'huile essentielle obtenue après extraction et la masse de la matière végétale sèche utilisée. Il est exprimé en pourcentage et calculé par la formule suivante :

$$R_{HE} = M_{HE}/M_s * 100$$

**R<sub>HE</sub>**: Rendement en huile essentielle en %.

**M<sub>HE</sub>**: Masse d'huile essentielle en gramme.

**M<sub>s</sub>** : Masse de la plante sèche en gramme.

### 3 Matériel biologique

#### 3.2 Origine des souches phytopathogènes

Les souches utilisées dans ce travail comportent des souches phytopathogènes qui proviennent de la collection du laboratoire de recherche « Protection des Végétaux » à l'université de Mostaganem sont conservées à 4°C depuis mois de janvier 2018 (Tableau3).

Souches
<i>Fusarium oxysporum</i>
<i>Botrytis cinerea</i>
<i>Erwinia carotovora</i>

**Tableau 3** : Les différentes souches phytopathogènes utilisées.

##### 3.2.1 Revivification et repiquage des souches microbiennes :

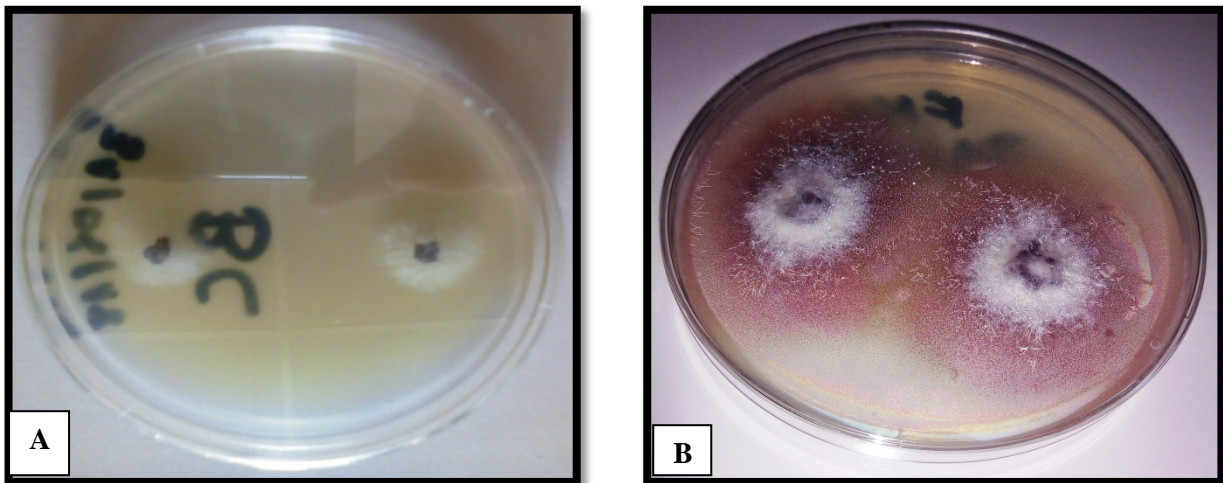
La revivification des souches, une étape nécessaire avant leur utilisation car leur activité biologique est nulle à l'état conservé. Cette revivification a pour objectif l'obtention d'une culture jeune et pure.

- Elle se fait en réalisant un repiquage sur gélose nutritive favorable à leur croissance, selon **Guiraud J., 2003** dans le cas des espèces phytopathogènes, il est préférable d'utiliser des milieux à base de décoction végétale comme le milieu pomme de terre gélosé (PDA) (**Annexe1**) pour les champignons, et milieu Muller Hinton (MH) (**Annexe 3**) pour la bactérie. En premier, la souche de référence a été sortie du

réfrigérateur et déposée sur la paille pour revenir à la température ambiante.

- a. On a prélevé 1ml du milieu de conservation de la bactérie.
  - Et mis dans 10ml de bouillon nutritif (**Annexe 2**) et incubé à 37°C pendant 3 heures.
  - 0,1ml de cette dernière solution a été ensemencé en surface d'une boîte de Pétri contenant le milieu MH.
  - Incubation à 37 C pendant 24 heures.
- b. On a prélevé des disques de moisissure et déposer sur gélose PDA solidifié , incubé a 25°C pendant 3 à 5 jours. (**Annexe 5**)

Ce repiquage a permis d'obtenir des colonies distinctes (**Photo 6**).



**Photo 6 :** Revivification des souches A : Vue macroscopique de *Botrytis cinerea* sur PDA (Culture jeune) B : Vue macroscopique de *Fusarium oxysporum* sur PDA (Culture jeune) (photos originales)

### 3.2.2 Préparation de l'inoculum :

Dans 5 ml de l'eau physiologique (**Annexe 4**), nous avons prélevé quelques colonies similaires bien isolées. Après homogénéisation de la suspension bactérienne à l'aide d'un vortex, la densité est mesurée par spectrophotomètre réglé à une longueur d'onde de 625 nm. La densité optique

obtenue doit être comprise entre 0,08 et 0,1 ce qui correspond à une concentration de  $10^6$  à  $10^8$  UFC/ml (Rasooli et al., 2006). (Photo 7).



A : L'inoculum de *Fusarium oxysporum*



B : Spectrophotomètre

**Photo 7** : Mesure de la densité optique de l'inoculum (photos originales)

#### 4. Etude de l'activité antimicrobienne de l'huile essentielle :

##### 4.1 Technique d'aromatogramme :

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 :

- 100  $\mu$ l de suspension microbienne dont la turbidité a été ajustée à  $10^8$  UFC/ml pour la bactérie, et  $10^6$  spores/ml pour les champignons est ensemencée uniformément sur toute la surface des boîtes gélosées. Concernant la bactérie *Erwinia carotovora* l'ensemencement est en profondeur.
- Après séchage de la surface (environ 30 min) des disques stériles de papier Wattman (6mm), contenant 15  $\mu$ l d'huile essentielle à tester, on les dépose à l'aide d'une pince stérile à la surface d'un milieu gélosé approprié pour chaque souche, (Braga F.G. et al., 2007). (photo 8) Les disques sont confectionnés
- Les boîtes de Pétri sont ensuite fermées et laissées diffuser à température ambiante pendant 30 minutes avant d'être incubées à 30°C pendant 24H

pour les bactéries et à 25°C pendant 7 jours pour les champignons.



A : Immersion des disques dans l'huile



B : Boîte de pétri gélosée centrée avec un disque d'huile essentielle

**Photo8** : préparation des disques d'aromatogramme (photos originales)

- L'activité antimicrobienne de l'huile essentielle est déterminée en mesurant le diamètre de la zone d'inhibition formée autour de chaque disque. Les diamètres des zones d'inhibition sont ensuite mesurés au millimètre **Tableau 4**

**Tableau 4** : Transcription des diamètres d'inhibition des disques imprégnés (Moreira M.R., et al., 2005)

Diamètres de la zone d'inhibition (mm)	Transcription	Sensibilité du germe
<8	–	Résistant
9-14	+	Sensible
15-19	++	Très sensible
>20	+++	Extrêmement sensible

#### 4.2 Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) :

La CMI est définie comme étant la plus faible concentration en huile essentielle capable d'inhiber la croissance microbienne de 90% (Skandamis P.N. et Nychas G.J.E., 2001). Sa détermination a été réalisée par la méthode de

micro-dilution en milieu liquide. L'huile essentielle est tout d'abord préparée par émulsion dans le solvant éthanol à 1mg / $\mu$ l afin de disperser les composés et d'améliorer leur contact avec les germes à tester.

Des dilutions successives de la solution obtenue est ensuite effectuée par progression géométrique de raison à obtenir les dilutions suivantes : 1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32, 1/64 et 1/128 selon CLSI (**Clinical and Laboratory Standards Institute ,2008**).

La gamme de concentrations finales d'huile essentielle utilisée va de 0.5 à 0.00025 mg/ $\mu$ l.

- Dans cette technique, des microplaques à fond rond (96puits) sont utilisées pour déterminer la CMI, dans chaque ligne de la microplaque est déposé 100  $\mu$ l du bouillon nutritif.
- Ensuite 200  $\mu$ l de L'huile essentielle de concentration (1mg/  $\mu$ l) brut à tester sont introduits dans le premier puits. Après avoir bien mélangé le contenu du premier puits ,100  $\mu$ l est prélevé, puis déposé dans le 2<sup>ème</sup> puits, et ainsi de suite jusqu'au 11<sup>ème</sup> puits ou 100  $\mu$ l restants sont éliminés. Par conséquent, nous obtenons une dilution  $\frac{1}{2}$  entre chaque puits.
- le dernier puits représente le témoin (le puits n°12 contient uniquement le bouillon nutritif plus l'inoculum).
- Enfin, 100  $\mu$ l de l'inoculum ( $10^6$  UFC/ml pour champignon et  $10^8$  UFC/ml pour bactérie) est ajouté dans chaque puits. Les microplaques sont incubées à 28 °C pendant 48h. (**Figure 12**)

La lecture des résultats se fait à l'œil nue par observation du changement de turbidité dans les puits après incubation et par comparaison avec le témoin.

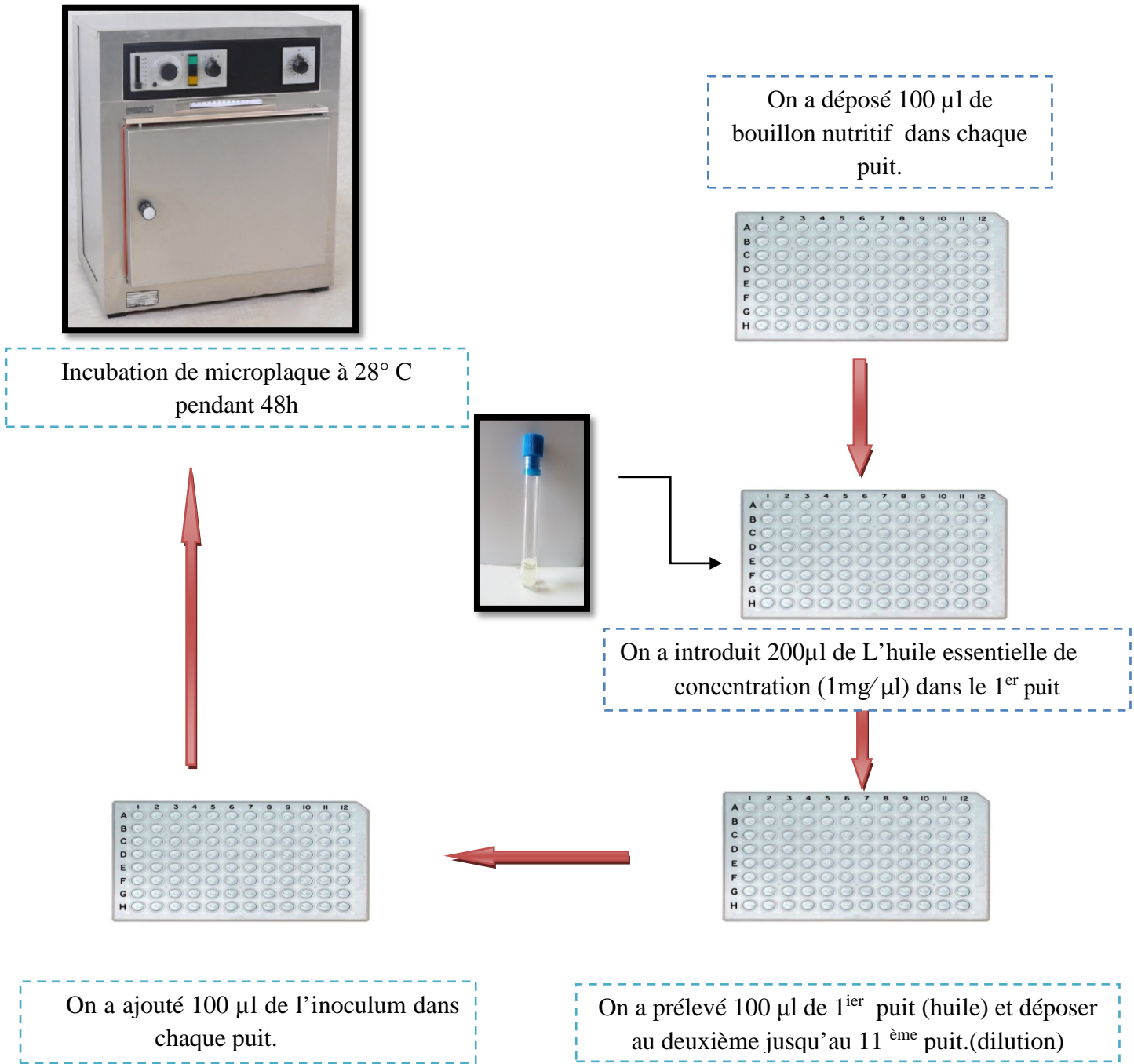


Figure 12 :Schéma representatif les étapes de CMI

#### 4.3 Détermination de la concentration minimale fongicide (CMF) :

A partir des puits des microplaques dans lesquels aucune croissance fongique n'est observée, 10  $\mu$ l a été prélevé et ensemencé par des stries de 5 cm de long dans le milieu gélosé PDA.

Les boîtes de Pétri sont ensuite portées à incubation à 25°C pendant 5 à 7 jours. La CMF correspond à la plus faible concentration d'huile essentielle à partir de laquelle aucune croissance n'est visible (**CLSI, 2002**).

#### **4.4 Détermination de la concentration minimale bactéricide (CMB) :**

Le contenu des puits de microplaque dans lesquels aucun trouble n'a été observé, a servi à ensemercer le milieu gélosé M.H et ce, par des stries de 5 cm de long à l'aide d'une anse en commençant par le tube correspondant à la CMI. La boîte de Pétri est ensuite incubée à 37°C pendant 24H (**Oussou K.P. et al, 2004**).

## 1. Rendement en huile essentielle

Le rendement moyen en huile essentielle de la partie aérienne de *Mentha pulegium* qui extraite par hydrodistillation a été calculé en fonction de la masse du matériel végétal traité. Le résultat obtenu illustré dans le **Tableau 5**

Huile essentielle	<i>Mentha pulegium</i>
Rendement (%)	0.38%

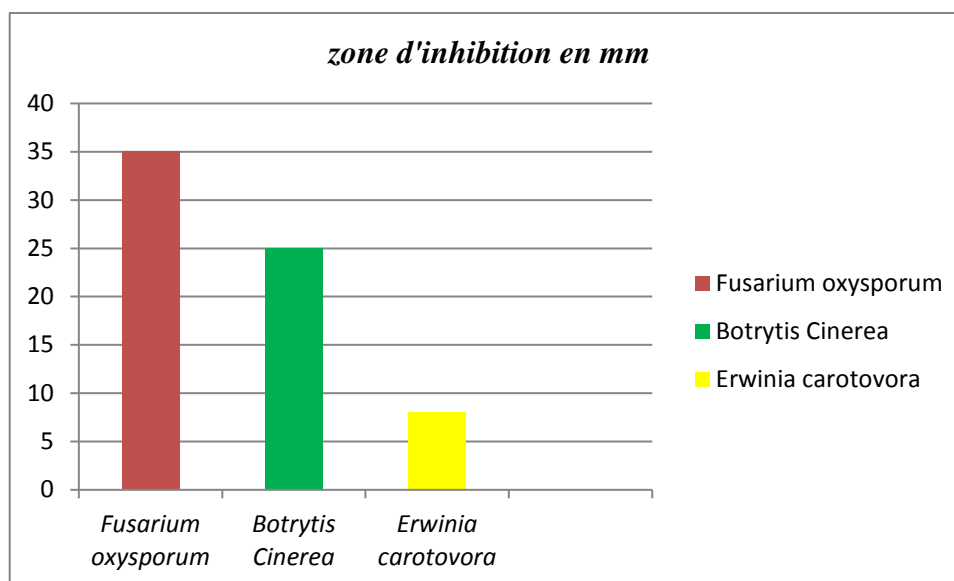
**Tableau 5** : Le rendement en huile essentielle de *Mentha pulegium*

L'huile essentielle de la *Mentha pulegium* est de couleur jaune clair et d'une odeur aromatique, a été exprimé en millilitre par rapport à 100 g de matière sèche de la partie aérienne de la plante, il est de **0.38 %**. Ce rendement peut être considéré comme faible comparativement à ceux obtenu par **Bouchikhi Z., 2011** à Tlemcen au mois d'avril environ 2 %, et 1,72% au début de floraison obtenue par **Khenaka K., 2011** à Constantine .Notre rendement en huile essentielle est similaire à celui obtenu par **Lahrech K., 2010** à Djelfa au mois d'avril et qui est environ 0.33 %. Cette différence de teneur en huile essentielle peut être liée à plusieurs facteurs tels que la zone géographique de collecte, le climat, le stade de développement et la saison, lieu de séchage, la température et la durée de séchage, la technique et le temps d'extraction...etc.

## 2. Etude de l'activité antimicrobienne des huiles essentielles

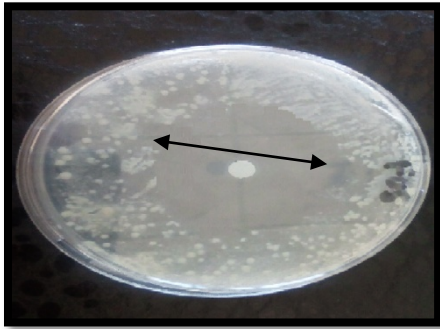
### 2.1 Technique de l'aromatogramme (Méthode de Vincent)

L'évaluation de l'activité antimicrobienne d' huiles essentielles de *Mentha pulegium* par la méthode de diffusion des disques sur milieu gélosé, nous a permis d'obtenir les résultats présentés dans la **Figure 13** :



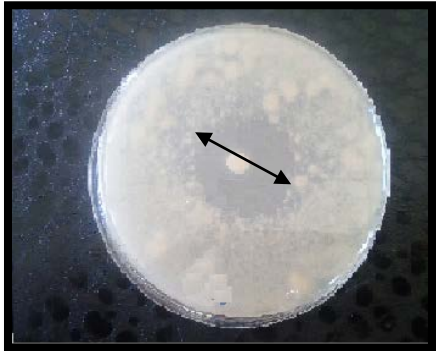
**Figure 13 :** Résultats de l'activité antimicrobienne de l'huile essentielle de *Mentha pulegium*

La lecture des résultats se fait par la mesure de diamètre des zones d'inhibition apparaissant, il sera considéré comme positif si le diamètre est supérieure à 8 mm. Nous remarquons que le *Fusarium oxysporum* est extrêmement sensible avec un diamètre de la zone d'inhibition de 35 mm et suivi d'un diamètre de 25 mm pour *Botrytis cinerea*, sur la bactérie phytopathogène *Erwinia carotovora*, nous constatons le contraire, la bactérie est résistante au l'huile avec une zone d'inhibition de 08 mm. **(Photo 9)**



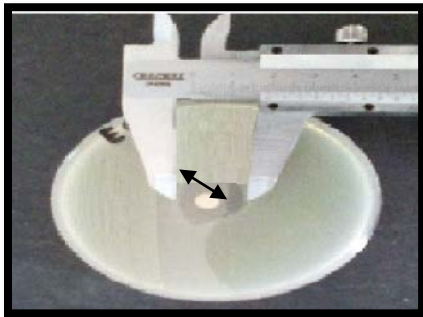
A : Vue macroscopique de *Fusarium oxysporum*

$\text{Ø} = 3.5\text{mm}$



B : Vue macroscopique de *Botrytis cinerea*

$\text{Ø} = 2.5\text{mm}$



C : Vue macroscopique de *Botrytis cinerea*

$\text{Ø} = 8\text{mm}$

**Photo 9:** Résultats de l'aromatogramme de l'huile essentielle de *Mentha pulegium* sur les trois germes étudiés A, B, C. (Photos originales)

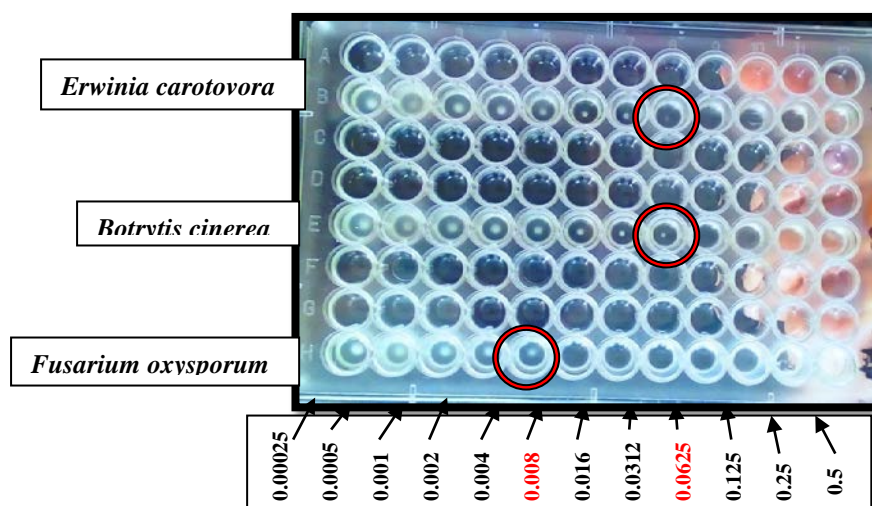
## 2.2 Détermination des concentrations minimales inhibitrice (CMI), bactéricide (CMB) et fongicide (CMF)

La détermination des paramètres antimicrobiens (CMI, CMB et CMF) de l'huile essentielle *Mentha pulegium L* a été effectuée sur les germes ayant présenté une sensibilité par le test d'aromatogramme. Les résultats obtenus sont résumés dans le **Tableau 6** ci dessous :

**Tableau 6** : Valeurs des paramètres antimicrobiens de l'huile essentielle de *Mentha pulegium L* exprimées en mg/ $\mu$ l

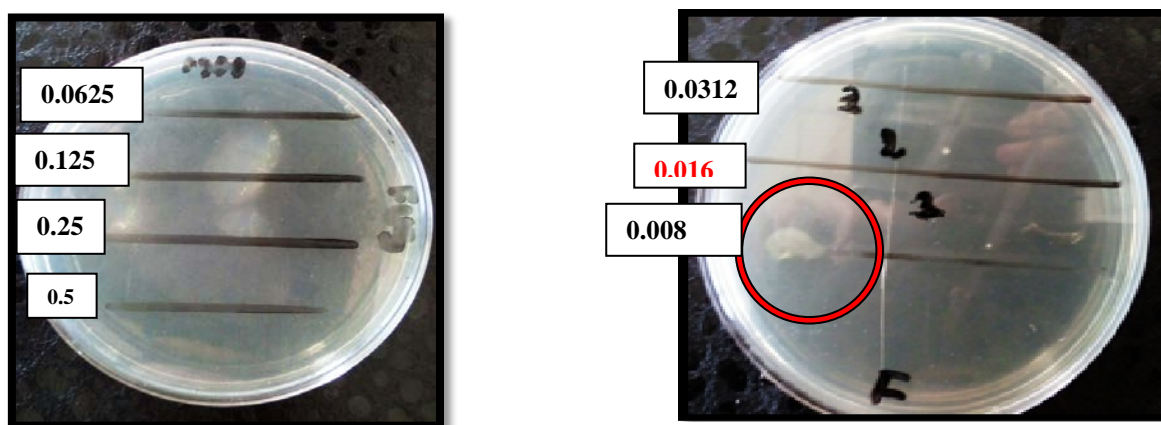
Souches	CMI	CMF CMB	CMF / CMI CMB / CMI	Activité
<i>Fusarium oxysporum</i>	0.008	0.016	2	Fongicide
<i>Botrytis cinerea</i>	0.0625	0.25	4	Fongicide
<i>Erwinia carotovora</i>	0.0625	0.5	8	Bactériostatique

Les valeurs ont été obtenues à une gamme allant de 0.008 mg/ $\mu$ l à 0.0625 mg/ml pour la CMI (**Photo 10**), et de CMF= 0.016 mg/ $\mu$ l pour le *Fusarium oxysporum* (**Photo11**), CMF= 0.25 mg/ $\mu$ l pour *Botrytis cinerea* et CMB= 0.5 mg/ $\mu$ l pour *Erwinia carotovora* (**Photo 12**). Nous constatent que l'huile essentielle *Mentha pulegium L* a exercé une activité contre les trois souches testées. La souche la plus sensible est *Fusarium oxysporum*, les valeurs de CMI et de CMF ayant été les plus faibles (0.008 et 0.016mg/ $\mu$ l, respectivement). La plus faible concentration pour laquelle il y a un effet fongicide est 0.016 mg/ $\mu$ l. Donc plus la valeur de CMI est faible, plus la capacité antifongique de l'huile essentielle est élevée. Par contre, la sensibilité est beaucoup moins chez *Erwinia carotovora* ; la CMI et la CMB étant obtenues à des valeurs plus élevées, de 0.0625 mg/ $\mu$ l et à 0.5 mg/ $\mu$ l respectivement

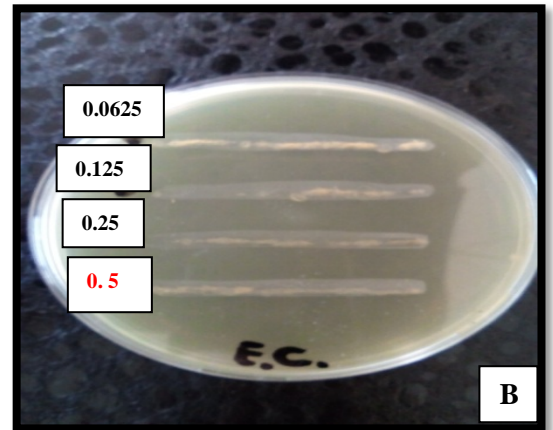
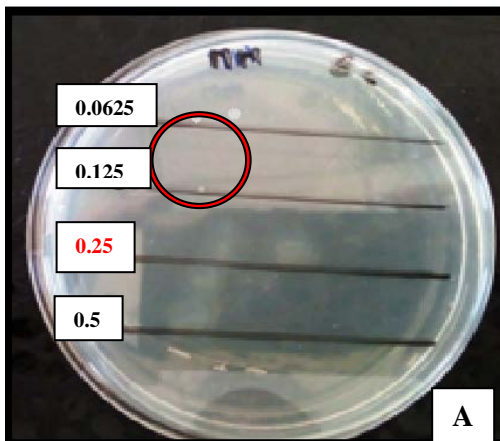
**Photo 10** : Détermination de la CMI de l'extrait d'huiles essentielles de la *Mente pulegium* sur les trois germes étudiés (photo originale)

Selon **Marmonier (1990)**, si le rapport d'activité CMB/CMI ou CMF/CMI d'une substance antimicrobienne est inférieur ou égal à 4, cette dernière est qualifiée de substance bactéricide ou fongicide et si le rapport est supérieur à 4, elle est alors dite bactériostatique ou fongistatique. Donc l'huile essentielle *Mentha pulegium* est fongicide envers les deux souches testées *Fusarium oxysporum* et *Botrytis cinerea*. Ce la traduit par la détérioration de la paroi et la membrane cytoplasmique de la cellule fongique ce qui permet le passage de l'huile essentielle et fragilisé la structure cellulaire.

A l'exception est noter pour *Erwinia carotovora* où le rapport CMB/CMI est égale à 8, elle est alors considérée comme bactériostatique. Cela est dû aux différences structurales entre les parois cellulaires. En effet, les bactéries Gram négatifs possèdent une membrane externe composée de chaînes de lipopolysaccharides. Cette couche forme une barrière de perméabilité hydrophile qui restreint la diffusion de composés hydrophobes tels que ceux présents dans les huiles essentielles.



**Photo 11** : Détermination de CMF de l'huile essentielle de la *Mente pulegium* sur *Fusarium oxysporum* (photos originales)



**Photo 12 :** A détermination de CMF de l'huile essentielle de la *Mente pulegium L* sur *Botrytis cinerea*  
B : détermination de CMB de l'huile essentielle de la *Mente pulegium L* sur *Erwinia carotovora* (photos originales)



---

## Conclusion

L'usage des pesticides constitué un progrès pour la santé publique et pour l'environnement, la consommation de pesticides a doublé tous les dix ans.

Cet usage excessif est aujourd'hui remis en cause, avec le développement de résistances aux pesticides chez les maladies ou les organismes que l'on souhaitait combattre. Plus préoccupant : ses atteintes aux écosystèmes et à l'homme, la recherche d'autres méthodes en prenant en considération la lutte biologique par l'utilisation de substances naturelles antibactérienne et antifongiques, Parmi ces substances naturelles, figurent l'huile essentielle extraite de plante aromatique très utilisé en Algérie est la *Menta pulegium L*

L'objectif de notre travail est d'étudier le pouvoir antimicrobien de cette huile obtenue par hydrodistillation de la partie aérienne de la plante.

La valeur du rendement en huile essentielle est de 0.38 %. Cette valeur est variée selon la saison de récolte et le procédé d'extraction

Le *Fusarium oxysporum* est extrêmement sensible avec un diamètre de la zone d'inhibition de 35 mm et suivi d'un diamètre de 25 mm pour *Botrytis cinerea*, la bactérie phytopathogène *Erwinia carotovora* est résistante à l'huile avec une zone d'inhibition de 8mm.

Après la vérification de l'existence d'une activité antimicrobienne à l'aide de la méthode de disque, la méthode d'aromatogramme en milieu liquide est réalisée pour les souches dont la zone d'inhibition est importante.

Les valeurs des CMI viennent confirmer les résultats de la méthode de disque, pour l'huile essentielle de la *Mentha pulegium L*. Les CMI ne dépassent pas 0.0625 mg/μl, le *Fusarium oxysporum* est le plus sensible avec une CMI de 0.008 mg/μl, puis *Botrytis cinerea* à 0.0625 mg/μl pour *Erwinia carotovora* la CMI =0.0625 mg/μl c'est la souche la plus résistante à cette huile.

---

Le rapport CMB/CMI nous une idée plus précise sur l'effet d'une substance antimicrobienne, l'huile à un effet bactériostatique contre *Erwinia carotovora* avec un CMB/CMI > 4, il est environ de 8, la bactérie est de Gram négatifs possèdent une membrane externe composée de chaînes de lipopolysaccharides. Cette couche forme une barrière de perméabilité hydrophile qui restreint la diffusion de composés hydrophobes tels que ceux présents dans les huiles essentielles, en revanche le ratio CMF/CMI <4 donc l'huile à un effet fongicide contre les deux champignons *Fusarium oxysporum* et *Botytis cenereace*. Ce la traduit par la détérioration de la paroi et la membrane cytoplasmique de la cellule fongique ce qui permet le passage de l'huile essentielle et fragilisé la structure cellulaire.

En conclusion, l'huile de *Mentha pulegium L.* a exercé un pouvoir antifongique signifiant et important sur les deux champignons surtout *Fusarium oxysporum* avec une faible concentration minimale fongicide 0.016 mg/µl.

Ce travail aide à la recherche dans ce domaine, pour pouvoir synthétiser ces substances miraculeuses, qui servent non seulement pour se défendre des maladies, mais aussi qui nous servent à protéger notre environnement.

---

## Références bibliographiques

### A

AFNOR (Association Française de Normalisation), 2000, Recueil des normes françaises "huiles essentielles". Monographies relatives aux huiles essentielles, Paris

AFNOR (Association Française de Normalisation), 1986, Recueil des normes françaises "huiles essentielles". AFNOR, Paris, 57p

AFNOR NF X 31-151, 1993, Sols, sédiments, boues de station d'épuration- Mise en solution d'éléments métalliques en traces (Cd, Co, Cr, Cu, Mn, Ni, Pb, Zn) par attaques acides. In Qualité des sols, AFNOR, 139-145p

Amiot J., 2005 : *Thymus vulgaris*, un cas de polymorphisme chimique pour comprendre l'écologie évolutive des composés secondaires. Thèse de Doctorat, Université Montpellier, ENSA. 77p.

Anonyme, 2010 : <http://plantgenera.org/>

Anonyme 2018: *Botrytis Cinerea*: Un ravageur de culture très infectieux - en détail ([http://www.canna.ca/fr-ca/botrytis\\_cinerea\\_en\\_detail](http://www.canna.ca/fr-ca/botrytis_cinerea_en_detail))

Anonyme 2011 : ([https://microbewiki.kenyon.edu/index.php/Fusarium\\_oxysporum](https://microbewiki.kenyon.edu/index.php/Fusarium_oxysporum))

Anonyme 2005: Bacterial rot *Erwinia carotovora* in a potato tuber early infection - Image ID: A156J9 : (<https://www.alamy.com>)

Anonyme 1,2,3,4, 2018 : Les huiles essentielles et effets thérapeutiques - E-monsite L'extraction par pression à froid ou expression : ([tpehuilesessentiellesetsante.e-monsite.com](http://tpehuilesessentiellesetsante.e-monsite.com))

Anonyme ,2015 : ([tpehuilesessentielles.blogspot.com](http://tpehuilesessentielles.blogspot.com))

Anonyme 1 et 2 ,2010 : Faire ses huiles et ses hydrolats :

[shttp://www.cfaitmaison.com/sante/faire-huiles-essentielles.html](http://www.cfaitmaison.com/sante/faire-huiles-essentielles.html)

Anton R., Lobstein A, 2005 : Plantes aromatiques. Epices, aromates, condiments et huiles essentielles. Tec & Doc, Paris

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: 412-416p.

### B

Bekhechi C., 2008 : Analyse des huiles essentielles de quelques espèces aromatiques de la région de Tlemcen par CPG, CPG-SM et RMN 13 C et étude de leur pouvoir antibactérien. Thèse Doctorat. Univ. Tlemcen, 205 p.

Belaïche, P., 1979 : *Traité de Phytothérapie et d'Aromathérapie.*, Maloine.

---

Bellakhdar J., 1978. Médecine traditionnelle et toxicologique Ouest Saharienne, contribution à l'étude de la pharmacopée marocaine. Ed. Technique nord africaines, Rabat.

Bounaga, N. 1985 : Contribution à l'étude de *Fusarium oxysporum f.sp. albedinis* (Killian et Maire) Gordon, agent de la fusariose du palmier dattier. Thèse de Doctorat d'état. Université de sciences et technologies « Houari Boumediene » Alger.

Bouchikhi Zoheir :Lutte contre la bruche du haricot *Acanthoscelides obtectus* (Coleoptera, Bruchidae) et la mite *Tineola bisselliella* (Lepidoptera, Tineidae) par des plantes aromatiques et leurs huiles essentielles. universite Aboubakr Belkaïd – Tlemcen

Bruneton, J. 1999. Pharmacognosie, Phytochimie – Plantes médicinales – 3ème Ed Techniques et documentations. Paris. p: 484-488 - 227-494.

Bruneton J, 1993, Pharmacognosie. Phytochimie, plantes médicinales. 2 ème édition, Tec & Doc. Lavoisier. Paris, 632-915p

Braga F.G., Bouzada M.L.M., Fabri R.L., Matos M.d.O., Moreira F.O., Scio E., Coimbra E.S, 2007, Antileishmanial and antifungal activity of plants used in traditional medicine in Brazil. Journal of Ethnopharmacology, 111, 396-402p

Burt, S., 2004 : Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. International journal of food microbiology,. 94(3): 223-253p.

Bolou G.E.K., Attioua B., N'Guessan A.C., Coulibaly A., N'Guessan J.D., Djaman A.J, 2011, Evaluation in vitro de l'activité antibactérienne des extraits de *Terminalia glaucescens* planch. sur *Salmonella typhi* et *Salmonella typhimurium*. Bulletin de la Société Royale des Sciences de Liège, 80, 772-790p

## C

CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute), 2002, Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of conidium-forming filamentous fungi. Wayne (Approved Standard M38-A)

Chaintreau, A., D. Joulain, C. Marin, C.-O. Schmidt, and M. Vey,2003 : GC-MS quantitation of fragrance compounds suspected to cause skin reactions. 1. Journal of agricultural and food chemistry, 51(22): 6398-6403p.

Chalchat J.C., Gorunovlc M.S., Maksimovlc Z.A. & Petrovlc S.D., 2000 : Essential oil of wild growing *Mentha pulegium* L. from Yugoslavia. J. Essent. Oil Res. 12:p 598–600.

Charkowski A.O. 2006 : The Soft Rot *Erwinia*. In: Samuel S. Gnanamanickam (Ed.). Plant-Associated Bacteria, p 423-505.

---

Corbaz, R. 1990 : Principe de phytopathologie et de lutte contre les maladies des plantes. Edition Presse polytechnique et universitaire romande. p286 .

Courvalin, P., H. Drugeon, J.P. Flandrois, and F. Goldstein, 1990 : Bactericide, Aspects théoriques et thérapeutiques, p. 110.

Cox, S., C. Mann, J. Markham, H. Bell, J. Gustafson, J. Warmington, and S. Wyllie, 2000 :The mode of antimicrobial action of the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil). *Journal of applied microbiology*,. 88(1): p. 170-175.

Couic-Marinier F. et Lobstein A., 2013 : Les huiles essentielles gagnent du terrain à l'officine. *Actualités pharmaceutiques*.

Christian h.p., 1794 :*Botrytis cinerea* Pers., *Neues Magazin für die Botanik* 1: 126, t. 3:9

## D

Di Pietro M., Eroronc J., Jarana –Delgado Z., Caracuel MP., Madrid A., 2003

Exploring de molécul arsenal of a *fusarium oxysporum* vascular wilt fungus molecular plant pathology. p315-325

## F

Fouché J.G, A. Marquet, and A. Hambuckers, 2000 : *Les Plantes Médicinales, de la plante au médicament* Observatoire du Monde des Plantes Sart-Tilman.

## G

Guignard J.L., et Dupont F., 2004 : *Botanique : Systématique moléculaire*, 13 ème éd. Ed. Masson, Paris. 237 p.

Guignard, J.-L. and P. Potier, 2000 : *Biochimie végétale*, 2ème ED, ed. T. 2. : Dunod.

Guinoiseau, E., 2010 : *Molécules antibactériennes issues d'huiles essentielles: séparation, identification et mode d'action*. Thèse de Doctorat, Université de Corse.

Giraud J. (2003). *Microbiologie alimentaire* .p 8-101.p 330 Edition Donod, Paris

Garneau F.-X. (2005). *Le materiel vegetal et les huiles essentielles* (Laseve-UQAC, Chicoutimi ed.).

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.

## H

---

Habiba Boukhebti, Adel Nadjib Chaker, Hani Belhadj, Farida Sahli, Messaoud Ramdhani, Hocine Laouer, Daoud Harzallah, 2011 : « Chemical composition and antibacterial activity of *Mentha pulegium* L. and *Mentha spicata* L. essential oils », *Der Pharmacia Lettre*, vol. 3, n° 4.

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).

## I

Isman M. B., 2000 : Plant essential oils for pest and disease management. *Crop Prot*, 19, p: 603-608.

## J

Jarvis, W. R., Epidemiology. In: J. R. Coley-Smith. 1980. Eds. *The biology of Botrytis*. Academic Press, London, UK, p. 219-250.

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:p 12-21.

## K

Kalembe D., Kunicka A, 2003, Antibacterial and antifungal properties of essential oils. *Curr. Med. Chem*, 10, p 813-829.

Khenaka Karima, 2011 Effet de diverses plantes médicinales et de leurs huiles essentielles sur la méthanogénèse ruminale chez l'ovin Université Mentouri Constantine

Knobloch, K., A. Pauli, B. Iberl, H. Weigand, and N. Weis, 1989 : Antibacterial and antifungal properties of essential oil components. *Journal of Essential Oil Research*, 1(3): p 119-128.

Konan Kouadio F., Guessennd N.K., Karamoko O., Bahi C., Adama C., Dosso M, 2013, Action antibactérienne de l'extrait éthanolique 70% de *Clerodendrum splendens* (G. Don) (Verbenaceae) sur des souches bactériennes isolées de selles chez des enfants diarrhéiques. *Int. J. Biol. Chem. Sci*, 7(3), 1332-1337p

## L

Lautier T. 2007 : Rôle de la protéine associée au nucléoïde Fis dans le contrôle de la virulence chez la bactérie phytopathogène *Erwinia chrysanthémie*. Thèse de Doctorat en Microbiologie. Institut National des Sciences Appliquées de Lyon, p200.

Lawrence B.M., 1995 : The isolation of aromatic materials from natural plant products.

---

Lemordant D., Boukef K., Bensalem M., 1977. Plantes utiles et toxiques de Tunisie, *Fitoterapia*, 48, p : 191-214

Link, H.F. 1809 :Observations in ordines plantarum naturalis, *Dissetatio I. Mag Ges Naturf Freunde Berlin*, p33-42.

Lahreche K.,2010 :Extraction et analyses des huiles essentielles de la menthe pulegium L. et de *saccocalyx ratursoide* tests d'activité antibactériennes et antifongiques univ.Oran Es-Sénia

## M

Moreira, M.R., A.G. Ponce, C.E. del Valle, and S.I. Roura, Inhibitory parameters of essential oils to reduce a foodborne pathogen. *LWT - Food Science and Technology*, 2005. 38(5): p. 565-570.

Maihebiau. P,1994 : La nouvelle aromathérapie: biochimie aromatique et influence psychosensorielle des odeurs. Lausanne. p 635.

Martinez, F., Dubos, B., Fermaud, M. 2005. The role of saprotrophy and virulence in the population dynamics of *Botrytis cinerea* in vineyards. *Phytopathology*, 95: p 692-700.

Mebarka, L.,2007 : Contribution à l'étude de la composition chimique et de l'activité antimicrobienne des huiles essentielles de *Tinguarra sicula*. Mémoire de Magister, Université Ferhat Abbas-Setif.

Messiaen C.M. et Cassini R., 1968 : Recherches sur les *Fusarium*, La systématique des *Fusarium*, tome 19, p.396-454.

Michielse M.et Rep CB. ,2009 :plant pathology molecular fusarium oxysporum update profil pathogen :p 324-311.

Muraschi, T. F., Friend, M. and Bolles, D.1965 : Erwinia-Like microorganisms isolated from animal and human hosts. *American Society for Microbiology* .13, p128-131.

## O

Ozenda, P. 1990 :Les organismes végétaux, tome 1 : Végétaux inférieurs, Masson, p220 .

Oussou K.R., Kanko C., Guessennd K.N., Yolou S., Koukoua G., Dosso M., N'guessan Y.T., Figueredo G., Chalchat J.-C, 2004, Activités antibactériennes des huiles essentielles de trois plantes de Côte d'Ivoire. *C. R. Chimie*, 7(10-11), 1087-1086p

## P

Persoon, C.H. 1801. *Synopsis methodica fungorum* ,1-p 706.

---

Pérombelon, M.C.M., Kelman, A.1980. Ecology of the soft rot erwinias. Annual Review of Phytopathology, 18, p 361–387.

## Q

Quézel P. & Santa S., 1963 : Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales, Tome 2. CNRS. Ed. Paul Le chevalier, Paris.

## R

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., et 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, p: 291-299.

## S

Sacchetti, G., S. Maietti, M. Muzzoli, M. Scaglianti, S. Manfredini, M. Radice, and R. Bruni,2005 : Comparative evaluation of 11 essential oils of different origin as functional Références bibliographiques 99 antioxydants, antiradicaux et antimicrobiens in foods. Food chemistry, 91(4): p. 621-632.

Skerman. B. D., McGowan, V., Sneath, H. A. 1980. Approved lists of bacterial names. International Journal of Systematic Bacteriology, 30, p225-420.

Skandamis P.N., Nychas G.J.E, 2001, Effect of oregano essential oil on microbiological and physico-chemical attributes of minced meat stored in air and modified atmospheres. Journal of Applied Microbiology, 91(6), 1011-1022p

Snyder, W.C., and H.N. Hansen. 1940 : The species concept in *Fusarium*. *American Journal of Botany* 27: p64-67.

## T

Toth, I. K., Birch, P. R. J. 2005. Rotting softly aTomnd stealthily. Curr. Opin. Plant Biol, 8(4) p 424–9.

## W

Whitehead, N.A., Barnard, A.M., Slater, H., Simpson, N.J., Salmond, G.P.2001. Quorum sensing in Gram-negative bacteria. Microbiol Rev, 25: p365–404.

Wollenweber H.W. et Reiking O.A,1935 : Die Fusarien, ihre Beschreibung, Schadwirkung und Bekämpfung. Paul Parey. Berlin 335p.

## Y

---

Yahiaoui-Zaidi, R., Jouan, B. and Andrivon, D.,2003 : Biochemical and molecular diversity among *Erwinia* isolates from potato in Algeria. *Plant Pathology*. 52, p28-40.

---

## Annexes

### Annexe1 : Milieu Potato Dextrose Agar (PDA)

Pomme de terre .....	200 g
Glucose .....	20 g
Agar .....	20 g
Eau distillée.....	compléter jusqu'à 1000 ml

- Laver la pomme de terre non pelée.
- Couper en cubes dans 500 ml d'eau distillée.
- Porter à ébullition pendant 30 – 45 min.
- D'autre part faire fondre l'agar dans 500 ml d'eau distillée.
- Écraser la pomme de terre, filtrer puis ajouter le filtrat à la solution d'agar.
- Ajouter le glucose.
- Compléter le volume à 1000 ml.
- ajuster le pH=  $6,4 \pm 0,2$  à  $25^{\circ}\text{C}$
- Stériliser par autoclavage à  $121^{\circ}\text{C}$  / 15 min.

### Annexe 2 : Bouillon nutritif

Bouillon nutritif poudre .....2.3 g.

L'eau distillée..... 100ml.

- Mettre 2.3 g de bouillon nutritif dans un bécher.
- compléter le volume jusqu'à 100ml.
- Mettre le tout sur plaque agitateur et agiter jusqu'à homogénéisation.
- Répartir 10ml dans chaque tube. Autoclavage à  $121^{\circ}\text{C}$  pendant 20min.

### Annexe 3 : Milieu Muller Hinton :

Agar .....10g/l

Extrait de viande.....2g /l

---

Hydrolysate acide de caséine.....17,5g/l

Amidon.....1,5g/l

Eau distillée.....1000 ml

- PH : 7,0

**Annexe 4 : Eau physiologique :**

Chlorure de sodium Na Cl..... 9g

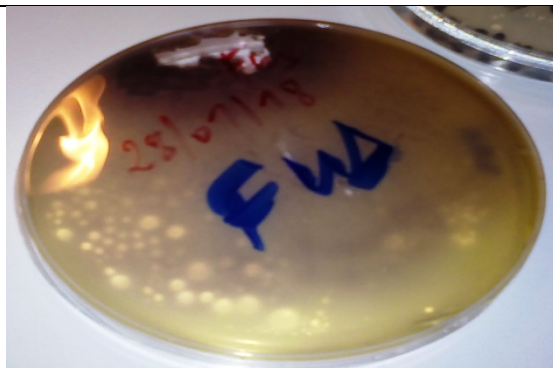
Eau distillée .....1000ml

---

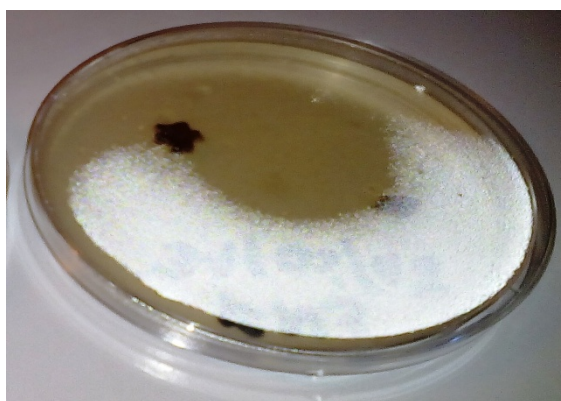
Annexe 5



*Souche Botrytis cinerea* conservée le  
(28/01/2018) à 4°C (photo original)



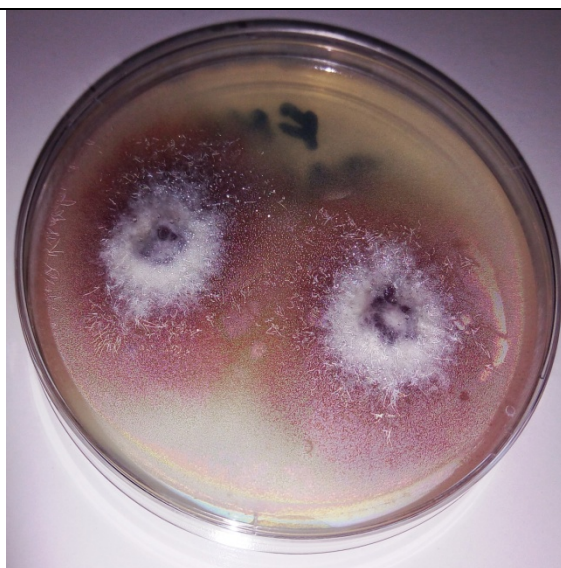
*Souche Fusarium oxysporum* conservée le  
(28/01/2018) à 4°C (photo original)



On prélève des disques de moisissure et on les dépose sur gélose PDA solidifié  
Incubation a 28°C pendant 48h (photos originales)



Culture jeune de *Botrytis cinerea* (photo  
original)



Culture jeune de *Fusarium oxysporum* (photo  
original)

