



République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique



Université Amar Thelidji- Laghouat

FACULTE ou INSTITUT : DES SCIENCES

DEPARTEMENT : DE BIOLOGIE

MEMOIRE DE MASTER

Présenté par : GUEDDOUDA Amina et SOUFARI Khadîdja

DOMAINE : Sciences de la Nature et de la Vie

FILIERE : Biologie

OPTION : Ecologie végétale et environnement

Thème

**Effet biologique de biomolécules actives d'origine
végétale vis-à-vis du genre *Fusarium* agresseurs des
céréales alimentaires**

Jury de soutenance :

Mlle AOUISSI Hadjer

MAB

Présidente

Mlle BENABED Houda

MAB

Examinatrice

Mme EL HOUITI Fatiha

MAA

Reportrice

Promotion : Juin - 2015

عنوان المذكرة: التأثير البيولوجي للجزيئات الحيوية النشطة المشتقة من النباتات ضد الفيوزاريوم الممرض على الحبوب الغذائية.

المؤطر: الحويطي فتيحة الاسم أمينة وخديجة اللقب: قدودة وسوفاري

ملخص : حفظ الحبوب هي مشكلة رئيسية في جميع أنحاء العالم لأنها تؤثر على صحة الإنسان والحيوانات الأليفة. وغالبا ما تعتبر مكافحة البيولوجية كوسيلة من وسائل الكفاح الطبيعي والأمنة.

ويهدف هذا العمل لدراسة التركيب الكيميائي والنشاط المضاد للزيوت العطرية للنبات *Rhanterium* . تم استخراج الزيت العطري ل *Rhanterium* عن طريق hydrodistillation بحيث مردود الزيت (أوراق الشجر والزهور) يتراوح بين 0.4% و 0.11%. تم اختبار تأثير الزيت العطري على نمو وتبوغ اثنين من الأنواع الفطرية المعزولة *Fusarium* والمسببة لأمراض القمح والذرة.

ووفقا للنتائج، كانت جميع العزلات المختبرة حساسة للزيت العطري مع تركيز المثبطة الدنيا (CMI) يقدر ب20 ميكرو ل / مل.

يمكننا ان نقول ان مفعول الزيت العطري *Rhanterium* عموما جيد في وجود خليط من مركباتها، ولها تأثير أفضل عندما تعمل في تعاون.

أظهر الاختبار المضاد للفطريات أن الزيت العطري المستخرج من *Rhanterium* لديه قوة مضادة للفطريات واعدة ضد *Fusarium*.

كلمات مفتاحية : *Rhanterium*، زيت عطري، والنشاط مضاد للفطريات، *Fusarium* والحبوب .

Memory title: Biological effect of active plant-derived bimolecular regarding the genus *Fusarium* food grains aggressors

Name: GUEDDOUDA et SOUFARI **First name:** Amina et Khadîdja **Directed by:** EL HOUITI Fatiha

Abstract: Cereal grains conservation is a major problem worldwide because they affect the survival of humans and domestic animals. Biological control is often presented as a method of natural struggle, "Green" and safe.

This work aims the study of the chemical composition and antifungal activity of the essential oil *Rhanterium* . The extraction of essential oil *Rhanterium* carried out by hydrodistillation. The oil content (leaves and flowers) 0.11% to 0.49%. The essential oil effect was tested on mycelial growth and sporulation of the two fungal species isolated *Fusarium* agent's pathogens of wheat and maize.

According to the results, all tested isolates were susceptible to studied essential oil, with minimum inhibitory concentrations (MIC) to 20µl / ml. We can say that the power of antifungal essential oil *Rhanterium* generally is effective in the presence of a mixture of compounds, as they have a better effect when they work in synergy. The test of antifungal activity showed that the essential oil of *Rhanterium* has a promising antifungal potency against *Fusarium*.

Key words: *Rhanterium* , essential oil, antifungal activity, *Fusarium*, and cereals.

Titre du mémoire : Effet biologique de biomolécules actives d'origine végétale vis-à-vis du genre *Fusarium* agresseurs des céréales alimentaires

Nom : GUEDDOUDA et SOUFARI **Prénom :** Amina et Khadīdja **Encadreur :** EL HOUITI Fatiha

Résumé : La conservation des grains de céréales constitue un problème important à l'échelle mondiale car elles touchent la survie des hommes et des animaux domestiques. La lutte biologique est souvent présentée comme une méthode de lutte naturelle, « écologique » et sans danger.

Le présent travail a pour objectif l'étude de la composition chimique et l'activité antifongique de l'huile essentielle de *Rhanterium*.

L'extraction de l'huile essentielle de *Rhanterium* a été effectuée par hydrodistillation dont la teneur en essence végétale (feuilles et fleurs) est plus ou moins importante de 0,11% à 0,49%. L'effet de l'huile essentielle a été testé sur la croissance mycélienne, et la sporulation des deux espèces fongiques isolées agents pathogènes du blé et maïs respectivement.

D'après les résultats obtenus, tous les isolats testés se sont révélés sensibles à l'huile essentielle étudiée, avec des concentrations minimales inhibitrices (CMI) constante à 20µl/ml.

Nous pouvons affirmer que le pouvoir antifongique de l'huile essentielle de *Rhanterium* d'une manière générale est efficace en présence d'un mélange de composés, car ces derniers ont un meilleur effet quand ils travaillent en synergie.

Le test de l'activité antifongique révèle que l'huile essentielle de *Rhanterium* est dotée d'un pouvoir antifongique prometteur contre *Fusarium*

Mots clés : *Rhanterium* , huile essentielle, activité antifongique, fusariose, et céréales.

Dédicaces

A la fée qui m'a mise au monde et qui m'a entouré de son affection et son amour ; ma très chère mère que Dieu

te garde et te protège.

A mes grands-parents

A mon cher mari, qui m'a beaucoup aidé.

A mes enfants Zidou et Abdou

A mes sœurs et mes frères

A mon beau père

A ma belle-sœur et mes beaux frères

A mon binôme Khadîdja

A toute ma famille.

Amina

Dédicaces

*Avec l'aide de Dieu, j'ai pu réaliser ce modeste travail
que je dédie A :*

*Mes très chers parents avec toute ma reconnaissance. A
ma chère maman qui n'a jamais cessé de ménager ses
efforts pour que j'atteigne ce niveau.*

*Mon cher papa qui a su se montrer patient, compréhensif
et encourageant, sa chaleur paternelle a été et sera
toujours pour moi d'un grand réconfort.*

Mon fiancé Mohamed Benchatti

Mes chers grands parents

Mon cher frère Mohamed Taher, et mon beau frère Ziad

Mes chères sœurs : Sarah, Ikram et Khadouj

La famille Soufari.

La famille Boucherit.

*Mes chères copines : Aicha, Amina, Mamy, Naima, Nour
el houda, Rokia, Rym, Sarah et Soumia.*

Tous mes amis, ainsi qu'à tous ceux qui me sont chers.

Khadidja

Remerciement

Nous remercions DIEU, le Miséricordieux de nous avoir données Foi, volonté, et courage pour atteindre notre objectif.

Nous tenons à exprimer nos sincères remerciements et nos profondes reconnaissances à notre rapporteur de mémoire, Mme El Houiti Fatiha, qui nous a fait l'honneur d'avoir veillée et dirigée ce mémoire. Ses qualités scientifiques et sa passion pour la recherche nous ont permis de mener à bien ce travail de mémoire.

Nous remercions également l'ensemble du personnel du laboratoire, pour leur aide ainsi que pour leur accueil chaleureux qui nous a permis de nous y sentir comme chez nous au cours de notre travail.

Nous adressons nos remerciements à Mme Hattab enseignante au Département d'Agronomie, qui nous a aidées dans la pratique de cette thèse.

Nous tenons à remercier le laboratoire de l'Institut National de la Recherche Agronomique de France d'avoir nous donner les milieux de culture pour réaliser notre modeste travail.

Nous remercions les membres du jury pour leur intérêt porté à ce travail, et tout particulièrement Mme El Houiti Fatiha, Chargé de projet, pour avoir accepté d'être le rapporteur de cette thèse. Nous remercions également Melle Aouissi Hadjer enseignante au Département d'ENS, pour avoir présidé le jury ainsi que l'examinatrice de ce travail, Mlle Benabed Houda enseignante au Département de Biologie,

Enfin, nous présentons nos remerciements, notre respect, notre gratitude et notre attachement à toutes les personnes ayant contribué au bon déroulement de ce travail

Table des matières

Table des matières	iv
Liste des abréviations	1
Liste des figures.....	2
Introduction	3
Étude bibliographique	6
I. Les huiles essentielles.....	7
I.1. Historique.....	7
I.2. Définition.....	7
I.3. Techniques d'extraction des huiles essentielles	7
I.3.1. Hydro distillation :.....	8
I.3.2. L'entraînement à la vapeur d'eau	8
I.3.3. L'hydrodiffusion.....	8
I.3.4. L'extraction par micro-ondes.....	8
I.4. Conservation des huiles essentielles	9
I.5. Composition chimique des huiles essentielles.....	9
I.6. L'identification des composés des huiles essentielles par CPG.....	10
I.7. Activité biologique des huiles essentielles	10
I.8. L'activité antifongique des huiles essentielles :.....	11
I.9. Association d'huiles essentielles	11
II. La fusariose.....	12
II.1. Les symptômes	12
II.2. condition favorable de la fusariose.....	12
II.3. L'agent pathogène de la fusariose	13
II.3.1. La taxonomie du genre Fusarium selon (Link., 1809).....	13
II.3.2. Fusarium graminearum.....	13
II.3.3. Fusarium culmorum	13
II.4. Effet de la fusariose sur l'hôte (Blé et maïs).....	14
III. Lutte biologique	15
III.1. Définition.....	15
III.2. L'objectif de la lutte biologique.....	16
Matériels et méthodes.....	17
I. Matériels biologique	18
I.1. La plante étudiée (Rhanterium)	18

I.2. Molécules bioactives testées.....	18
I.3. Souches phytopathogènes étudiées	19
II. Méthodes expérimentales.....	19
II.1. L'extraction des huiles essentielles	19
II.2. Le procédé d'extraction.....	20
II.2.1. Calcul de la teneur en huiles essentielles.....	21
II.3. L'analyse chromatographique	21
II.3.1. Les conditions opératoires de la CPG.....	21
II.3.2. Identification des constituants des huiles essentielles	21
II.4. Procédure microbiologique (analyse spectrophotométrique en microplaque).....	22
II.4.1. La pré-culture des champignons (Préparation de l'inoculum)	22
II.4.2. La quantification de l'activité antifongique sur milieu liquide.....	22
a. En présence des huiles essentielles et des composés bioactifs	23
b. En présence du mélange	23
II.5. Le calcul du pourcentage d'inhibition.....	23
II.6. L'analyse Statistique	24
Résultats et discussion.....	25
I. Cinétique d'extraction et la teneur en huile	26
II. Identification des constituants des huiles essentielles.....	26
III. L'évaluation de la quantification de l'activité antifongique	27
III.1. En présence des huiles essentielles (feuilles et fleurs)	27
III.2. En présence du mélange des composés purs	30
Conclusion	32
Références bibliographiques.....	35
ANNEXE.....	41

Liste des abréviations

C°	: Degré Celsius
CI₅₀	: Concentration inhibitrice à 50%
Cm	: Centimètre
CMC	: Carboxyl methyl cellulose
CMI	: Concentration minimale inhibitrice
CPG	: Chromatographie en phase gazeuse
<i>F</i>	: <i>Fusarium</i>
FAO	: food and agriculture organization
G	: Gramme
H	: Heure
HE	: Huile essentielle
I (%)	: Pourcentage d'inhibition
IRL	: Indice de rétention linéaire
INRA	: Institut National de la Recherche Agronomique
Km	: Kilomètre
M	: Mètre
Min	: Minute
µl	: Microlitre
ml	: Millilitre
Mm	: Millimètre
Mol	: Mole
MSS	: Milieu synthétique de saccharose
OCDE	: Organisation de coopération et de développement économique
OMS	: Organisation mondiale de la santé
PDA	: Potato Dextrose Agar
Rpm	: Rotation par minute

Liste des tableaux

Tableau 1: Les produits purs testés et leurs principales caractéristiques.....	18
Tableau 2: Codes et origines des souches fongiques étudiées.....	19
Tableau 3: La situation géographique et étage bioclimatique de la station de collecte, selon "Atlas Mondial Microsoft Encarta, 2013"	19
Tableau 4: Concentrations des doses d'huiles essentielles utilisées pour évaluer leur effet sur la croissance fongique.....	23

Liste des figures

Figure 1 : Spores de <i>Fusarium culmorum</i> et <i>Fusarium graminearum</i>	14
Figure 2: Symptômes de la fusariose sur céréales.....	15
Figure 3: Schéma illustrant l'appareil de <i>Clevenger</i>	20
Figure 4 : Comparaison entre les taux d'inhibitions des huiles essentielles testées (feuilles et fleurs) sur la croissance mycéliennes des souches fongiques étudiées.....	28
Figure 5: Taux d'inhibitions des CI ₅₀ et des CMI des extraits vis-à-vis des quatre souches testées.....	29
Figure 6 : Comparaison entre les taux d'inhibitions des CI ₅₀ et de la CMI vis-à-vis des quatre souches étudiées.....	31

Introduction

De tout temps, le règne végétal a offert à l'homme des ressources naturelles essentielles à son alimentation, à son hygiène et sa santé. Les plantes représentent une source immense de molécules chimiques complexes exploitées par l'Homme dans l'industrie des parfums, agro-alimentaire, cosmétique et pharmaceutique. Les métabolites secondaires (huiles essentielles) jouent des rôles écologiques importants, notamment en contribuant aux phénomènes de communication et de défense.

Le blé et le maïs constituent des céréales d'importance primordiale à travers le monde, d'un point de vue économique et en tant que denrées alimentaires pour l'Homme. L'altération des grains, due à la présence de champignons pathogènes du genre *Fusarium* provoque évidemment des pertes économiques mais aussi des risques sanitaires, induisant des maladies appelées fusarioses (**Boutigny., 2007**).

Depuis quelques décennies, la fusariose de l'épi figure dans le haut de la liste des problèmes des producteurs de céréales. Il s'agit d'une maladie fongique qui infecte les épis des céréales, dont le blé et le maïs, et qui cause notamment des baisses de rendement et l'accumulation de mycotoxines dommageables pour les animaux d'élevage et les humains (**Mcmullen et al., 2008**).

De par leur composition chimique, les plantes aromatiques représentent un intérêt économique considérable par leur appartenance aux industries de la parfumerie, des cosmétiques, de l'agroalimentaire et de la pharmacie (**Bruneton., 1999**). En effet, elles sont douées non seulement de qualités parfumantes et culinaires, mais aussi de vertus médicinales variées grâce aux différents principes actifs qu'elles contiennent : alcaloïdes, flavonoïdes, tanins, saponosides....et huiles essentielles. Elles constituent un réservoir inépuisable de remèdes populaires des plus efficaces et une source naturelle de médicaments les plus usités actuellement (**Beloued A., 1998**).

Diverses maladies sont traitées uniquement par les seules thérapies naturelles qui font appel aux plantes aromatiques et leurs huiles essentielles obtenues généralement par hydrodistillation.

Ces huiles essentielles se trouvent dans de nombreuses parties de la plante : le bois, les feuilles, les fruits, les écorces, les graines et les racines. Ce sont des mélanges complexes constitués de plusieurs dizaines, voire de plus d'une centaine de

composés, principalement des terpènes et de composés aromatiques. **(El haib., 2011).**

Plusieurs espèces de la famille des astéracées sont connues pour leur production d'huiles essentielles et sont utilisées en médecine traditionnelle pour leurs vertus thérapeutiques et leurs effets biologiques contre plusieurs maladies.

Les moyens de luttés directes ont fait penser longtemps que l'on pouvait faire abstraction des moyens préventifs. En revanche, l'Agriculture Biologique se base sur les préceptes des équilibres naturels. Des bases en écologie sont nécessaires pour comprendre comment nous pouvons éliminer naturellement avec des produits naturels une population *Fusarium*.

L'objectif de notre travail est d'étudier l'activité biologique d'une huile essentielle obtenue par hydrodistillation de la partie aérienne (feuilles et fleurs) de plante *Rhanterium* pour des éventuelles utilisations en lutte biologique.

Nous avons choisi d'entamer le manuscrit par une étude bibliographique où sont traitées quelques généralités liées à notre sujet d'étude.

La partie pratique, deuxième partie de ce document est partagée en deux volets :

- ❖ Dans un premier temps, à l'issue des résultats de l'analyse chromatographique par CPG des deux huiles essentielles de *Rhanterium* (feuilles et fleurs), nous avons identifié leurs composants chimiques ;
- ❖ Dans le second nous avons testé le pouvoir antifongique de ces deux huiles essentielles ainsi que celles des cinq composés candidats (séparément et sous forme d'un mélange) sur la croissance de quatre champignons phytopathogènes appartenant au genre *Fusarium*, en appliquant une méthode spectrophotométrique sur milieu liquide

La troisième partie de ce mémoire a été consacrée à la présentation et à la discussion de l'ensemble des résultats obtenus. Enfin, nous terminerons cette étude par une conclusion générale

Étude bibliographique

I. Les huiles essentielles

I.1. Historique

De tout temps, le règne végétal a offert à l'homme des ressources naturelles pour son alimentation, pour son hygiène et sa santé. L'utilisation des plantes médicinales en thérapeutique remonte aux temps le plus ancien **(Belaiche., 1979)**.

C'est Avicenne, médecin et philosophe (980-1037), qui produit la première huile essentielle pure, une huile essentielle de roses. Pour cela, il met au point un alambic. La distillation par la vapeur d'eau autorisait l'extraction d'huiles essentielles pures de très nombreuses plantes. Avicenne écrit de nombreux ouvrages médicaux dans lesquels il fait une large place aux huiles essentielles **(Zhiri., 2006)**.

L'aromathérapie scientifique est une science qui utilise les méthodes et les techniques scientifiques du laboratoire pour mettre en évidence la relation entre la structure chimique des molécules actives des huiles essentielles et leurs activités biologiques **(Zhiri., 2006)**.

I.2. Définition

Les huiles essentielles sont des mélanges complexes de substances organiques aromatiques liquides qu'on trouve naturellement dans diverse partie des végétaux. Elles sont concentrées, volatiles, et sensibles à la décomposition sous l'effet de la chaleur et la lumière.

La norme **AFNOR, Ed 1998** a donné la définition suivante d'une huile essentielle : « produit obtenu à partir d'une matière première végétale soit par entraînement à la vapeur soit par procédés mécaniques à partir de l'épicarpe des citrus soit par distillation sèche .L'huile essentielle est ensuite séparée de la phase aqueuse par des procédés physiques pour les deux premiers modes d'obtention. Elle peut subir des traitements physiques n'entraînant pas de changement significatif de sa composition **(Bruneton., 1999)**.

I.3. Techniques d'extraction des huiles essentielles

Les huiles essentielles sont obtenues avec des rendements généralement faibles. Ce qui en fait des substances fragiles, rares, et précieuses. Ainsi les différentes techniques d'extraction des huiles essentielles ou extraits aromatiques doivent d'une part, tenir compte de ces caractéristiques et d'autre part, apporter des performances

quantitatives satisfaisantes. Une forte demande toujours plus exigeante basée sur différents phénomènes physiques : la distillation, l'extraction ou la séparation, ces techniques d'extraction seront présentées selon le principe sur lequel elles sont basées et classées en deux catégories distinctes selon le produit final obtenu : une huile essentielle ou un extrait aromatique **(El haib., 2011)**.

I.3.1. Hydro distillation :

C'est la méthode la plus utilisée pour l'extraction des huiles essentielles, à partir des plantes. Elle consiste à immerger le matériel végétal à traiter dans un alambic rempli d'eau qui est ensuite porté à ébullition. Les vapeurs hétérogènes sont condensées sur une surface froide (réfrigérant) et l'huile essentielle se sépare de l'eau de condensation (hydrolat) par différence de densité. Le matériel végétal peut être utilisé intact ou broyé **(Bruneton., 2009)**.

I.3.2. L'entraînement à la vapeur d'eau :

Dans la distillation par entraînement à la vapeur d'eau (*Steam distillation*), le végétal n'est pas en contact avec l'eau : la vapeur d'eau est injectée à travers la masse végétale disposée sur des plaques perforées.

Cette méthode apporte une amélioration de la qualité de l'huile essentielle en minimisant les altérations hydrolytiques **(Bruneton., 2009)**.

I.3.3. L'hydrodiffusion

Elle consiste à pulser de la vapeur d'eau à très faible pression (entre 0,02-0,15 Bar) du haut vers le bas, à travers la masse végétale. Les composés obtenus par cette méthode sont qualitativement différents de ceux obtenus par la méthode classique. Ce procédé permet un gain de temps et d'énergie **(Bruneton., 2009)**.

I.3.4. L'extraction par micro-ondes

Ce procédé permet d'extraire les huiles essentielles en un temps court, consommant peu d'énergie et d'eau et avec un rendement relativement élevé.

Il consiste à chauffer sélectivement la plante par un rayonnement micro-ondes, dans une enceinte dont la pression est réduite de façon séquentielle. Le produit obtenu est de qualité supérieure à celle du produit d'hydrodistillation traditionnelle **(Bruneton., 2009)**.

I.4. Conservation des huiles essentielles

La relative instabilité des molécules constitutives des HE rend leur conservation difficile. Les possibilités de dégradation sont nombreuses, facilement objectivées par la mesure d'indices (peroxyde, réfraction), par la détermination des caractères physiques (viscosité, miscibilité à l'éthanol, pouvoir rotatoire) et/ou par l'analyse CPG.

Ces dégradations pouvant modifier les propriétés et /ou mettre en cause l'innocuité du produit, il convient de les éviter : utilisation de flacons propres et secs en aluminium, en acier inoxydable ou en verre teinté anti-actinique, fermés de façon étanche stockage à l'abri de la chaleur et de la lumière **(Bruneton., 2009)**.

I.5. Composition chimique des huiles essentielles

Les huiles essentielles représentent un mélange complexe de molécules chimiques qui peuvent comporter plus de soixante composants différents, parmi lesquels deux ou trois sont des composants majeurs constituant de 20 à 70% du mélange comparativement aux autres qui se trouvent le plus souvent sous forme de traces **(Bakkali et al., 2008 in Khenaka., 2011)**.

Ces constituants appartiennent, de façon quasi exclusive, à deux groupes caractérisés par des origines biogénétiques distinctes :

- le groupe des terpénoïdes (les composés terpéniques),
- le groupe des composés aromatiques dérivés du phenylpropane **(Bruneton., 1999)**

Selon **(Bruneton, 1999)**. Cette structure varie en fonction :

- Du nombre d'atomes de carbone qui les constitue (Les monoterpènes, Les sesquiterpènes et rarement les diterpènes).
- Du caractère saturé ou insaturé des liaisons.
- De leur agencement : linéaire ou cyclique.
- De la configuration spatiale (forme de chaise, de bateau, de trièdre...).
- De la nature des groupes fonctionnels à savoir (Terpènes, Alcools terpéniques, Cétones, Phénols, Aldéhydes, Esters, Ethers).

I.6. L'identification des composés des huiles essentielles par CPG

Selon la Pharmacopée Française et Européenne, le contrôle des huiles essentielles s'effectue par différents essais, comme la miscibilité à l'éthanol et certaines mesures physiques : indice de réfraction, pouvoir rotatoire et densité relative. La couleur et l'odeur sont aussi des paramètres importants **(Pibiri., 2006)**.

La meilleure carte d'identité quantitative et qualitative d'une huile essentielle reste cependant le profil chromatographique en phase gazeuse. Il permet de connaître très exactement la composition chimique.

La CPG s'est montrée une méthode appropriée pour la séparation et l'identification des composants d'une HE, elle réalise à la fois une analyse qualitative et quantitative **(Paris et Godon., 1979)**.

L'échantillon est vaporisé et injecté en tête de colonne. L'élution est assurée par un flux de gaz inerte qui sert de phase mobile. La CPG est basée sur le partage du produit analysé entre une phase gazeuse mobile et une phase (liquide ou solide) immobilisée sur la surface d'un support inerte **(Skoog et al., 2003)**.

I.7. Activité biologique des huiles essentielles

Les huiles essentielles possèdent de nombreuses propriétés biologiques. En phytothérapie, elles sont utilisées pour leurs propriétés antiseptiques contre les maladies infectieuses d'origines bactérienne et fongique **(Billerbeck., 2007)**. Cependant, elles possèdent également des propriétés cytotoxiques **(Sivropoulou et al., 1996)** qui les rapprochent des antiseptiques et désinfectants en tant qu'agents antimicrobiens à large spectre. Les huiles essentielles, plus étudiées dans la littérature pour leurs propriétés antimicrobiennes, antibactériennes et antifongiques, possèdent également des propriétés anti-inflammatoires, antivirales **(Saeedi A et Omidbaigi R., 2009)**,

Dans les préparations pharmaceutiques, les terpènes phénoliques, comme le thymol le carvacrol, sont souvent utilisés comme antiseptiques, antibactériens et antifongiques **(Knowles et al., 2005; Tippayatum et al., 2007)**.

Les propriétés biologiques 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 auteurs préfèrent étudier l'effet d'un composé isolé pour pouvoir ensuite le comparer à l'activité globale de l'huile (**Billerbeck., 2007 ; Chaumont J, et Leger D., 1989**).

I.8. L'activité antifongique des huiles essentielles :

Dans les domaines phytosanitaires et agroalimentaires, les huiles essentielles ou leurs composés actifs pourraient également être employés comme agents de protection contre les champignons phytopathogènes (**Zambonelli et al., 2004**), et les microorganismes envahissant les denrées alimentaires (**Mangena T et Muyima., 1999**). Les huiles essentielles agissent négativement contre le développement des champignons, en diminuant leur croissance.

L'activité antifongique des HE a fait l'objet de plusieurs études scientifiques *in vitro*, depuis plusieurs années. Les méthodes utilisées pour évaluer cette activité sont nombreuses. Elles donnent, parfois, des résultats différents, selon les conditions expérimentales adoptées par chaque manipulateur (**Zhiri., 2006**).

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.**

I.9. Association d'huiles essentielles

Les effets antimicrobiens des associations d'huiles essentielles, comme pour les associations d'antibiotiques, sont définies selon quatre interactions possibles :

- ✓ **Indifférence** : l'activité d'une huile essentielle n'est pas affectée par l'autre.
- ✓ **Addition** : l'effet de l'association est égal à la somme des effets de chaque huile essentielle étudiée isolément, à la même concentration que dans l'association.
- ✓ **Synergie** : l'effet est significativement supérieur à la somme des effets des huiles essentielles étudiées isolément, à la même concentration.

- ✓ **Antagonisme** : l'association diminue l'activité de l'une ou l'autre des huiles essentielles. Elle est inférieure à la somme des effets de chaque huile essentielle prise séparément (**Hermal, 1993**).

II. La fusariose

Plusieurs maladies sur blé sont responsables de pertes de rendement ou encore d'une dégradation de la qualité sanitaire des grains. Les plus importantes, sont la septoriose (*Septoria* spp.), les rouilles (*Puccinia striiformis* et *tritricina*), et les fusarioses (*Fusarium* spp. et *Microdochium* spp.). La fusariose de l'épi a été décrite pour la première fois par (W. G. Smith en 1884) et nommée « gale du blé » (wheat scab), terme modifié en 1920 par Atanasoff en « maladie de *Fusarium* », « *Fusarium* blight », puis « fusariose » par Douin en 1926 (**Leonard et Bushnell, 2003**).

La fusariose est associée à un complexe d'espèces regroupant deux genres de champignons phytopathogènes, *Fusarium* et *Microdochium* (**Arseniuk et al., 1999**). Ces deux genres regroupent environ 19 espèces capables d'induire la fusariose de l'épi de blé et d'orge (**Liddell, 2003**).

II.1. Les symptômes

Lorsque les conditions climatiques sont favorables, la fusariose peut attaquer à tous les stades de développement et tous les organes de la plante, depuis les racines jusqu'aux épis. Le terme "fusariose" des céréales regroupe trois types de symptômes (**Parry et al., 1995**) :

- Seedling Blight : fusariose des semences, provoquent des manques à la levée et des fontes des semis.
- Foot Rot : fusariose du collet, entraînant la nécrose de ces tissus.
- Head Blight: fusariose de l'épi.

II.2. condition favorable de la fusariose

Des températures supérieures à 18°C pendant et après la floraison accroissent les risques de contaminations par les *Fusarium*. Néanmoins, des conditions climatiques humides à la floraison sont indispensables pour de fortes contaminations.

De même, à la germination de la semence, des conditions douces favorisent *fusarium* (**Fredec., Srvp., 2002**).

II.3. L'agent pathogène de la fusariose

La première et véritable description du genre *Fusarium* a été réalisée par Link en 1809. Il doit son nom du latin *fusus* (fuseau) en rapport à la forme de ses macroconidies fusiformes et cloisonnées (**Dorotée., 2013**).

II.3.1. La taxonomie du genre *Fusarium* selon (Link., 1809)

- **Règne : Fungi**
- **Division : Ascomycota**
- **Classe : Sordariomycetes**
- **Sous-classe : Hypocreomycetidae**
- **Ordre : Hypocreales**
- **Famille : Nectriaceae**
- **Genre : Fusarium**
- **Espèce : Fusarium**

II.3.2. *Fusarium graminearum*

Le *Fusarium graminearum* est un champignon pathogène, responsable de contaminations majeures du blé. Cette maladie n'est pas récente, mais depuis quelques années, son incidence a considérablement augmenté, partout dans le monde. Elle constitue un défi constant à la production de blé. La fusariose entraîne des pertes importantes des productions céréalières ainsi qu'une détérioration de la qualité des grains. Ce *Fusarium* est aussi connu pour sa capacité par rapport à d'autres espèces fusariennes à produire des mycotoxines, métabolites secondaires dont la toxicité pour l'homme, les animaux et les plantes est avérée. La contamination des grains en mycotoxines peut les rendre impropre à la consommation et soulève un réel problème de santé publique (**Boutigny., 2007**).

II.3.3. *Fusarium culmorum*

Le *Fusarium culmorum* peut infecter les épis, les tiges et les racines du maïs, du semis à la récolte. Les fusarioses de la tige et des épis entraînent des pertes de rendement et contaminent la récolte avec des substances toxiques.

Ces mycotoxines, dangereuses pour la santé humaine et animale, varient selon les espèces de *Fusarium*. Le maïs est souvent la céréale la plus fortement contaminée par des mycotoxines (**Leslie et Summerell, 2006**).

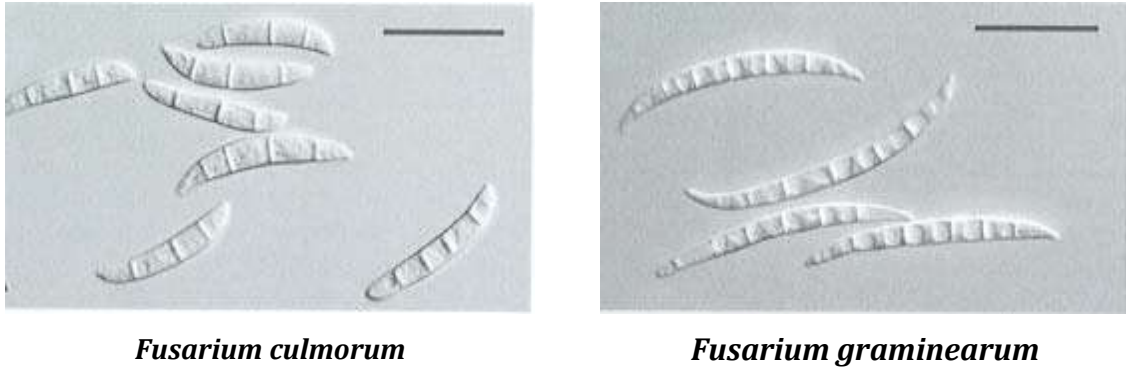
*Fusarium culmorum**Fusarium graminearum*

Figure 1 : Spores de *Fusarium culmorum* et *Fusarium graminearum*
(Leslie et Summerell, 2006)

II.4. Effet de la fusariose sur l'hôte (Blé et maïs)

La fusariose de l'épi est une maladie fongique qui peut survenir chez toutes les céréales cultivées (maïs, seigle, triticales, blé, orge, avoine) (Bailey *et al.*, 2004).

Les attaques peuvent être importantes surtout en années humides au moment de la floraison. Des pertes de 10 à 30 % sont courantes en cas de fortes attaques.

La fusariose des épis de blé est caractérisée par le flétrissement des épis et une sénescence prématurée, les épis apparaissent alors blanchâtres (figure 2-A). Les grains de blé fusariés sont petits, légers, ridés et parfois couverts d'un duvet blanc ou rose (Figure 2-B). Si l'infection est plus tardive, les grains peuvent être de taille normale mais ils se décolorent en rose (Mcmullen *et al.*, 2008). Sur le maïs, la fusariose se caractérise par la présence d'une pourriture grise à rose sur l'épi (Figure 2-D), ainsi que sur la tige et le collet. Les grains de maïs sont rabougris (Figure 2-C). En cas d'infection précoce, les grains sont de taille normale mais avec une décoloration rose (Mcmullen *et al.*, 2008).

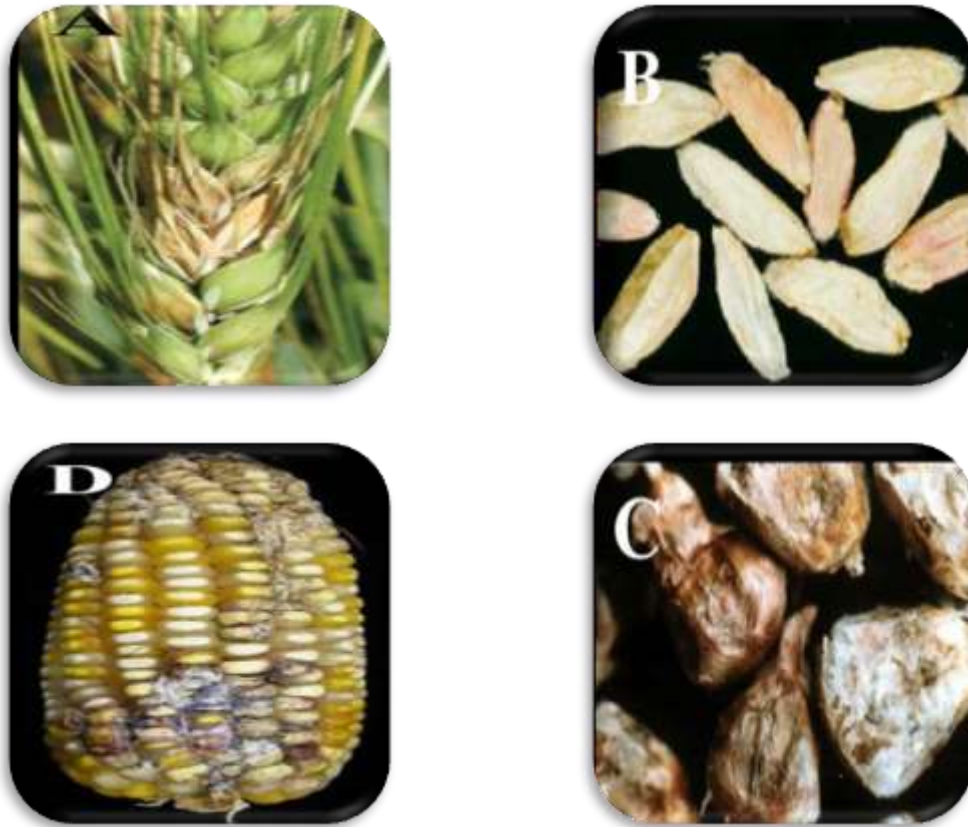


Figure 2: Symptômes de la fusariose sur céréales

(A) épis de blé avec des grains fusariés, (B) grains de blés ridés et rosâtres, (C) grains de maïs fusariés, (D) épi de maïs fusariés (*Mcmullen et al., 2008*)

III. Lutte biologique

III.1. Définition

Plusieurs définitions de la lutte biologique ont été proposées par différentes organisations comme la FAO, l'OMS, l'OCDE, ces définitions montrent des différences importantes selon la discipline scientifique, le domaine d'application et/ ou le pays concerné. Les définitions les plus couramment rencontrées sont :

❖ « *Utilisation d'organismes vivants ou de leurs produits pour empêcher ou réduire les pertes ou dommages causés par des organismes nuisibles aux produits végétales* ».

Cette définition est intéressante et assez complète puisqu'il est envisagé non seulement l'utilisation des organismes vivants eux-mêmes mais aussi de leurs produits. Par contre, cette définition n'envisage que la protection des productions végétales (**Suty., 2010**).

III.2. L'objectif de la lutte biologique

La lutte biologique repose sur le postulat qu'une espèce envahissante se multiplie sans limite dans une aire d'introduction quand elle ne rencontre pas les ennemis naturels (prédateurs, parasites, pathogènes) présents dans son milieu d'origine. C'est la théorie du relâchement écologique. L'utilisation d'une méthode de lutte biologique ne cherche pas à parvenir à une éradication totale de l'espèce envahissante (espèce cible) mais son objectif est d'en réduire suffisamment et durablement les effectifs pour l'amener en dessous d'un seuil de nuisibilité, écologiquement et /ou économiquement acceptable. L'objectif principal est donc de rétablir un équilibre durable entre l'agent de lutte et l'espèce cible. Le point le plus important est la sélection d'agent de lutte biologique hautement spécifiques de l'espèce cible pour qu'ils ne s'attaquent pas à d'autres espèces et ne deviennent pas à leur tour des espèces envahissantes nuisibles.

Dans un strict sens écologique, l'utilisation de la lutte biologique peut donc être considérée comme une stratégie permettant de restaurer la biodiversité fonctionnelle dans les écosystèmes concernés, en particulier les agro systèmes **(Suty., 2010)**.

Matériels et méthodes

Ce travail de recherche que nous avons entrepris s'inscrit dans la continuité d'une précédente étude réalisée par d'autres chercheurs (Elhouiti ; Chellali et Djikidel...). Il s'agit ici d'une étude de l'action antifongique de deux extraits d'huiles essentielles de la plante *Rhanterium* et de produits purs vis-à-vis de champignons phytopathogènes.

I. Matériels biologique

I.1. La plante étudiée (*Rhanterium*)

C'est une plante spontanée qui pousse sous les climats aride et semi-aride ; elle est commune dans tout le Sahara (**Bouheroum et al., 2007**). Elle est très appréciée par les dromadaires. La partie aérienne de *Rhanterium* est utilisée par la population locale pour le tannage, et en médecine populaire comme un antidiurétique (**Bouheroum et al., 2007**). Selon Yaghmai et Kolbadipour (1987), les indigènes du nord-est de l'Iran emploient localement cette plante pour son effet refroidissant de la peau.

I.2. Molécules bioactives testées

Les produits purs liquides, que nous avons testés dans l'ensemble de l'étude sur les souches phytopathogènes, Leurs caractéristiques sont regroupées dans le tableau ci-après.

Tableau 1: Les produits purs testés et leurs principales caractéristiques.

Composé	Formule brute	Degré de pureté	Densité	Masse molaire
α-Pinène	C10H16	≥ 95%	0,86	136,23g/mol
β-Myrcène	C10H16	/	0,8	136,24g/mol
Limonène	C10H16	97%	0,841	136,23g/mol
Linalool	C10 H18 O	>97%	0,86	154,25g/mol
Géraniol	C10H18O	98%	0,879	154,25g/mol

*Les huiles essentielles ainsi que les composés purs, ont été conservés dans des flacons teintés et bien scellés, dans un réfrigérateur à une température de 4°C.

I.3. Souches phytopathogènes étudiées

Pour l'activité antifongique, le choix s'est porté sur un genre de champignon phytopathogènes mycotoxinogène en raison des dégâts qu'il cause aux céréales.

L'identification des espèces de *Fusarium* est basée sur un grand nombre de caractères morphologiques et non-morphologiques, incluant la virulence, ce qui en fait un groupe hétérogène et polyphylétique (**Goswami et Kristler., 2004 ; Wagacha et Muthomi., 2007**).

Dans notre étude, y'a deux isolats faisant partie de la collection mycothèque , possédant un code propre et deux isolats algériens, possédant aussi un code spécifique (Tableau 2).

Tableau 2: Codes et origines des souches fongiques étudiées.

Code	Origine
T6	Collection de la mycothèque
T3	Collection de la mycothèque
BD17	Isolats algérien
T5	Isolats algérien

*Les souches étudiées, ont été entre tenues sur milieu solide PDA (voire annexes), dans des tubes inclinés, et conservées dans une chambre froide.

II. Méthodes expérimentales

II.1. L'extraction des huiles essentielles

Le *Rhanterium* à partir du quel les huiles ont été extraites, a été collecté durant le mois de Juin 2013, dans la localité de Zelfana (670 Km au sud d'Alger).

Tableau 3: La situation géographique et étage bioclimatique de la station de collecte, selon "Atlas Mondial Microsoft Encarta, 2013"

Région	Altitude	Latitude	Longitude	Etage bioclimatique
Zelfana	354 m	32°23'46.70" N	4°13'34.40" E	Chaud et aride

Les échantillons fraîchement collectés ont été séchés à température ambiante et à l'abri de la lumière et de l'humidité, dans un endroit sec et aéré. Les

échantillons ont été retournés, chaque jour, afin d'éviter les moisissures, puis stockés soigneusement dans des boîtes en carton propres. La plante a été scindée en deux parties : les fleurs, d'une part et les feuilles d'autre part. Chaque partie a été broyée manuellement à l'aide d'un mortier.

II.2. Le procédé d'extraction

Les huiles essentielles ont été obtenus par hydrodistillation à l'aide d'un appareil de type *Clevenger*.

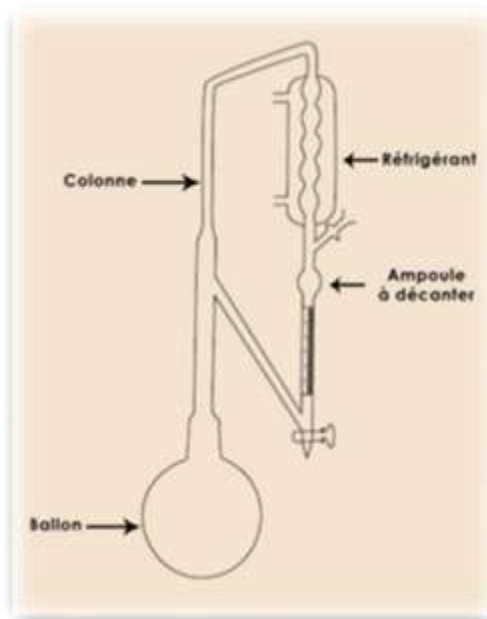


Figure 3: Schéma illustrant l'appareil de *Clevenger*

Une quantité de 200g de la partie aérienne a été macérée dans de l'eau, dans un ballon (de 2 litres), pendant 24 heures. L'ensemble a été placé dans l'appareil, et porté à ébullition à l'aide d'un chauffe-ballons. En traversant un réfrigérant, les vapeurs chargées d'huile se sont condensés, l'huile a été recueillie sous forme de distillat dans une ampoule à décanter, l'eau et l'huile ont été séparés par différence de densité (figure 3).

Les hydrodistillats obtenus ont été séchés par du sulfate de sodium anhydre (Na_2SO_4) afin d'éliminer toute trace d'eau. Après les avoir récupérées, les huiles essentielles ont été conservées, dans des tubes en verre bien scellés et recouverts d'aluminium, au réfrigérateur à 5°C et à l'abri de la lumière (protection contre la chaleur, l'évaporation et la lumière).

II.2.1. Calcul de la teneur en huiles essentielles

La teneur en % est définie comme étant le rapport entre la masse de l'huile extraite et celle de la biomasse de la plante traitée **(Carré, 1953 in Belyagoubi, 2006)**. Elle est calculée par la formule suivante :

$$T \% = \frac{m_1 \times 100}{m_0}$$

Où :

m_1 : masse d'huile essentielle, en grammes ;

m_0 : masse de la matière végétale traitée, en grammes ;

T : teneur en huile essentielle.

II.3. L'analyse chromatographique

Les huiles essentielles obtenues ont été analysées par chromatographie en phase gazeuse (CPG) **(Keravis, 1997 in Lahlou, 2004)**.

II.3.1. Les conditions opératoires de la CPG

L'analyse qualitative et quantitative des HE a été effectuée à l'aide d'un chromatographe de type HP 5, équipé d'une colonne capillaire (0,32 mm × 0,25 nm), avec une épaisseur de film de 0,25 µm et d'un détecteur à ionisation de flamme (FID).

La programmation de la température du four varie de 80 °C durant 2 min jusqu'à 200°C durant 5 min à raison de 5 °C/min.

Les indices de rétention linéaire ont été calculés par rapport aux n-alcane (C8-C26) standards.

II.3.2. Identification des constituants des huiles essentielles

L'identification des constituants des huiles essentielles a été faite sur la base de la comparaison de leurs indices de rétention en CPG (indices de Rétention/Kovats) calculés par rapport à une série d'alcane (C8-C26), et avec des références standards **(Lahlou, 2004)** des bibliothèques Wiley et NIST (*Wiley National Bureau Of Standards, National Institute of Standards and Technology libraries*) **(Husnu Can Baser et Demirci, 2007)**.

II.4. Procédure microbiologique (analyse spectrophotométrique en microplaque)

Quatre espèces ont été cultivées en vue des essais biologiques

II.4.1. La pré-culture des champignons (Préparation de l'inoculum)

Les souches étudiées, sont conservées sur milieu solide PDA (Potatoes Dextrose Agar 39%, Difco) en boîte de Pétri (55 ou 90 mm de diamètre) (**Colin *et al.*, 1989**).

Pour la production de spores des *Fusarium*, 12 implants de PDA sont placés dans 25ml de milieu CMC, induisant la sporulation (Carboxyl methyl cellulose), et incubés 5 jours à l'obscurité (25°C) à 150 rpm (INFORS AG, Bottmingen, Switzerland). Les suspensions de spores obtenues, sont filtrées à 0.45 µm et centrifugées (4°C, 5000 rpm, 5min).

Le dénombrement des conidies est effectué sur cellule de Thoma. Après dénombrement et dilution, 10⁶ spores/mL (dépôt de 10µL) sontensemencés dans le milieu synthétique MSS (voir annexes) sur microplaques à 24puits.

II.4.2. La quantification de l'activité antifongique sur milieu liquide

L'huile essentielle et les composés candidats sont testés pour leurs propriétés antifongiques vis-à-vis des champignons cultivés en milieu liquide synthétique MSS. Pour ce faire, une méthode spectrophotométrique est employée afin de mesurer la turbidité.

Les cultures se déroulent en microplaques 24 puits (1mL/puits). Une suspension de spores est inoculée (10µL) au centre des puits et Les produits y sont ajoutés en utilisant une gamme de concentration allant de 1/5^e, 1/10^e, 1/25^e, 1/50^e, 1/100^e et 1/200^e (Tableau 4). Toutes les doses, pour une même biomolécule sont testées sur une même plaque, d'où l'utilisation d'un film transparent adhésif pour fermer les puits (éviter le mélange dû à la volatilité). Puis, l'ensemble est laissé à croître pendant 4 jours, à 25°C. (Trois répétitions ont été effectuées pour chaque dose).

Tableau 4: Concentrations des doses d'huiles essentielles utilisées pour évaluer leur effet sur la croissance fongique.

	D1	D2	D3	D4	D5	D6
En %	1/5 ^e	1/10 ^e	1/25 ^e	1/50 ^e	1/100 ^e	1/200 ^e
En µl /ml	20	10	5	2	1	0,5

a. En présence des huiles essentielles et des composés bioactifs

Nous avons testé dans un premier temps l'effet des HE purs et par la suite les composés candidats un par un à savoir : α -Pinène, β -Myrcène, Limonène, Linalool, et Géraniol sur la croissance fongique des quatre souches étudiées.

A la lumière des résultats de l'identification des constituants chimiques de l'HE du *Rhanterium* (feuilles et fleurs), nous avons pu déduire leurs proportions dans cette huile dans le but de connaître les concentrations qu'on doit tester.

b. En présence du mélange

Les méthodes d'analyse des extraits purs ont beaucoup évolué depuis 10 ans et il est maintenant possible d'isoler et d'identifier des composants auparavant inconnus, ceci permet le développement de nouveaux mélanges pouvant avoir un effet additif ou synergique (**Chiasson et al., 2004**).

De ce fait, vu la disponibilité des cinq composés candidats à des quantités assez suffisantes, en plus de les tester séparément sur les souches fongiques, nous les avons testé sous forme d'un mélange, afin de connaître l'éventuelle interaction (synergie, additivité...) existante entre elles.

Dans le but d'évaluer la IC₅₀ du mélange vis-à-vis des quatre souches, toutes les dilutions 1/5^e, 1/10^e, 1/25^e, 1/50^e, 1/100^e et 1/200^e ont été testées.

II.5. Le calcul du pourcentage d'inhibition

Le pourcentage d'inhibition de la croissance fongique a été déterminé en utilisant la relation suivante,

$$I(\%) = \frac{(A_T - A_E)}{A_T} \times 100$$

A_T : absorbance du témoin à longueur d'onde ;

A_E : absorbance de l'échantillon ;

I : taux d'inhibition de la croissance du mycélium (en %).

L'huile essentielle est dite :

- très active lorsqu'elle possède une inhibition comprise entre 75 et 100 % ; la souche fongique est dite très sensible ;
- active lorsqu'elle possède une inhibition comprise entre 50 et 75 % ; la souche fongique est dite sensible ;
- moyennement active lorsqu'elle possède une inhibition comprise entre 25 et 50% ; la souche est dite limitée ;
- Peu ou pas active lorsqu'elle possède une inhibition comprise entre 0 et 25% ; la souche est dite peu sensible ou résistante (**Alcamo, 1984 ; Rotimi et al., 1988**).

II.6. L'analyse Statistique

Toutes les expériences ont été répétées trois fois. Pour l'étude statistique, nous avons utilisé le logiciel : XS-Excel 2013. Nous avons déterminé la moyenne et l'écart type (n=3) de nos résultats, et adopté le seuil de 5%, pour voir si les différences sont significatives ou non.

Résultats et discussion

I. Cinétique d'extraction et la teneur en huile

D'après les travaux d'**El-Houiti (2010)**, l'étude de la cinétique d'extraction des huiles essentielles à partir du *Rhanterium* par hydrodistillation, a permis d'estimer la durée d'extraction et la teneur en huiles essentielles.

Le temps optimal pour le déroulement de l'hydrodistillation est de 6h. C'est le temps nécessaire pour l'extraction de 5ml d'huiles essentielles par kilogramme de matière végétale.

Les teneurs en huiles essentielles des feuilles et des fleurs varient de 0,11% à 0,49%. Les deux parties de la plante renferment des quantités en huiles essentielles pratiquement égales au sein d'une même région.

II. Identification des constituants des huiles essentielles

Grâce aux résultats de l'analyse chromatographique par CPG des huiles essentielles extraites à partir de la partie aérienne de la plante étudiée, nous avons pu identifier 61,42 % des composés de l'extrait des feuilles et 58,28 % des composés de l'extrait des fleurs.

Les composés identifiés des deux huiles essentielles sont presque identiques, la différence qui y réside demeure dans les pourcentages, de ce fait les composés majoritaires des deux huiles, sont différents. L'extrait pur des feuilles a pour composés majoritaires : **α -Pinène** et β -Pinène, et ceux de l'extrait pur des fleurs sont : **α -Pinène**, Benzaldehyde et β -Myrcène.

Une étude réalisée par **Bouheroum et al., (2007)** sur l'huile essentielle du *Rhanterium adpressium*, collectée, à Ouargla en Algérie, a révélé que les composés majoritaires de cette huile sont : β -Eudesmol, 16 β -Hydroxylupeolyl-3-hexadecanoate, Stigmasterol, propan-2-ol.

Nous remarquons que les composés majoritaires de l'huile essentielle de *Rhanterium collectée* à Ouargla, sont différents de ceux de nos extraits de la même espèce collectée à Zelfana.

Les variations du % des composés chimiques de l'HE de *Rhanterium* pourraient être due à des facteurs exogènes tels que l'origine géographique, le lieu et la durée de séchage et la méthode d'extraction (Svoboda et Hampson, 1999), aux conditions climatiques de la saison de collecte des échantillons

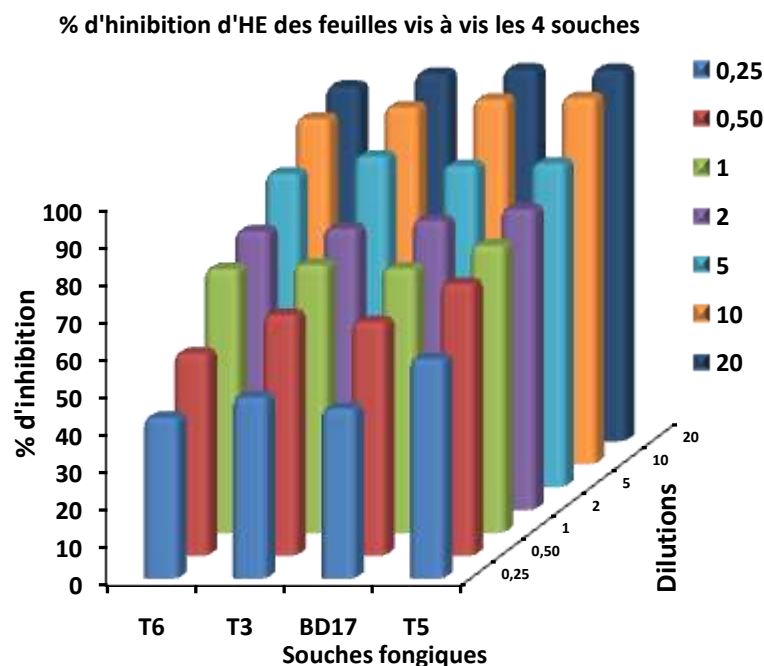
(l'ensoleillement, la température,...), la photopériode, les composants du sol, l'approvisionnement en eau et l'altitude et à des facteurs endogènes tels que la physiologie du végétal et la composition génétique des individus. Les attaques des insectes et des micro-organismes peuvent aussi avoir une influence sur la composition des HE (Hüsnü Can Baser et Buchbauer G., 2010).

III. L'évaluation de la quantification de l'activité antifongique

Afin d'évaluer la quantification de l'activité antifongique des deux huiles essentielles (feuilles et fleurs) et des composés synthétiques sur la croissance mycélienne des souches fongiques étudiées, nous les avons testés à différentes concentrations en appliquant la méthode de contact directe dans un milieu liquide. Le suivi qui se fait par l'appareil spectrophotométrique, nous a permis d'avoir les résultats suivants.

III.1. En présence des huiles essentielles (feuilles et fleurs)

A propos des histogrammes présentés dans la (figure 5), nous remarquons l'existence d'une relation proportionnelle entre les taux d'inhibition et les concentrations testées. Nous pouvons conclure que les deux HE étudiées, ont exercé une importante activité inhibitrice. Donc, l'activité inhibitrice la plus élevée est enregistrée pour l'extrait des fleurs.



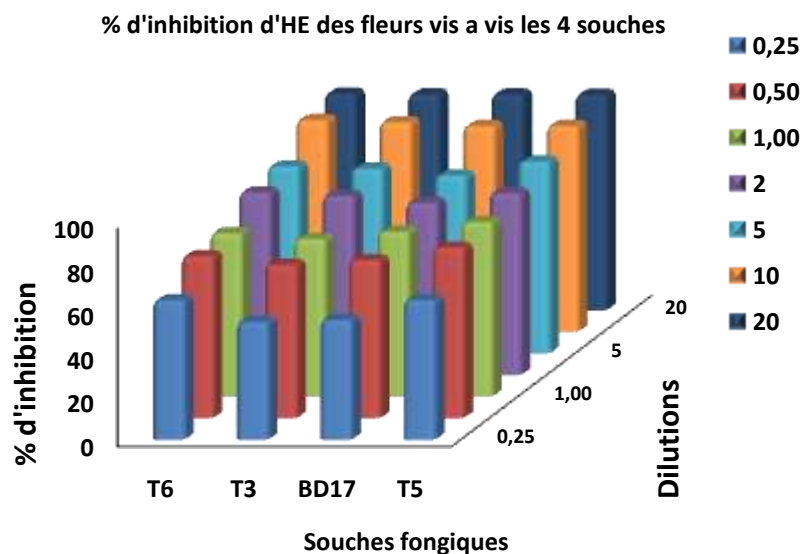


Figure 4 : Comparaison entre les taux d'inhibitions des huiles essentielles testées (feuilles et fleurs) sur la croissance mycéliennes des souches fongiques étudiées.

Toutes les concentrations testées de l'HE des fleurs allant de 0,25µl/ml à 20µl/ml ont donné des taux d'inhibitions supérieures à 50% vis-à-vis des quatre souches fongiques étudiées. Contrairement à l'HE des feuilles, où nous remarquons qu'à la dilution 0,25µl/ml, les quatre souches montrent une certaine résistance manifestant des taux d'inhibitions moyenne.

La CMI a été définie comme étant la plus faible concentration en HE inhibant la croissance mycélienne.

La CI_{50} est inversement lié à la capacité antifongique d'un produit, car elle exprime la quantité requise pour diminuer la croissance fongique de 50%. Plus la valeur d' IC_{50} est basse, plus l'activité antifongique du produit est importante.

Grâce aux résultats obtenus, nous avons pu estimer les valeurs des CI_{50} et des CMI des deux huiles essentielles (feuilles et fleurs) des souches fongiques étudiées. Les taux d'inhibitions des CI_{50} et des CMI de ces deux HE sont indiqués dans la figure suivante :

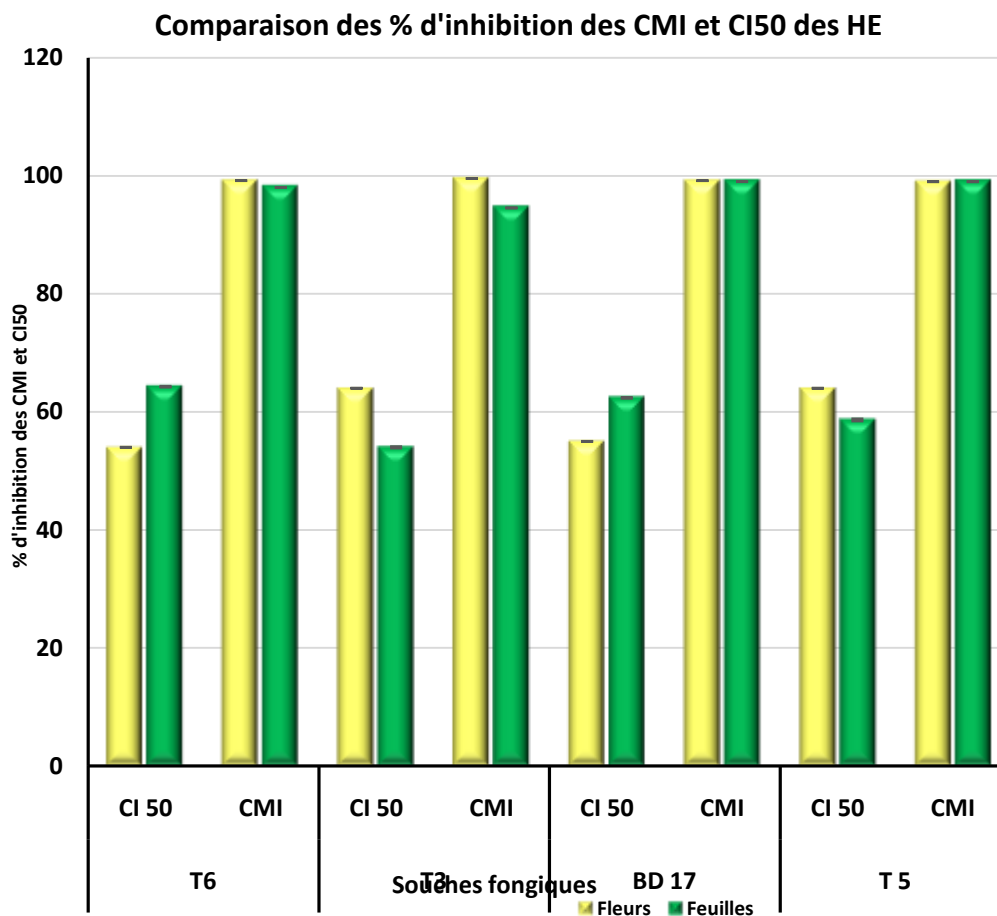


Figure 5: Taux d'inhibitions des CI₅₀ et des CMI des extraits vis-à-vis des quatre souches testées

Les deux HE ont présenté des CMI de 20µl/ml sur l'ensemble des souches étudiées. Contrairement à l'CI₅₀ où nous constatons une variabilité entre les HE (feuilles et fleurs), mais une constance entre les souches. La CI₅₀ de l'HE des fleurs est constante à une concentration de 0,25µl/ml et celle de l'HE des feuilles entre 0,25 et 0,5µl/ml.

D'après nos résultats nous avons constaté que les souches T6 et BD17 sont sensibles pour les deux extraits d'HE.

Les valeurs d'IC₅₀ et de CMI estimées, confirment que l'HE des fleurs est la plus efficace, vue les résultats confirmés au précédents, elle a donné les mêmes taux d'inhibitions avec l'HE des feuilles mais avec une concentration moindre.

L'étude de l'effet antifongique de l'HE de girofle sur la croissance de (T6) par la méthode de diffusion a révélé que plus la concentration en HE de girofle est forte, plus l'inhibition du mycélium l'est aussi et que la valeur de la CI₅₀ de l'HE de

girofle vis-à-vis de *T6* a été déterminée à 0,125µl/ml (**Cardiet, 2010**). Ce résultat nous prouve que notre HE des fleurs de *Rhanterium* fait partie des huiles essentielles à fort potentiel antifongique contre *T6* avec sa CI₅₀ est constante à 0,25 µl/ml.

D'après **El houiti Fatiha (2009)**, il a été noté que le pourcentage d'inhibition du genre *Fusarium* varie de 84,5 à 92,4%. Ces valeurs nous ont permis de déduire que nous avons presque les mêmes résultats qui varient de 94,54 à 99%.

Selon (**Chelali et djekidel, 2014**), les résultats de l'étude de l'activité antifongique de ces deux HE ont révélé qu'elles sont dotées d'un pouvoir antifongique important, la valeur de leur CI₅₀ est comprise entre 0,5 et 2 µl/ml. En comparant ces valeurs avec nos résultats, nous constatons que la valeur de CI₅₀ est comprise entre 0,25 et 0,5 µl/ml. Donc le pouvoir antifongique du milieu liquide est meilleur que le milieu solide et ceci est dû à la méthode utilisée.

Dans le cas de nos échantillons d'HE, nous avons noté que leur effet fongistatique est d'une concentration de (20µl/ml). Dans l'étude réalisée par **Aouissi H,(2010)** sur l'effet des HE des astéracées sur cette souche phytopathogène, il a été noté une forte activité antifongique supérieure à (20µl/ml).

D'après **Ameur et Rahmani (2012)** ; qui ont étudié le pouvoir antifongique de l'HE de *Mentha piperita* collectée du sud algérien, dont les composés majoritaires sont : Menthone (14,67%), Menthol (7,46%) et β-Caryophyllène (62,34%), 1µl/ml a inhibé la croissance mycélienne des souches *T6* et *T5* à 50%. En comparant nos résultats avec les leurs, nous avons conclu que les HE de *Rhanterium* (parties : fleurs et feuilles) et de *Mentha piperita* ont presque la même efficacité.

Kordali et al.(2005) ont remarqué le pouvoir fongistatique des huiles essentielles de l'absinthe sur 34 espèces phytopathogènes dont le *Fusarium* avec seulement (20µl /ml).

III.2. En présence du mélange des composés purs

Dans le but de connaître quel type d'interaction existe entre les cinq produits, nous les avons testés sous forme d'un mélange, en tenant compte de leurs % dans l'HE de la plante étudiée. Les résultats de la croissance mycélienne des quatre souches en présence de ce mélange à différentes dilutions, nous ont donné les valeurs des CI₅₀ et des CMI, comme l'illustre la figure ci-dessous.

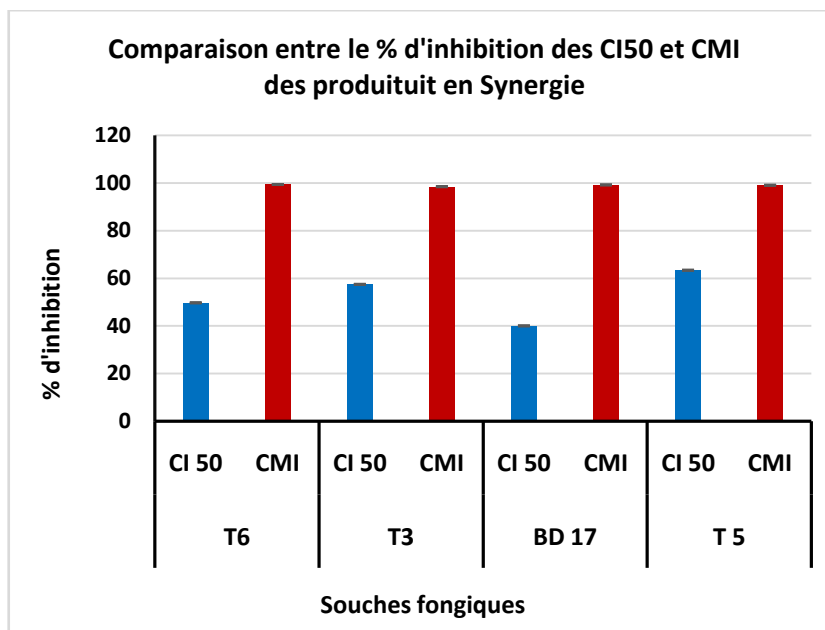


Figure 6 : Comparaison entre les taux d'inhibitions des CI₅₀ et de la CMI vis-à-vis des quatre souches étudiées

La valeur de la CMI est la même pour les quatre souches et est égale à 20 µl/ml. Quant à la CI₅₀ est comprise entre 0.5 et 1µl/ml pour les quatre souches.

En comparant ces résultats avec ceux du test précédent, nous remarquons que l'activité des produits en mélange est élevée par rapport à celle des produits testés séparément, c'est-à-dire qu'il y a une interaction de type synergie entre ces molécules.

D'après les résultats **de Chellali et djekidel (2014)**, qui ont affirmé que l'effet du mélange des composés (en synergie) est meilleur par rapport aux produits testés séparément.

Nous pouvons affirmer que le pouvoir antifongique de l'huile essentielle de *Rhanterium* d'une manière générale est efficace en présence d'un mélange de composés, car ces derniers ont un meilleur effet quand ils travaillent en synergie.

Conclusion

La salubrité et la conservation des grains de céréales constituent un problème important à l'échelle mondiale car elles touchent la survie des hommes et des animaux domestiques.

Le but de ce travail est l'étude des effets des huiles essentielles de *Rhanterium* sur la croissance du *Fusarium* qui touche les céréales.

L'activité biologique de l'huile essentielle de *Rhanterium* donne un pouvoir antifongique très important sur *Fusarium*. A la base des résultats trouvés nous pouvons conclure que nos huiles essentielles peuvent servir comme base de lutte biologique.

La teneur en huile essentielle du *Rhanterium* est comprise entre 0,11% (1,25ml/Kg) et 0,49% (5,75ml/Kg). L'identification des constituants chimiques des huiles essentielles des parties aériennes (feuilles et fleurs) de la plante étudiée, nous a permis d'identifier environs la moitié de leurs composés.

Les résultats de l'activité antifongique des HE des feuilles et fleurs révèlent qu'elles sont dotées d'un pouvoir antifongique prometteur, la valeur de leur CI₅₀ est comprise entre 0,5 et 2 µl/ml. Quant à ceux des composés purs testés séparément, ils nous ont permis de démontrer et de confirmer que :

- la proportion d'un composé dans une huile essentielle (majoritaire ou minoritaire), ne reflète pas forcément son activité si elle est forte ou pas ;
- le pouvoir antifongique d'une HE est due aux groupements fonctionnels de ses composés ;
- les alcools sont plus actifs que les hydrocarbures terpéniques ;

En comparant l'activité des composés testés séparément, et sous forme d'un mélange avec celles des HE, on peut conclure que l'activité antifongique de l'HE de *Rhanterium* est due à la synergie entre ses composés, parmi eux ceux étudiés.

Nous avons déduit que la différence de sensibilité des souches au sein du même genre vis-à-vis d'un même produit, peut être expliquée par la variabilité de leurs physiologies, en effet un produit peut être fongistatique vis-à-vis d'une souche et ne pas l'être vis-à-vis d'une autre.

En comparant nos résultats concernant le milieu liquide avec ceux du milieu solide, nous déduisons d'une part, que le milieu liquide est plus rapide dans la réalisation du criblage grâce à l'appareil spectrophotométrique, fiable et efficace. D'autre part il est économique pour l'utilisation d'HE et les milieux de culture.

Références

bibliographiques

A

Alcamo E. I., 1984. Fundamentals of Microbiology. Addison-Wesley publishing company, London .p:310-341 ; 617-699.

Ameur M., Rahmani F. Z., 2012. L'étude de l'activité antifongique de la menthe poivrée (*Mentha piperita*). Mémoire d'ingénieur, Université Amar Telidji Laghouat.

Aouissi H., 2009. Composition chimique et activités antioxydante et antimicrobienne des huiles essentielles de trois espèces végétales du genre *Artemisia*: *Artemisiaabsinthium*, *A. herba alba* et *A. campestris*. Université Amar Téliidji – Laghouat.

Arseniuk, E., Foremska, E., Goral, T., Chelkowski, J. 1999. *Fusarium* head blight reactions and accumulation of deoxynivalenol (DON) and some of its derivatives in kernels of wheat, triticale and rye. *Journal of Phytopathology*. **147** p.

B

Bailey, K.L., Couture, L., Gossen, B.D., Gugel, R.K. et Morrall, R.A.A., 2004. Maladies des grandes cultures au Canada. Société canadienne de phytopathologie. 318p.

Belaïche P., 1979. L'aromatogramme. Traité de phytothérapie et d'aromathérapie. M.S.A. Editeur, Paris. Tome 1, 204p.

Beloued A., 1998. « *Plantes médicinales d'Algérie* ». OPU, Alger.

Billerbeck V.G., 2007. Huiles essentielles et bactéries résistantes aux antibiotiques. 249-253.

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.

Bouheroum M., Benayache S. F., Benayache L., Zaiter J., Barrera M. et Francisco L., 2007. Terpenoids and triynepoxide from the aerial part of *Rhantherium adpressum*. *Chemistry of Natural Compounds*, **43**, 110-111

Bousnane M., 2013. Composition chimique, activités antifongique et antioxydante de l'huile essentielle de *Mentha pulegium* L. 24 p.

Boutigny A., 2007. Etude de l'effet de composés du grain de blé dur sur la régulation de la voie de biosynthèse des tricothécènes B : purification de composés inhibiteurs, analyse des mécanismes impliqués. Thèse de doctorat, Université de Bordeaux 1. 202p.

Bruneton J., 1999. « *Pharmacognosie* ». Plantes médicinales. Ed Lavoisier, Techniques et documentation. Paris. 405p.

Bruneton J., 2009. Pharmacognosie, Phytochimie, Plantes Médicinales. Techniques et Documentation, 4^e édition, Lavoisier, Paris.

C

Chalali S., Djekidel Z., 2014. Evaluation de l'activité des huiles essentielles et de quelques biomolécules vis-à-vis des champignons phytopathogènes. Université Amar Telidji Laghouat.

Chaumont J.P., Leger D., 1989. Propriétés antifongiques de quelques phénols et de composés chimiquement très voisins relation structure - activité. *Plant Med. Phyto.* 23(2): p 124 - 126.

Chiasson H., Vincent C., et Bostanian N., 2004. Insecticidal properties of a *Chenopodium*-based biopesticide. *Journal of Economic Entomology.* 97 : 1378-1383.

Collin G.J., Lord D., Allaire J. et Gagnon D., 1989. Huiles essentielles et extraits 'micro-ondes'. *Parfums Cosmétiques Arômes*, 97, 105-112.

D

Dorothee Siou., 2013. Développement épidémique de la fusariose des épis de blé et conséquences des interactions entre espèces du complexe fusarien. Université PARIS-SUD 11. 9p.

E

El haib A., 2011. Valorisation de terpènes naturels issus de plantes marocaines par transformations catalytiques. 8p.

El-Houiti F., 2010. Composition chimique, activité antimicrobienne et antioxydante des huiles essentielles de *Rhanterium*. Mémoire de Magister, Université Amar Telidji. Département de Biologie.

F

Fresdes, Srpv., 2002. Les principales maladies du blé transmis par les semences. Fiche technique. 3p.

G

Goswami R.S., Kistler H.C., 2004. Heading for disaster: *Fusarium graminearum* on cereal crops. *Molecular Plant Pathology* 5, 515–525.

H

Hermal C., 1993. Activité bactériostatique de sept émulsions d'huiles essentielles et de deux associations d'émulsions d'huiles essentielles. Faculté de Pharmacie, Université de Montpellier 1 (87).

Hüsnü Can Baser K. et Buchbauer G., 2010. Handbook of essential oils science, technology, and applications. *CRC Press*, 994p.

K

Khenaka K., 2011. Effet de diverses plantes médicinales et de leurs huiles essentielles sur la méthanogénèse ruminale chez l'ovin. 39p.

Kordali S., Kotan R., Mavi A., Cakira A., Ala A., Yildirim A., 2005. Determination of the Chemical Composition and Antioxidant Activity of the Essential Oil of *Artemisia dracunculus* and of the Antifungal and Antibacterial Activities of Turkish *Artemisia absinthium*, *A. dracunculus*, *Artemisia santonicum*, and *Artemisia spicigera* Essential Oils. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, **53**, 9452-9458.

Knowles J.R., Roller S., Murray D.B., Naidu A.S., 2005. Antimicrobial Action of Carvacrol at Different Stages of Dual-Species Biofilm Development by *Staphylococcus aureus* and *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium. *Applied and Environmental Microbiology*. **71** (2): p. 797-803.

L

Lahlou M., 2004. Methods to study the phytochemistry and bioactivity of essential oils. *Phytother. Res.* **18**, 435-448.

Leonard KJ., Bushnell WR., 2003. *Fusarium* head blight of wheat and barley. St. Paul, U.S.A.: APS Press.

Leslie J.F., Summerell B.A., 2006. The *Fusarium* Laboratory Manual. In: Blackwell publishing, 388 p.

Liddell C.M., 2003. Systematics of *Fusarium* species and allies associated with *Fusarium* head blight. 35-43.

M

Mangena T., Muyima N.Y.O., 1999. Comparative evaluation of antimicrobial activities of essential oils of *artemisia afra*, *pteronia incana* and *rosmarinus officinalis* on selected bacteria and yeast strains. 291p.

Mcmullen M., 2008. *Fusarium* head blight (Scab) of small grains. North Dakota State University, Plant Pathology Department,

P

Paris R. & Godon M., 1979. Chromatographie en couche mince et sur papier des huiles essentielles. Ed. Masson, Paris.

Parry D., Jenkinson P., Mcleod L., 1995. « *Fusarium* Ear Blight (scab) in Small-Grain Cereals – a Review ». *Plant Pathology*. Vol. 44, n°2. 207p.

Pibiri M.C., 2006. Assainissement microbiologique de l'air et des systèmes de ventilation au moyen d'huiles essentielles. Thèse de Doctorat, Lausanne, Canada, 177p.

S

Saeedi K.A., Omidbaigi R., 2009. Evaluation of content and composition of fatty acids, total phenolic and essential oil content of *Kelussia odoratissima* Mozaff. Seed. Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants. **25**(1): p. 113 - 119.

Sifi I., 2010. Galles du Pistachier de l'Atlas (*Pistachia atlantica* Desf.) : Composition chimique en huiles essentielles, activités biologiques et activités antioxydantes. Mémoire de Magister, Université Amar Telidji.

Sivropoulou A., Papanikolaou E., Nikolaou C., Kokkini S., Lanaras T. & Arsenakis M., 1996. Antimicrobial and cytotoxic activities of *origanum* essential oils. J. Agric. Food Chem. 1202p.

Skoog D.A., Holler F.J. et Nieman T.A., 2003. Principes d'analyse instrumentale. 1^{ère} Édition, Ed. De Boeck Université, 945p.

Suty L., 2010. La lutte biologique : vers de nouveaux équilibres écologiques. Ed Quae. 44-45.

T

Tantaoui-Elaraki A., Ferhout H. et Errifi A., 1993. Composition and antimicrobial activity of the essential oils of *Thymus Broussonettii*, *T.zygis* and *T.satureioides*. *Essent. Oil. Res*, **5**, 45-53.

Tippayatun P., Chonhenchob V., 2007. Antibacterial Activities of Thymol, Eugenol and Nisin Against Some Food Spoilage Bacteria. **41**: p. 319 - 323.

W

Wagacha J.M., Muthomi J.W., 2007. *Fusarium culmorum*: Infection process, mechanisms of mycotoxin production and their role in pathogenesis in wheat. *Crop Protection* **26**, 877-885.

Y

Yaghmai M.S., Kolbadipour S., 1987. Volatils Components of *Rhanterium epapposum* Oh. flavour and fragrance journal, **2**, 29-32.

Z

Zambonelli A., D'Aurelio A.Z., Severi A., Benvenuti E., Maggi L., Bianchi A., 2004. Chemical composition and fungicidal activity of commercial oils of *thymus vulgaris* L. *J. Essent. Oil Res.* **16**-69 p.

Zhiri A., 2006. Sciences, Nutrition, Prévention et Santé. *Nutra News*. Directeur de la publication : Linus Freeman - Rédacteur en chef : Yolaine Carel, 16p.

ANNEXE

Composition des milieux de culture

1. Potatoes dextrose Agar (PDA : pour les champignons)

Infusion de pomme de terre.....	200 ml
Glucose	15 g
Agar-agar	20 g
Eau distillée	qsp 1L

2. Solution d'Agar 0,2%

Agar-agar.....	2 g
Eau distillée.....	qsp 1L

3. Composition du milieu CMC :

CMC.....	15 g/L
Yeast extract.....	1 g/L
MgSO ₄ , 7H ₂ O	0.5 g/L
NH ₄ NO ₃	1 g/L
KH ₂ PO ₄	1 g/L

4. Composition du milieu MSS

Saccharose.....	20 g/L
KH ₂ PO ₄	0.5 g/L
K ₂ HPO ₄	0.6 g/L
MgSO ₄ , 7H ₂ O.....	17 mg/L
(NH ₄) ₂ SO ₄	1 g/L