

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

République Algérienne Démocratique et Populaire

وزارة التعليم العالي

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

Université Amar TELIDJI - Laghouat -
Faculté des Sciences
Département des Sciences Agronomiques

جامعة عمار ثلثي
كلية العلوم
الفلاحية



MEMOIRE DE FIN D'ETUDES

En vue de l'obtention du diplôme de Master en Agronomie
Option : Amélioration et biotechnologie végétale

Thème

**Détermination *in vitro* de l'activité antifongique
de l'huile essentielle d'*Artemisia campestris* de
la région de Laghouat**

Présenté (e) par : *Hind Hechachna*

Le : 08/06/2015

Encadré (e) par : *Mr Houicher Abderrahmane ; Maître de Conférences B*

Remerciements

Nous remercions notre créateur Allah, Grand et Miséricordieux, le tout puissant pour le courage qu'il nous a donné pour mener ce travail à terme.

Merci à Dieu, qui m'a permis de revenir pour terminer l'étude de maîtrise en agronomie Option : Amélioration et biotechnologie végétale après l'obtention du diplôme d'ingénieur d'État en agronomie Option : Production et amélioration des plantes (en 2013)

Je commence par exprimer ma profonde reconnaissance et mes vifs remerciements au M. HOUICHER, Maître de Conférences à l'université de Laghouat. Qui m'a honoré en acceptant de diriger ce travail la deuxième fois, pour ses encouragements, ses conseils, sa disponibilité et surtout pour sa patience dans la correction de ce mémoire. J'ai été satisfait de votre qualité exceptionnelle de bon enseignant, merci de m'avoir guidé avec patience et d'avoir consacré autant d'heures pour les corrections de ce manuscrit ; je ne peux, Monsieur, que sincèrement vous exprimer mon respect et mon gratitude.

J'adresse mes sincères remerciements à M^{elle} ZAZA M, Maître Assistante à l'université de Laghouat d'avoir accepté de présider le jury.

Je tiens également mes vifs remerciements à Monsieur ZIANE M, Maître de Conférences au centre universitaire de Ain-Temouchent l'honneur qu'il nous a fait en acceptant d'examiner ce mémoire.

Je tiens à exprimer ma très grande considération, et mon profond respect au Madame GOUDJAL, Monsieur GOUDJAL, et Monsieur BALITE pour leur aide et ses encouragements. .

Je tiens à vous remercier pour tout ce que vous m'avez apporté tout au long de mes études. Vous avez su faire partager votre expérience et vous m'avez guidé dans le monde de la recherche scientifique

Dédicace

C'est avec un très grand honneur que je dédie ce modeste travail aux personnes le plus chères au monde mes chers parents qui m'ont permis de faire mes études dans les meilleures conditions et qui m'ont appris ne *jamais baissé les bras.*

A la mémoire de ma petite sœur *Imane*, mes grands pères, ma grande mère qui m'a toujours aimé et comblé par ses bénédictions, que Dieu le tout *puissant les accueillent en son vaste paradis*

Je dédie aussi cette modeste réalisation à :

Mes très chers frères : M.Lazher, M.Ghazali, Ahemed et Ameer

Mes très chers sœurs : Samah, Sarah

Mes chers Oncles, Tantes, Cousines et Cousins

Ainsi que mes amies : Fatima, Nassira, Hadda, Saliha, Achoura, Sarah et Khadija.

Et tous mes collègues

Hechachna Hind« Détermination *in vitro* de l'activité antifongique de l'huile essentielle d'*Artemisia campestris* de la région de Laghouat »

RÉSUMÉ

Artemisia campestris est une source riche en composés phénoliques et ses extraits montrent d'excellentes activités antioxydantes et antimicrobiennes. Pour cela, l'analyse de la composition chimique et la détermination *in vitro* l'effet antifongique de l'huile essentielle d'*Artemisia campestris* ont été étudiées. Le rendement en huile essentielle est de 0.71%. L'analyse chromatographique d'huile essentielle a permis d'identifier 42 composés dont les composés majoritaires sont : le -pinene (18.65%), le -pinene (16.78%), le -myrcene (17.34%) et le Germacrene (10.34%). Les résultats de l'activité antifongique de l'huile d'*A. campestris* montrent que *Fusarium graminearum* est la souche la plus sensible à l'huile pour une concentration inhibitrice et fongicide de 1.25 µl/ml (v/v). L'huile présente également une forte activité fongicide contre les champignons testés, à l'exception de *Penicillium citrinum*, *P. viridicatum* et *Aspergillus niger* (CMF >20 µl/ml). L'étude présente un grand intérêt pour l'industrie agroalimentaire car elle propose l'utilisation de l'huile essentielle d'*A. campestris* comme un biofongicide afin de réduire la dépendance des fongicides synthétiques et de garantir une meilleure production agricole.

Mots-clés : *Artemisia campestris*, Huile essentielle, Composition chimique, Activité antifongique.

« *In vitro* determination of antifungal activity of *Artemisia campestris* essential oil from Laghouat region »

Abstract

Artemisia campestris is a rich source of phenolic compounds and its extracts have excellent antioxidant and antimicrobial activities. Therefore, the chemical composition and the determination *in vitro* of antifungal effect of *Artemisia campestris* essential oil were studied. The essential oil yield was 0.71%. Based on chromatographic analysis, 42 compounds were identified, which -pinene (18.65%) -pinene (16.78%), the -myrcene (17.34%) and germacrene (10.34%) were the major constituents. The results of the antifungal activity of the *A. campestris* oil showed that *Fusarium graminearum* is the most sensitive strain to the activity of oil for inhibitory and fungicidal concentrations of 1.25 µl/ml (v/v). The oil exhibited also a strong fungicidal activity against the tested fungi, except for *Penicillium citrinum*, *P. viridicatum* and *Aspergillus niger* (MFC >20 µl/ml). The present study presents a great interest for the food industry because it proposes the use of *A. campestris* essential oil as biofungicide in order to reduce dependence on synthetic fungicides and ensure better agricultural production.

Key words: *Artemisia campestris*; Essential oil; Chemical composition; Antifungal activity.

« تحديد النشاط المضاد للفطريات للزيت *Artemisia campestris* »

يعتبر الشبج الحقلية (*Artemisia campestris*) مصدر غني بالمركبات الفينولية ومستخلصاته و للميكروبات. لهذا دراسة التركيبية الكيميائية مع تحديد التأثير للفطريات للزيت الشبج الحقلية. كان مردود الزيت 0.71%. التحليل الكغوماتوقغافي للزيت سمح بتحديد 42 مركب حيث : -بينين (18.65%) -بينين (16.78%) -ميرسين (17.34%) جيرمسين (10.34%) هي . النشاط المضاد للفطريات لزيت الشبج الحقلية *Fusarium graminearum* هي حساسية للزيت بتركيز 1.25 µl/ml (v/v). الزيت لديه أيضا نشاط قوي ضد الفطريات المختبرة باستثناء *Penicillium Aspergillus niger*, *P. viridicatum citrinum*, (CMF>20 µl/ml). تعد هذه الدراسة أهمية كبيرة للصناعة الغذائية, لأنها تقترح استخدام الزيت للشبج كمضاد حيوي لتقليل مبيدات الفطريات الصناعية للمحاصيل الزراعية .

ية : *Artemisia campestris* , زيت الاساسي, تركيبة يمينية, للفطريات.

SOMMAIRE

RÉSUMÉ

LISTE DES ABRÉVIATIONS	I
-------------------------------------	----------

LISTE DES TABLEAUX.....	II
--------------------------------	-----------

LISTE DES FIGURES.....	III
-------------------------------	------------

INTRODUCTION.....	1
--------------------------	----------

PARTIE I : SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE

1. LA PLANTE <i>Artemisia campestris</i>	3
1.1. Généralités.....	3
1.2. Description botanique.....	3
1.3. Systématique de la plante.....	4
1.4. Origine et distribution.....	4
1.5. Domaine d'utilisation.....	4
1.6. Composition chimique	5
1.7. Activités biologiques.....	6
1.7.1. Activité antioxydante.....	6
1.7.2. Activité antibactérienne.....	6
1.7.3. Activité hypoglycémiante.....	7
1.7.4. Effets antipoison.....	7
2. LES CHAMPIGNONS.....	8
2.1. Généralité.....	8
2.2. Les champignons phyto-pathogènes.....	8

2.2.1. Les champignons de céréales	8
2.2.2. Autres végétaux.....	9
2.3 Effet néfaste.....	9
2.3.1 Maladies fongiques	9
2.3.2. Sécrétion des mycotoxines	10
2.3.3. Contamination de la chaîne alimentaire	11
2.4. Les facteurs de développement des champignons	13
2.4.1. Température et humidité	14
2.4.2 Les vecteurs	14
2.4.3. Etat des grains	15
2.4.4. Atmosphère de lot de stockage	15
3. LA LUTTE CONTRE LES MOISSURES PHYTOPATHOGENES.....	16
3.1. Traitement chimique.....	16
3.2. Traitement physique	16
3.3. La lutte biologique	17

PARTIE II : MATÉRIÉLS ET MÉTHODE

1. MATÉRIÉLS ET MÉTHODE	20
1.1. Matériel végétal.....	20
1.1.1. Récolte du matériel végétal.....	20
1.1.2. Procédé d'extraction des huiles essentielles	20
1.1.3. Calcule du rendement.....	21
1.1.4. Détermination de la composition chimique d'huile essentielle	21
1.2. Matériel fongique	21
1.3. L'étude de l'activité antifongique	22
1.3.1. Préparation des dilutions de l'huile essentielle	22
1.3.2. Préparations des tubes CMI de l'huile essentielle	23
1.3.3. Préparation des suspensions fongiques	24
1.3.4. Inoculation des tubes CMI	25
1.3.5. Incubation et lecture	25

1.3.6. Détermination de la CMF.....	26
-------------------------------------	----

PARTIE III : RÉSULTATS ET DISCUSSION

1. RÉSULTATS.....	27
1.1. Rendement et composition chimique.....	27
1.2. Activité antifongique d'huile essentielle.....	29
2. DISCUSSION.....	31
CONCLUSION.....	33
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	34
ANNEXES.....	41

LISTE DES ABRÉVIATIONS

AOC	Appellation d'Origine Contrôlée
CAS	Chemical Abstracts Service
CDF	Conservation des Forêts
CLSI	Clinical and Laboratory Standards
CMF	Concentration Minimal Fongicide
CMI	Concentration Minimal Inhibitrice
DMSO	Dimethylsulfoxyde
DO	Densité Optique
DSA	Direction des Services Agricole
FAO	Food and Agriculture Organisation
GC	Chromatographie Gazeux
IITA	International Institute of Tropical Agriculture
MOPS	[3-(N-morpholino)]-propanesulfonic acide
PDA	Patato Dextrose Agar
RPMI	Roswell Park Memorial Institute Medium
S M	Spectrométrie de Masse
SAB	Sabouraud Dextrose Agar

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1	La classification de la plante <i>Artemisia campestris</i>	4
Tableau 2	Les principales mycotoxines dans le monde.....	11
Tableau 3	Exemples de biopesticides développés pour le contrôle des ennemis et compétiteurs des plantes cultivées.....	17
Tableau 4	Les souches fongiques utilisées dans l'étude de l'activité antifongique de l'huile essentielle d' <i>Artemisia campestris</i>	22
Tableau 5	Composition chimique de l'huile essentielle de l' <i>Artemisia campestris</i>	28
Tableau 6	Activité antifongique (CMI, CMF) d'huile essentielle d' <i>Artemisia campestris</i>	29

LISTE DES FIGURES

Figure 1	<i>Artemisia campestris</i> (dgouft).....	3
Figure 2	Dispositif d'hydrodistillation.....	20
Figure 3	Les dilutions de l'agent antifongique insoluble dans l'eau.....	23
Figure 4	Préparation des tubes CMI de l'agent antifongique insoluble dans l'eau.....	24
Figure 5	Préparation des suspensions fongiques (inoculum) pour la méthode de macro-dilution en milieu liquide.....	25
Figure 6	Rendement en huile essentielle de la plante <i>Artemisia campestris</i>	27

INTRODUCTION

INTRODUCTION

Les moisissures constituent un agent de détérioration des produits agricoles. Ils diminuent la qualité technologique, et sanitaire (allergie, agents toxique responsable de graves intoxication humaine et animale : mycotoxine), réduisent la valeur nutritionnelle, modifiant l'aspect organoleptique et enfin provoquant des problèmes économique due aux couts de détoxification des grains ou le rejet des produits contaminés (Belyagoubie, 2006).

Les produits phytosanitaires, plus communément nommés "Pesticides", sont des sujets de discussion incontournables de la société actuelle. Si, auparavant, ces termes étaient associés à la maîtrise de la production agricole et la garantie de ressource alimentaire suffisante, ils sont désormais souvent associés, à tort ou à raison, à un problème de santé publique. En l'espace de quelques années, les pesticides sont en effet passés du rang de produits révolutionnaires et bienfaiteurs au rang de produits néfastes dont il faut se débarrasser.

La problématique « pesticides » est à la fois d'ordre environnemental avec la contamination de la faune et de la flore, elle est aussi d'ordre sanitaire. En effet, de par leurs propriétés toxiques, les pesticides représentent un réel danger pour l'homme lorsqu'ils ne sont pas utilisés dans des conditions appropriées (Fillatre, 2011).

Les fongicides chimiques ont certes permis l'amélioration des rendements en agriculture, cependant leur utilisation abusive a engendré à long terme l'apparition de phénomène de résistance, en plus de la pollution de l'environnement. De ce fait, beaucoup de ces fongicides deviennent inefficaces, voire obsolètes (Amri, 2014). De plus, la tendance actuelle des consommateurs à chercher une alimentation plus naturelle a incité la recherche, le développement et l'application de nouveaux produits naturels ayant des activités antimicrobiennes et antifongiques (Bouguerra, 2012).

Il est devenu très indispensable la recherche de molécules nouvelles en prenant en compte d'autres critères que l'efficacité. Cette recherche s'est orientée vers la lutte biologique par l'utilisation de substances naturelles antibactériennes et antifongiques pouvant constituer une solution alternative aux produits chimiques. La recherche continue de nouveaux produits antifongiques reste donc une nécessité à laquelle il faut répondre. L'orientation des recherches vers des "biofongicides" semble alors prometteuse ; la stratégie de développer de nouvelles molécules à partir de substances végétales peut ainsi

être intéressante. En effet, certains extraits végétaux (c'est-à-dire huile essentielle) sont pourvus d'activités antibiotiques importantes et ont un large spectre d'activités (Amri, 2014 et Laib, 2011).

En vue de la richesse de notre région en plantes médicinales et aromatiques, une étude approfondi de celles-ci s'impose dans le cadre de mettre en lumière une espèce proliférant dans notre région et qui elle a fait l'objet qu'une seul étude pour ces propriétés antifongiques, il s'agit de l'*Artemisia campestris*. C'est une plante vivace herbacée légèrement aromatique appartenant à la famille des *Asteraceae*, très répandue dans le sud Algérien, communément appelée "dgouft". Karabegovic et al. (2011) ont démontré que les huiles essentielles et les extraits de plusieurs *Artemisia* sp. possèdent de fortes activités antimicrobiennes. Les extraits hydro-éthanoliques et d'infusion d'*A. campestris* présentent des teneurs en polyphénols et en flavonoïdes très élevées (Akrouit et al, 2011).

Dans ce contexte, cette étude a pour objectif d'analyser la composition chimique de l'huile essentielle d'*Artemisia campestris*, afin de connaître ses composés actifs, et de déterminer *in vitro* l'effet antifongique de cette huile sur la croissance des champignons phytopathogènes. Ce travail propose également de prospecter et d'élargir ce spectre d'action antifongique sur des champignons nuisibles à l'agriculture tels que les espèces appartenant aux genres *Fusarium*, *Aspergillus* et *Penicillium*.

Le présent mémoire est structuré en trois parties. La première s'intéresse à une recherche bibliographique sur la plante *Artemisia campestris*, les champignons phytopathogènes et les différentes méthodes de lutte contre ces maladies fongiques. La deuxième partie aborde la méthodologie utilisée pour l'extraction et la détermination de la composition chimique de l'huile essentielle ainsi la méthode de macro-dilution en milieu liquide utilisée pour l'étude de l'activité antifongique, selon la norme internationale M38-A préconisée par CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute). La troisième partie discute les résultats obtenus, enfin nous achevons ce travail par une conclusion générale et des perspectives.

PARTIE I
SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE

1. LA PLANTE *Artemisia campestris*

1.1. Généralités

L'Algérie possède une flore végétale riche et diversifiée. Parmi les plantes médicinales qui constituent le couvert végétal, se trouve le genre *Artemisia*, ce dernier est largement distribué surtout dans les régions semi arides. De nombreuses espèces de ce genre sont utilisées en médecine traditionnelle parce qu'elles renferment plusieurs molécules douées d'activités thérapeutiques, parmi les espèces les plus connues se trouve *Artemisia campestris* (Akrouf et al, 2011).

Le genre *Artemisia* est un des plus importants de famille des Astéracées, il comporte plusieurs centaines d'espèces en grandes partie utilisées pour leurs propriétés médicinales par les pharmacopées locales (Ozand, 1977).

Les espèces qui appartiennent au genre *Artemisia* possèdent des propriétés thérapeutiques, elles sont non seulement utilisées dans la médecine traditionnelle, mais aussi dans l'industrie alimentaire et pharmaceutique (Mirjalili et al, 2007).

1.2. Description botanique

Artemisia campestris est un arbuste aromatique à tiges robustes, d'une hauteur de 30 à 80 cm. cette plante possède des capitules très petits, étroits (1 à 1,5 mm) ovoïdes ou coniques, à involucre scarieux, ne contient que 3 à 8 fleurs de couleur jaunâtre bordées de rouge, et à pédoncule muni de poils blanchâtres à brunâtre. Les feuilles d'*Artemisia campestris* sont glabres de couleur verte foncée, les inférieures bipinnatiséquées, les supérieures pinnatiséquées, les basales pétiolées et auriculées, les tiges sont ligneuses à la base striée (Ozenda, 1983 ; Quezel et Santa, 1962).



Figure 1. *Artemisia campestris* (dougout)
(Originale)

1.3. Systématique de la plante

Le tableau 1: La classification la plante *Artemisia campestris*

Règne: Plantae	Ordre: Asterales
Sous règne: Tracheobionta	Famille: Asteraceae
Embranchement: Spermatophyta	Sous famille: Asteroideae
Sous embranchement: Magnoliophyta	Tribu: Anthemideae
Classe: Magnoliopsida	Genre: <i>Artemisia</i>

Source: (Caratini ,1971)

1.4. Origine et distribution

Les espèces qui appartiennent au genre *Artemisia* sont des arbustes aromatiques, qui poussent de façon spontanée dans plusieurs régions de l'hémisphère nord de la terre, surtout dans les zones semi arides et le bassin méditerranéen, et s'étendent jusqu'à l'Himalaya. Dans l'hémisphère sud elles sont trouvées en Afrique du sud, l'Australie et l'Amérique du sud (Vernin et al, 1995). D'après Kyeong (2007), *Artemisia campestris* est originaire de l'Asie.

1.5. Domaine d'utilisation

De nombreuses espèces d'*Artemisia* ont été ou sont encore utilisées en médecine populaire (Philippe, 2014). Elles ont une caractéristique soit odeur ou saveur, sur la base de monoterpène, sesquiterpènes qui, dans de nombreux cas, sont les raisons de leur application en médecine populaire. Récemment, plusieurs tentatives ont été faites à la caractérisation mieux leurs véritables thérapeutique, et obtenir la production accrue de ces composés utilisés à partir de chimiotypes sélectionnés poussent dans un sol ou *in vitro* (Mucciaralli, 1995).

Artemisia campestris est une plante utilisée depuis longtemps dans la médecine traditionnelle pour traiter plusieurs maladies. En usage local, *Artemisia campestris* est utilisée pour traiter les troubles digestives, les ulcères, les douleurs menstruelles (Dob et al., 2005) et le diabète (Sefi et al, 2010). Elle est utilisée sèche, en onction, en friction, comme huile essentielle, en infusion ou en décoction (Gurib-Fakin, 2006).

La partie aérienne d'*A. campestris* est utilisée dans le traitement de brûlures, de la diarrhée, les morsures de serpents, les piqûres de scorpions, l'eczéma, la gastroentérite, la dysenterie, le rhumatisme. Elle est utilisée également pour traiter les infections urinaires,

la fièvre et la toux (Ben Sassi et *al.*, 2007). Selon Saoudi et *al.* (2010) la consommation journalière d'une décoction préparée à partir des tiges et feuilles d'*A. campestris* permet de réduire les symptômes digestifs.

Dans le nord Ouest de l'Italie, cette espèce est recueillie de façon active ou cultivés pour additionner comme un ingrédient important dans les boissons alcoolisées ainsi que dans des boissons amères. Cette espèce est utilisée également en parfumerie et dans une gamme d'applications alimentaires qui comprennent les soupes, les sauces et les salades (Mucciaralli, 1995).

1.6. Composition chimique

L'utilisation des solvants à polarité différente, suivie par des étapes de fractionnements et l'emploi de différentes techniques de chromatographie permettent d'extraire, séparer et identifier les différents composés présents dans les extraits de plantes (Boudjouref Mourad 2010).

Le contenu phénolique total, les flavonoïdes, les dérivés hydroxycinnamiques, les dérivés hydrox benzoïques de l'extrait éthanolique (80%) de la partie aérienne d'*Artemisia campestris* ont été déterminés par des méthodes spectrophotométriques (Boudjouref Mourad 2010). Les flavonoïdes identifiés chez *Artemisia campestris* sont: flavone (apégénine), flavonol (kaempférol 7-méthyle), flavanone (naringénine), dihydroflavonols (taxifoline-7-méthyle) (Valant et *al.*, 2003). Les feuilles d'*Artemisia campestris* contiennent aussi des alcaloïdes, des saponines (Naili et *al.*, 2010).

La composition de l'huile essentielle obtenue par hydrodistillation des parties aériennes de plusieurs populations d'*A. campestris* L. (Asteraceae), recueillies auprès de quatre zones du sud-est de la Tunisie (Ben Gardane, Bekdache, Djerba et Tataouine), a été analysé par GC -MLLE. Treize à quinze composants étaient identifiés dans chaque échantillon, ce qui représente plus de 95% de la quantité totale de pétrole. Tous les échantillons ont été dominées par la présence de α -pinène (de 24,2 à 27,9%), le p-cymène (de 17,4 à 22,3%) et β -pinène (de 4,1 à 11,0%), représentant plus de 45% de la quantité totale de pétrole. La répartition des autres composants dans les différents extraits a été qualitativement et quantitativement irrégulière. La variabilité de la composition peut être attribuée aux conditions climatiques et géographiques entre les régions (Akrouf, 2001).

1.7. Activités biologiques

En plus de leurs utilisations traditionnelles, *Artemisia campestris* possède de nombreuses propriétés biologiques, parmi lesquelles on cite les plus importantes (Boudjouref, 2010).

1.7.1. Activité antioxydante

Akrouf et al (2011) ont étudié l'activité antioxydante de trois extraits de la partie aérienne d'*Artemisia campestris* (huile essentielle, extrait aqueux, extrait éthanolique 50%) en utilisant trois méthodes différentes: la méthode de DPPH, la technique de décoloration du β -carotène et la méthode d'ABTS (2,2 azinobis-3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid), ils ont trouvé que l'huile d'*A. campestris* possède une faible activité antioxydante, alors que les extraits aqueux et organique montrent une activité antioxydante importante en comparaison à celle de l'huile essentielle.

1.7.2. Activité antibactérienne

Artemisia campestris est une plante médicinale utilisée dans le traitement de nombreuses infections telles que les infections urinaire. Naili et al (2010) ont testé l'activité antibactérienne de l'extrait méthanolique des feuilles d'*A. campestris*, ils ont trouvé que l'activité de cet extrait a été plus efficace contre les bactéries gram positif (*Staphylococcus aureus*) que les bactéries gram négatif (*Escherichia coli*). Ben Sassi et al (2007) ont étudié l'activité antibactérienne de quatre extraits organiques (méthanol, acétate éthyle, acétone, chloroforme) de 23 plantes médicinales dont *A. campestris* contre 14 bactéries gram positif et gram négatif. Les résultats ont montré que l'extrait d'acétone est le seul qui montre une action inhibitrice contre les trois types de bactéries testées: *Staphylococcus epidermidis*, *S. saprophiticus* et *S. aureus*.

L'extrait méthanolique de feuilles *A. campestris* exerce une activité antibactérienne seulement contre les bactéries Gram positif, sans effets antagonistes contre des espèces bactériennes à Gram négatif. Les concentrations minimales inhibitrices contre *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Salmonella typhi* étaient de 12,5, 12,5, 250, 500 et 250 μ g / ml, respectivement (Bnouham et al, 2002).

1.7.3. Activité hypoglycémiant

Sefi et *al* (2010) ont trouvé que l'extrait aqueux des feuilles d'*A. campestris* diminue le taux de glucose dans le plasma des rats chez lesquels le diabète est induit par l'alloxane monohydrate. Ils ont trouvé également que la diminution de la concentration de glucose s'accompagne d'une part d'une diminution des taux de triglycérides et des lipoprotéines de faibles densité, et d'autre part d'une augmentation du niveau de l'insuline, ce qui peut prévenir les complications du diabète.

1.8.4. Effets antipoison

Les extraits d'acétate d'éthyle, éthanol, méthanol et de dichlorométhane, des feuilles d'*A. campestris* ont été testés pour ses capacités de neutralisation de venin de scorpion et de vipère. Les résultats obtenus ont montré que l'extrait éthanolique inhibe l'activité de dégradation des globules rouges contre le venin du scorpion *Androctonus australis garzonii*. Des résultats similaires ont été obtenus pour l'extrait de dichlorométhane pour la neutralisation de venin de la vipère *Macrovipera lebetina* (Memmi et *al*, 2007).

Les feuilles bouillies d'*A. campestris* (Asteraceae) ont été utilisées comme une médecine populaire contre l'envenimation ophidien et scorpion dans les populations rurales et nomades, mais ses véritables mécanismes sont encore inconnus. Il n'a été conclu que l'extrait aqueux de feuilles d'*A. campestris* empêche la phase hypertensive induite par le venin de scorpion, probablement par voie adrénergique (Ben Nasr et *al*, 2014).

2. LES CHAMPIGNONS

2.1. Généralité

Les champignons supérieurs, moisissure et levures sont des végétaux dépourvus des chlorophylles, libérant dans l'atmosphère de grande quantité de spores allergéniques. Largement répandus dans la nature provenant de matières organiques en cours de putréfaction ou de fermentation (Pascale et Johon, 2005). Plus de 70000 espèces de champignons ont été identifiées jusqu'à présent, et 17000 nouvelles espèces environ sont découvertes chaque année. Les mycologues les plus conservateurs estiment que le nombre total d'espèces dépasse 1.5 millions, ce qui situe, à ce point de vue, les champignons en seconde position après les insectes (Hamilton et *al*, 1999). Ils ont de ce fait développé trois systèmes de nutrition : saprophytisme, qui consiste à dégrader la matière morte et s'en nourrir; la symbiose, une association où deux êtres vivants tirent chacun à partir de l'autre, et enfin, le parasitisme, où ils vivent aux dépens d'autre être vivant, végétale ou animal. Ils sont responsables des maladies de la peau appelée mycose. Chez les végétaux, ils provoquent diverses maladies dites « cryptogamies » (Lamaison et Polese, 2005).

2.2. Les champignons phyto-pathogènes

2.2.1. Les champignons de céréales

- Les champignons de champs

Dans le champ, les céréales sont principalement attaquées par les moisissures qui ont besoin pour leur croissance d'un facteur d'humidité élevé (de 0.88 au moins) tandis que pendant le stockage, les moisissures qui se développent supportent des degrés d'humidité moindres (FAO, 2003). Les céréales sont contaminées dès avant la récolte par une mycoflore dite du « champ » qui comprend un grand nombre d'espèces appartenant aux genres, *Alternaria*, *Cheatomium*, *Cladosporium*, *Epicoccum*, *Fusarium*, *Helminthosporium* ...etc (Belyagoubie, 2006). Les *Fusarium* sp, peuvent infecter les céréales à paille et le maïs. Ces champignons produisent des mycotoxines notamment au niveau de l'épi au champ (Fabrice et Calair, 2006).

- Les champignons de stockage

Les principaux groupes de champignons susceptibles de se développer pendant l'entreposage sont les *Aspergillus* et les *Penicillium* (Aliou et Jan, 1991 ; FAO, 1995). Aux

fortes teneurs en humidité, les *Fusarium* (champignon des plantes en plein champ) peuvent apparaître sur des céréales alimentaires en magasin (Aliou et Jan, 1991). Lors de la période de stockage, les *Fusarium*, très répandus dans le sol, ont des besoins en eau assez importants et ils fréquentent sur les cultures aux champs. Ce n'est pas le cas d'*Aspergillus* et *Penicillium* qui croissent plutôt sur les denrées stockées (Zaid et Pierre, 2011). Les moisissures peuvent se développer rapidement sur les céréales et les maïs conservés dans des conditions humides. La microflore du blé, à la récolte, est composée d'un très grand nombre de genre de moisissures (*Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*) (Armand et Germain, 1992).

2.2.2. Autres végétaux

Les moisissures sont fréquemment retrouvées dans les céréales, mais elles peuvent aussi se développer sur d'autres végétaux destinés à l'alimentation humaine ou animale (légumes, fruits). En 2003-2004 en Lituanie, (Lugauskas et al, 2005) ont analysé la contamination mycologique de légumes nouvellement récoltés puis après stockage. Le but de l'étude était de détecter des espèces fongiques capables de synthétiser les métabolites toxiques. Des échantillons de carottes, d'oignons et de choux ont été prélevés dans des entrepôts. *Penicillium expansum*, *P. nalgiovense* et *P. verrucosum* ont été retrouvés sur les carottes, *P. expansum* sur les oignons et *Aspergillus niger*, *Botrytis cinerea*, *Penicillium funiculosum* et *P. expansum* sur les choux. La fréquence de contamination des légumes était importante (Lugauskas et al, 2005).

2.3. Effet néfaste

2.3.1. Maladies fongiques

La pourriture racinaire, la pourriture de pied et la pourriture commune, sont des noms qui se rapportent à une même maladie d'origine fongique (*Fusarium culmorum*, *Fusarium graminearum*, *Fusarium avenaceum*, *Cochlibolus sativus*) et qui peut affecter le blé et l'orge. La pourriture racinaire est répandue dans toutes les régions du Maghreb. Des réductions en rendement de grain, en poids de grains, en émergence des plantules, en nombre de talles et d'épis, sont souvent rapportées (Sayoud et al, 1999).

La maladie striée causé par (*Helminthosporium gramineum*, *Pyrenophora graminea*) étant une maladie transmise uniquement par la semence, elle est là, où la désinfection de la semence ne se fait pas. Elle est d'incidence négligeable au Maroc et en Tunisie, alors qu'en

Algérie est considérée comme la maladie des céréales la plus répandue avec une incidence atteignant les 80%. C'est une maladie très destructive du fait que les plantes infestées ne produisent quasiment aucune graine (Sayoud et *al*, 1999).

2.3.2. Sécrétion des mycotoxines

Mycotoxines, mot formé à partir de mycose, qui veut dire champignon en grec, et de toxium, poison (Zaid et Pierre, 2011). Le terme mycotoxine est utilisé pour désigner les toxines produites par les champignons microscopiques (Henri, 1992). Ce sont des substances élaborées par des champignons dont la toxicité ne s'exerce sur la plante hôte, mais sur les consommateurs (Royer, 1990). La production de mycotoxines est directement liée à la croissance fongique. Par conséquent, les facteurs capables d'influencer la croissance fongique vont aussi jouer un rôle sur la toxino-génèse. De manière générale, les conditions environnementales nécessaires à la production de mycotoxines sont plus étroites que celles permettant la croissance fongique et sont, le plus souvent, proches des conditions optimales de développement de l'espèce considérée (Tabuc, 2007).

En générale, les mycotoxines transférées dans la chaîne alimentaire sont en quantité très faibles, de l'ordre du nanogramme par kilogramme (ng/kg) (Zaid et Pierre, 2011). On distingue deux types d'accidents : les accidents aigus font suites à l'ingestion d'une grande quantité de mycotoxines et une maladie chronique qui fait généralement suit à l'ingestion de mycotoxine en faible quantité mais sur une long période, cette chronique provoque un affaiblissement du système immunitaire (Gury P, 1997), à des effets délétères sur le système nerveux central, l'appareil cardiovasculaire et l'appareil respiratoire, ainsi que sur l'appareil digestif. Elles peuvent aussi avoir des effets cancérigènes, mutagènes, tératogènes et immunosuppresseurs (FAO, 2003). Le Tableau suivant (Tableau 1) représente les principales mycotoxines dans le monde.

Tableau 2. Les principales mycotoxines dans le monde

Espèce de moisissure	Mycotoxines engendrées	Les denrées
<i>Aspergillus parasiticus</i>	Aflatoxines B1, B2, G1, G2	Oléagineux, pastiches, épices, maïs, sorgho, grains de coton,
<i>Aspergillus flavus</i>	Aflatoxines B1, B2	Oléagineux, pastiches, épices, maïs, sorgho, grains de coton,
<i>Fusarium sporotrichioides</i> <i>F. poae</i> , <i>F. tricinctus</i>	Trichothécenes (Toxine T-2, DON...)	Blé, Orge, maïs, riz, seigle, avoine
<i>Fusarium graminearum</i>	Déoxynivalénol (ou nivalénol), Zéaralénone Trichothécenes (Toxine T-2, DON...)	Blé, Orge, maïs, riz, seigle, avoine
<i>Fusarium moniliforme</i> (<i>F. verticillioides</i>)	Fumonisine B1	Blé, Orge, maïs, riz, seigle, avoine
<i>Fusarium culmorum</i> <i>Fusarium crookwellense</i>	Zéaralénone Trichothécenes (Toxine T-2, DON...)	Blé, Orge, maïs, riz, seigle, avoine
<i>Aspergillus niger</i>	Ochratoxine A Fumonisine B2	Oléagineux, pastiches, épices, maïs, sorgho, grains de coton,
<i>Penicillium verrucosum</i> <i>Aspergillus ochraceus</i> <i>Aspergillus carbonarius</i>	Ochratoxine A	Oléagineux, pastiches, épices, sorgho, céréales, café.
<i>Claviceps</i>	Alcaloïdes de l'ergot	Blé et dérivés, seigle
<i>Pithomyces bakeri</i> (<i>Sporidesmium</i>)	Sporidesmine	Divers graminées
<i>Acremonium</i> sp.	Une neurotoxine	Riz et autres céréales
<i>Penicillium islandicum</i>	Lutéoskyrine	Riz et autres céréales
<i>Alternaria</i>	Alternariol, acide tenuazonique	Fruits (pomme et tomate) et légumes.
<i>P. expansum</i> , <i>A. clavatus</i> ,	Patuline	

Source : (Royer, 1990. Keon et proost, 2002 FAO, 2003. Guy, V2007. Christine.2010. Zaid et Pierre 2011,)

2.3.3. Contamination de la chaîne alimentaire

Les moisissures sont des microorganismes ubiquistes qui peuvent se développer sur une grande variété de substrats. Les espèces de moisissures les plus fréquentes retrouvées dans les aliments appartiennent aux genres *Aspergillus*, *Penicillium* et *Fusarium*. Ces moisissures peuvent proliférer et produire des mycotoxines avant ou après la récolte, pendant le stockage, le transport, ou la transformation des matières premières et des aliments (Tabuc, 2007).

- Contamination de céréales et produits végétaux

Les céréales sont sans doute les denrées alimentaires les plus fréquemment contaminées par les moisissures. La contamination peut avoir lieu avant la récolte, au champ, au cours du séchage, du stockage et après transformation des graines. Si de très

nombreuses études sont disponibles concernant la contamination mycotoxique des céréales, les enquêtes sur la contamination fongique de ces matières premières sont plus rares. De manière schématique, elles mettent en évidence une relation entre la flore fongique et les conditions climatiques pendant le développement et/ou le stockage des grains. (Tabuc, 2007)

- Aliments composés pour les animaux

Les aliments composés peuvent être contaminés par les spores qui étaient initialement présentes dans les céréales ou dans les autres ingrédients (oléagineux) qui entrent dans leur composition. Ils peuvent aussi être contaminés au cours du processus de fabrication ou pendant le stockage. Les espèces de moisissures les plus fréquemment retrouvées dans les aliments composés appartiennent aux mêmes genres que ceux contaminant les céréales : *Aspergillus*, *Penicillium* et *Fusarium*. Les études disponibles concernant l'évaluation du niveau de contamination fongique des aliments pour animaux concernent en général les aliments composés pour animaux monogastriques (volailles, porcs...) qui sont plus sensibles à l'action des mycotoxines que les ruminants. Malgré un processus technologique permettant souvent la réduction de la contamination fongique à cause de l'élévation de température (pendant la granulation par exemple), les résultats disponibles montrent souvent une contamination fréquente par de nombreuses espèces fongiques (Tabuc, 2007).

- Produits alimentaires à base de céréales

Les céréales représentent une matière première importante pour l'alimentation. Elles sont transformées en farines à partir desquelles sont élaborés de nombreux aliments finis comme produits issus de la panification, de la biscuiterie, les céréales pour le petit déjeuner, les gâteaux... Ces produits, comme les aliments composés pour les animaux, peuvent être contaminés soit par les spores qui se trouvent initialement dans les céréales, soit plus tard, pendant le stockage. Les principales espèces de moisissures qui les contaminent appartiennent toujours aux genres *Aspergillus*, *Penicillium* et *Fusarium*. Les données concernant la contamination fongique de produits alimentaires à base de céréales ne sont pas nombreuses. En effet, les recherches sont, en général, orientées directement vers l'analyse de la présence de mycotoxines dans ces produits. De plus, la nature des procédés de fabrication implique souvent la réalisation de traitements thermiques suffisants pour détruire les spores fongiques présentes. Il peut néanmoins se poser la question de

recontamination de ces produits après le traitement thermique et le développement des moisissures pendant le stockage (Tabuc, 2007).

- Produits affinés d'origine animale

Les moisissures participent directement au processus de fabrication de nombreux aliments transformés d'origine animale. Ainsi, il s'agit d'auxiliaires de fabrication indispensable à la fabrication fromagère ainsi qu'à l'acquisition des qualités organoleptiques des produits de salaison sèche. Par conséquent, ces aliments représentent, par définition, un substrat favorable au développement fongique et posent donc un double problème en termes de santé publique : l'innocuité des souches fongiques utilisées en tant que ferment (absence de pouvoir toxigène notamment), et le développement possible d'une flore contaminante potentiellement capable d'altérer le produit et/ou de produire des métabolites toxiques (Tabuc, 2007).

En effet, le lait est, en général, peu contaminé. Les conditions de pasteurisation et/ou stérilisation, de conditionnement et de stockage ne permettent pas de contaminations ultérieures. Les produits laitiers comme les yaourts ou les fromages sont, eux, beaucoup plus sensibles aux contaminations fongiques (Tabuc, 2007).

2.4. Les facteurs de développement des champignons

Les moisissures sont des microorganismes hétérotrophes: elles peuvent se développer seulement si le milieu lui apporte les éléments nutritifs nécessaires. La paroi rigide de la cellule fongique l'empêche de phagocyter les substances nutritives complexes du milieu; la moisissure est obligée les transformer préalablement en molécules simples absorbables. Ceci est rendu possible grâce à des dépolymérases qui sont excrétées dans l'environnement. Sous leurs actions les polymères complexes sont transformés en molécules simples (monosaccharides, acides gras, acides aminés) (Tabuc, 2007).

Comme tout micro-organisme, la croissance fongique est aussi dépendante d'un certain nombre de paramètres intrinsèques et extrinsèques du milieu. Les facteurs qui contribuent au premier chef à la biodétérioration (dont fait partie le développement de moisissures) d'un écosystème sont l'humidité, la température et les ravageurs (FAO, 2003). Par conséquent, les moisissures sont des microorganismes ubiquistes, peu exigeants quant à leur environnement et capables de se développer dans une large gamme de conditions environnementales et sur de nombreux substrats. Le développement incontrôlé de ces

contaminants peut entraîner une altération de l'aspect des aliments et en modifier la qualité organoleptique. Dans certaines conditions, ce développement fongique peut aussi conduire à la production et à l'accumulation dans les aliments de métabolites secondaires zootoxiques: les mycotoxines (Tabuc, 2007).

2.4.1. Température et humidité

Le développement de moisissures dépend de plusieurs facteurs : l'humidité, la température et la présence de spores et d'éléments nutritives. La température et l'humidité conditionnent leurs proliférations, il est généralement admis que, à température ambiante, les moisissures ne peuvent proliférer que si l'humidité relative locale dépasse 80% pendant plusieurs semaines. L'humidité relative locale dépend de l'humidité absolue de l'air intérieur et de la température locale (Claude, 2004). Les moisissures se développent le mieux dans une atmosphère chaude et humide. Elles se développent même à basse température si l'humidité relative de l'air est élevée, c'est-à-dire si l'air contient beaucoup de vapeur d'eau. Une atmosphère sèche prévient la germination des spores et par conséquent le développement de moisissures. Cependant, elle ne tue pas les spores qui sont très résistante aux conditions sèches (Inge, 2004). La prolifération des moisissures dépend de la teneur en eau des grains, de leurs températures et de l'importance des dommages physiques qu'ils causent. Dans certaines circonstances, le développement de mycotoxines peut constituer un danger particulier (FAO, 1995). L'humidité et la température favorisent le développement des moisissures sécrétant des mycotoxines qui constituent actuellement un problème de santé public (Abdoulaye, 2012).

Dans les céréales, les moisissures utilisent la vapeur d'eau présente dans les interstices entre les grains dont la concentration est déterminée par l'équilibre entre l'eau libre contenue dans le grain (la teneur en eau du grain) et l'eau présente sous forme de vapeur autour du grain. La concentration de l'eau interstitielle est désignée soit par les termes d'humidité relative d'équilibre (exprimée en pourcentage), soit par ceux de facteur d'humidité (FAO, 2003).

2.4.2. Les vecteurs

Les petits vertébrés sont de grave cause d'altération par la consommation qui font des denrées par les souillures et contamination microbiologiques diverses dont ils sont les vecteurs. Les rats et les souris peuvent provoquer des dégâts considérables, non seulement

par les pertes en grains consommés mais surtout par la contamination microbienne et par leurs activités biologiques qui produisent des déchets (fines farines) et dégagements de chaleur et de vapeur d'eau. Les moisissures se disséminent par l'intermédiaire de leurs spores transportées par l'air ou véhiculées par les insectes. Les mycotoxines se concentrent volontiers dans ces spores, contaminants l'air respirable, adsorbées sur des particules organiques ou par la poussière (Pierre, 2000 ; Zaid et Pierre, 2011). Enfin, les moisissures peuvent servir de nourriture pour les insectes et les mites, mais, dans certains cas, être pour eux des agents pathogènes (FAO, 2003).

2.4.3. Etat des grains

L'autre facteur susceptible d'influer sensiblement sur le développement des moisissures est la proportion de grains brisés se trouvant dans un lot de céréales. Ces grains, endommagés par la moisissure ou les insectes (FAO, 2003), et les différents impuretés (poussières, farines, pailles) et les grains briser sont plus facilement attaqués par les moisissures et les insectes et constitue pour les stocks des foyers d'infestation privilégiés (Aliou et Cruz, 1989).

2.4.4. Atmosphère de lot de stockage

Le développement des moisissures est aussi en fonction des proportions d'oxygène, d'azote et de dioxyde de carbone présent dans l'atmosphère interstitielle. De nombreux champignons se développent malgré des teneurs très faibles en oxygène; la croissance linéaire n'est divisée par deux, par exemple, lorsque la teneur en oxygène est réduite à moins de 0,14%. Les interactions entre les gaz et l'humidité influencent également le développement des moisissures (FAO, 2003). Les moisissures sont des organismes vivants qui ont besoin d'oxygène pour se développer. La faible teneur en oxygène peut stopper le développement des moisissures mais l'absence de l'oxygène permet en outre, de bloquer la respiration du grain lui-même et donc sa dégradation interne (Aliou et Cruz, 1989).

3. LA LUTTE CONTRE LES CHAMPIGNONS PHYTOPATHOGENES

3.1. Traitement chimique

La lutte contre les champignons pathogènes a été menée avec le soufre et de divers sels de cuivre. Les fongicides organiques développés en deuxième moitié du XX^{ème} siècle sont nombreux et appartiennent à diverses familles chimiques, ce sont, par exemple, des composés hétérocycliques, des strobilurines, des stimulateurs de défense naturels...etc. signalons que le soufre et le cuivre restent encore d'excellents fongicides et sont toujours utilisés (Roaul et al, 2005). Les fumigants diffusent dans la masse des denrées et sont ensuite éliminés par aération. Le phosphore d'hydrogène est actuellement le plus utilisé, laissant peu de résidus (à la limite de la méthode de dosage), il est produit à partir de phosphore d'aluminiums ou de phosphore de magnésium et de la vapeur d'eau atmosphérique. Il est très toxique lors de sa manipulation. Deux mécanismes sont possibles pour le stockage en silos : la voie chaude qui crée un séchage, la voie froide plus nouvelle. Cette dernière présente de nombreux avantages au point de vue qualitatif, énergétique et économique (Vierling, 2008).

L'utilisation des produits chimiques pour le stockage des semences est très répandue, mais peut être évitée dans la plupart des cas. Les fongicides peuvent également faciliter le stockage, mais comptent sur un bon séchage (Harry, 2004). Les avantages de cette pratique sont liés à sa faible coût, à sa facilité de mise en œuvre et à la durée de la protection qui se prolonge plusieurs mois, jusqu'à ce que les niveaux de résidus encore actifs ne deviennent inférieurs au seuil pour les espèces ciblées (Bernard et al., 2000). Dans de nombreuses situations, l'utilisation de fongicide est inutile et accroît les risques de pollution d'environnement (Davide et Hervé, 2011).

3.2. Traitement physique

En phytopathologie, on retrouve moins de travaux scientifiques concernant la lutte physique, citant par exemple le traitement des semences de blé à l'aide de micro-ondes pour le contrôle de *Fusarium graminearum*. Les usages de la lutte physique en post-récolte sont développés à travers les procédés de contrôle des conditions physiques dans les masses de grains stockées (la température, la teneur en eau, les chocs thermiques ou mécaniques (Bernard et al 2000).

Contrairement à l'opinion de l'agriculteur, le stockage de la semence commence depuis la maturité physiologique (au champ), qui est lorsque la semence atteint son potentiel physiologique maximale (germination et vigueur) et sa meilleure concentration de matière sèche mais ce n'est pas lorsque la semence est gardée dans un local ou un sac (Guillermo, 2004). Une basse teneur en humidité est la clé d'une conservation sans risque. Il n'est difficile de sécher suffisamment les grains en vue de prévenir la croissance des champignons et de bactéries. La teneur en humidité requise peut être atteinte par le séchage dans le champ ainsi que le séchage artificiel. Une teneur en humidité de 13-15% offre assez de protection contre les principales maladies fongiques (Harry, 2004).

3.3. La lutte biologique

La lutte biologique contre les agents pathogènes des plantes est définie comme l'utilisation de processus biologiques pour diminuer la densité d'inoculum des agents pathogènes dans le but de réduire leur capacité à induire la maladie. Les principaux critères de sélection d'un agent de lutte biologique contre des agent pathogènes des plantes sont : la stabilité génétique de la souche, son efficacité à faible concentration et le grand nombre d'agent pathogènes, ses faibles exigences nutritionnelles, sa capacité d'adaptation et de suivre aux conditions environnementale, la possibilité de production de masse à faible cout, son absence de toxicité sur d'autres organismes, sa résistance aux pesticides et sa compatibilité avec d'autre traitement (cf. tableau n° 3) (Lydide, 2010).

Tableau 3. Exemples de biopesticides développés pour le contrôle des ennemis et compétiteurs des plantes cultivées.

Bactéries entomopathogènes	<i>Bacillus thuringiensis</i>
Mycopesticides	<i>Metarhizium anisopliae</i> et <i>M. flavoviride</i> <i>Beauveria bassiana</i> , <i>B. brognardii</i> , etc.
Virus entomopathogènes	Baculovirus (carpovirusine)
Bioherbicides	<i>Colletotrichum</i> sp (Waage, 1995)
Microorganismes antagonistes de maladies	<i>Trichoderma viridae</i> ; <i>Gliocladium</i> sp ; <i>Pseudomonas</i> sp.
Nématodes entomopathogènes	genres <i>Steinernema</i> et <i>Heterorabditis</i>

Source (Vincent et al, 2000)

En pratique, l'application de la lutte biologique repose souvent sur une multitude d'actions et d'informations complexes et fines. La lutte biologique est séduisante sur le plan scientifique et écologique et son image plaît au grand public. On distingue plusieurs stratégies d'application en lutte biologique. La première stratégie, l'exploitation de

biocides inertes, est l'approche « biopesticide ». La seconde stratégie est l'exploitation de biocides autonomes, que l'on peut relâcher selon une stratégie de lutte classique, inoculative ou inondative. Il est également possible de favoriser la lutte biologique en intervenant sur le milieu. La variation entre les organismes est une caractéristique inhérente et fondamentale des organismes biologiques et constitue une des limites importante de la lutte biologique (Vincent *et al.*, 2000). Parmi les méthodes de lutte biologique, les biopesticides occupent une place de choix car ils se prêtent souvent à la production de masse requise pour l'industrie et ils s'appliquent avec un pulvérisateur conventionnel ce qui en facilite l'adoption par les producteurs agricoles (cf. tableau n°2). Ils sont généralement compatibles avec des méthodes de lutte biologique, même s'ils peuvent avoir des effets néfastes sur les organismes utiles (Giroux *et al.*, 1994 ; Roger *et al.*, 1995). Les biopesticides peuvent être à base de bactéries, champignons, virus, nématodes et d'extraits de plantes. Il y a plusieurs façons d'améliorer l'efficacité des biopesticides. On peut trouver des souches plus virulentes. On peut aussi travailler à des formulations prolongeant la rémanence au champ ou incorporant des produits synergistes qui, étant eux-mêmes non toxiques aux doses utilisées, augmentent de beaucoup l'effet toxique du biopesticide (Bernard et Philogène, 1993). Certains champignons hyperparasites d'agents pathogènes font également l'objet de recherches intensives : *Ampelomyces quisqualis*, *Tilletiopsis*, *Verticillium lecanii* et *Stephanoascus*, pour ne citer que les plus répandus. Des mutants résistants à la sécheresse sont également recherchés pour favoriser l'action de ces hyperparasites sur les champignons pathogènes. Les réductions de l'usage des fongicides peuvent être de l'ordre de 50 % sachant qu'il est impossible de concevoir la lutte contre les mycopathogènes de la vigne par exemple avec moins de 5 à 8 applications de fongicide dans la phase de végétation de la plante (Vincent *et al.*, 2000).

Récemment, des études fondamentales (*in vitro*) ont également montré que la phase volatile des huiles essentielles (alcools et lactones sesquiterpiniques) provoque un effet fongistatique par inhibition de croissance, ce qui permettrait le contrôle de la prolifération et surtout de dissémination des champignons opportunistes allergisants. On pourrait alors envisager une utilisation préventive d'huile de l'atmosphère des locaux (Daniel *et al.*, 2008).

- **Les huiles essentielles**

Un huile essentielle (ou essence) est un produit huileux ; volatil ; odorant ; que l'on retire des végétaux généralement par distillation. Toutes les plantes ne secrètent pas de huile essentielle ; certaines espèces contiennent vraiment des huiles essentielles ; d'autres n'en ne contiennent pas. Parfois huile essentielle est présent dans la plante entière ; parfois elle n'est présenté que dans une partie de la plante. De plus ; huile essentielle contenue dans les feuilles n'est pas forcément contenue dans les fruits de la même plante ; l'utilisation des huiles est donc complexe ; il faut bien connaître la plante et leurs propriétés (Laurence et Nathahie, 2009).

Les principales familles végétales susceptibles de donner des huiles essentielles sont : les abietacées (le plus connu est le *Pinus pinaster A.T*, qui produit la térébenthine), les cupressacées (thuya cyprés), les lamiacées qui est l'une des plus importantes familles pour les huiles essentielles (lavande, menthe, origan...), les myrtacées (eucalyptus, myrtes), les lauracées (cannelles, laurier de noble), les rutacées (citron, orange douce et amers...), les éricacées (gaulthérie et lédon), les astéracées (camomille, estragon, inule odorante, santoline), les poacées (le mon grasse, citronnelle), les rosacées (rose) (Homsy, 2009). Pour la même espèce, la composition varie selon le climat, de l'origine géographique, du mode de culture, de la saison, de la récolte, de la partie de la plante utilisée, des matériels et des techniques employées pour la préparation les huiles essentielles (Jean-Claude, 2002).

Les composés actifs, de même que l'équipement enzymatique à une plante, sont déterminés génétiquement et écologiquement, ils sont donc susceptibles de varier en fonction des conditions écologiques, pédologiques, climatiques, de l'altitude, de l'ensoleillement, du stade de développement botanique (période de récolte : avant ou après floraison), la biosynthèse s'oriente alors vers la formation préférentielle d'un constituant aromatique actif. Ces différences peuvent totalement changer les propriétés pharmacologiques d'huile essentielle. Ces différences chimiques (chimotype= type chimique), donc pharmacologique, doivent impérativement être prises en compte dans l'utilisation d'huile essentielle (Danielle et al, 2008).

PARTIE II
MATÉRIEL ET MÉTHODES

1. MATÉRIEL ET MÉTHODES

1.1. Matériel végétal

L'huile essentielle de la plante *Artemisia campestris* est utilisée comme un agent antifongique.

1.1.1. Récolte du matériel végétal

Les échantillons de la partie aérienne d'*A. campestris* ont été récoltés durant l'été 2013 dans la région de « Oued moura » Aflou (Laghouat). Le matériel végétal est séché à la température ambiante ($26 \pm 2^\circ\text{C}$) et à l'abri de la lumière dans un endroit sec et aérer pendant deux mois. Après le séchage, la plante est récupérée dans des sacs propres pour servir ultérieurement à l'extraction d'huile essentielle.

1.1.2. Procédé d'extraction d'huile essentielle

L'extraction de l'huile essentielle a été effectuée par hydrodistillation dans un appareil de type Clevenger. 150 grammes du matériel végétal sont mises dans un ballon à fond rond et additionnés à l'eau distillé (1500 ml), puis sont portés à l'ébullition pendant 4 h (Kalamouni, 2010). L'huile essentielle est alors entraînée par la vapeur d'eau. Elle est ensuite condensée en passant par le réfrigèrent. Le liquide recueilli résulte en un distillat avec une couche d'huile mince à la surface qui sera par la suite séparée, après repos du liquide. L'huile extraite est conservée à 4°C dans l'obscurité.

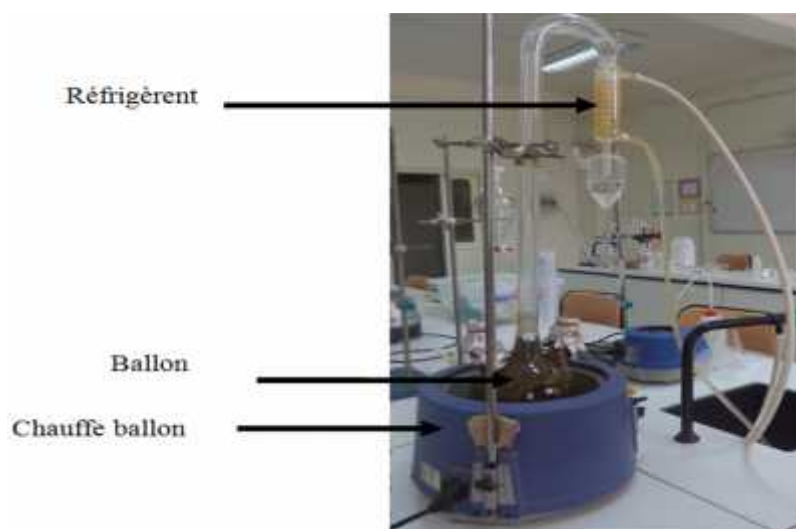


Figure 2. Dispositif d'hydrodistillation
(Originale)

1.1.3. Calcul du rendement

Le rendement en huile essentielle est défini comme étant le rapport entre la masse d'huile essentielle obtenue et la masse du matériel végétal à traité.

$Rd \% = (m_1 \times 100)/m_0$ m_0 : masse en gramme de la matière végétale sèche

m_1 : masse en gramme d'huile essentielle

Rd : Le rendement en huile essentielle.

1.1.4. Détermination de la composition chimique d'huile essentielle

Les échantillons de l'huile essentielle ont été envoyés au laboratoire de chimie analytique, Faculté des pêches, Université de Cukurova, Turquie, pour déterminer la composition chimique de l'huile sur la chromatographie en phase gazeuse (CG) couplée à la Spectrométrie de masse (SM) de type Perkin Elmer Clarus 500(CG - SM), équipé d'une colonne SGE (60 m. 0,25mm ID. BPX5 0,25um, USA). L'appareil comprend deux injecteurs capillaires améliorées, split/splitless (PSS) et sur colonne (POC). La température de la colonne est programmée de 60 à 250 °C pendant 10 min à raison d'une montée de 4 °C. La température d'injection est réglée à 240°C. Le gaz utilisé est l'hélium avec un débit de 1.5 ml/min. La fragmentation est effectuée par impact électronique à 70eV. La gamme de masse scannée est de 35-425 m/z. L'appareil est relié à un système informatique gérant une bibliothèque de spectre de masse Nist et Wiley. L'huile essentielle est diluée dans du n-hexane (1%, v/v) avant de procéder aux analyses CG/SM. Le volume injecté est 1 µl.

1.2. Matériel fongique

Le tableau 4 représente les dix champignons utilisés dans cette étude qui sont des souches fongiques responsables des dégâts considérables qu'ils causent aux cultures des céréales et des fruits et des légumes.

Tableau 4 : Les souches fongiques utilisées dans l'étude de l'activité antifongique de l'huile essentielle d'*Artemisia campestris*

Souches	Référence	Origine
<i>Fusarium graminearum</i>	MUCL 53452	Collection BCCM (Belgian Co-ordinated Collections of Micro-organisms)
<i>Fusarium moniliforme</i>	MUCL 53645	
<i>Penicillium citrinum</i>	MUCL 31475	
<i>Penicillium expansum</i>	MUCL 29192	
<i>Aspergillus ochraceus</i>	NRRL 3174	Collection ARS culture collection (NRRL)
<i>Aspergillus flavus</i>	NRRL 3251	
<i>Aspergillus parasiticus</i>	CBS 100926	Collection CBS culture collections of micro-organisms
<i>Aspergillus niger</i>	-	Isolées et partiellement identifiées au niveau du Laboratoire de phytopathologie-Département d'agronomie-Université de Laghouat
<i>Fusarium culmorum</i>	-	
<i>Penicillium viridicatum</i>	-	

1.3. L'étude de l'activité antifongique

1.3.1. Préparation des dilutions de l'huile essentielle

L'activité antifongique de l'huile essentielle d'*Artemisia campestris* a été évaluée selon la méthode de macro-dilution en milieu liquide M38-A préconisée par CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) (Espinel-Ingroff et Cantón, 2007). Les dilutions de l'agent antifongique insoluble dans l'eau sont préparées à l'aide d'un solvant de type DMSO (Sigma 34943). Il est important de préparer la solution mère et les dilutions de l'huile essentielle dans le solvant DMSO. Dix tubes ont été étiquetés de 2 à 11, puis des quantités appropriées de DMSO ont été ajoutées selon le protocole décrit ci-dessous (voir Figure 3). À partir de tube (2) qui représente la solution stock de l'huile essentielle (2000 µl/ml), des dilutions de l'huile ont été préparées selon le protocole décrit ci-dessous (voir Figure 3). Après agitation au vortex, un volume 1 ml a été constaté dans tous les tubes.

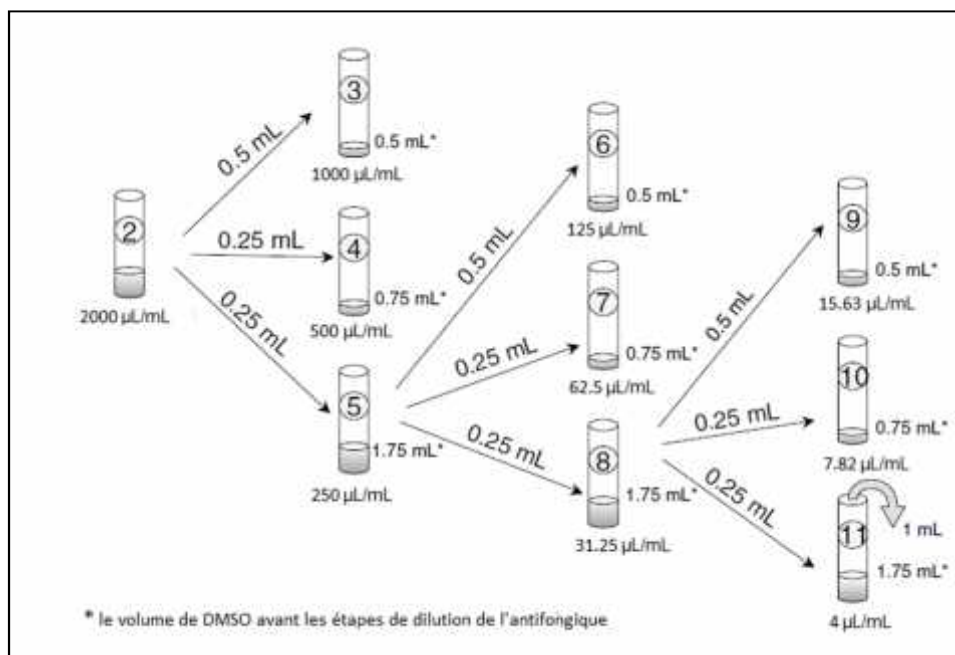
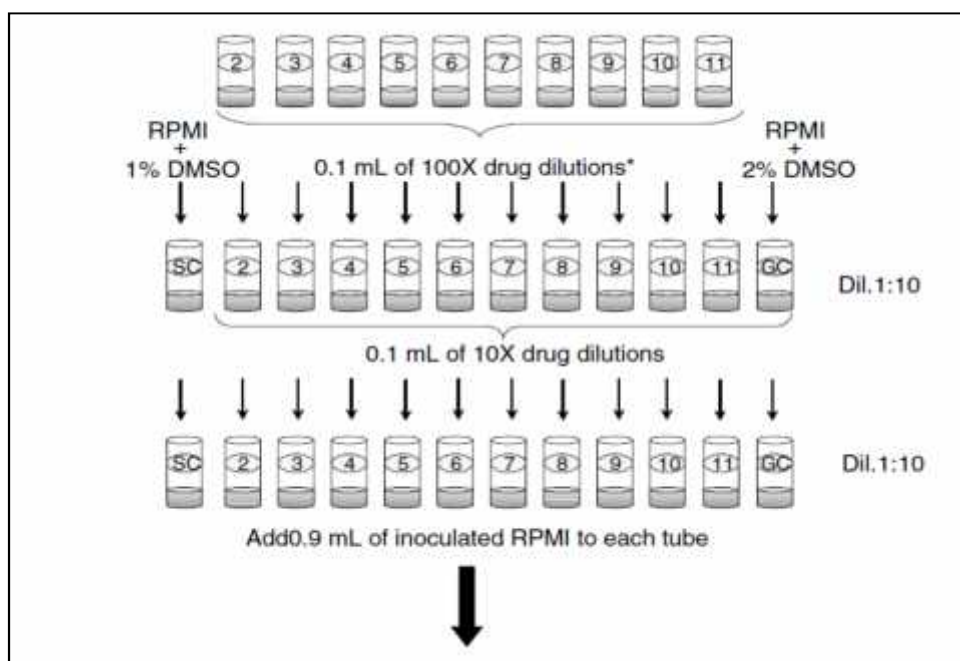


Figure 3. Les dilutions de l'agent antifongique insoluble dans l'eau
(Espinel-Ingroff et Cantón, 2007)

1.3.2. Préparations des tubes CMI de l'huile essentielle

Les tubes contenant les dilutions de l'antifongique (1ml) ont été placés d'une manière organisée, de la concentration la plus élevée vers la plus basse. Dix nouveaux tubes ont été rangés en étiquetant avec la concentration de l'antifongique finale de 20 à 0.04 µl / ml. RPMI1640 (avec de la glutamine, sans bicarbonate, et avec un indicateur de pH, Sigma R6504) est le milieu recommandé par la norme M38-A (Espinel-Ingroff et Cantón, 2007) pour les tests de sensibilité des moisissures (Voir l'Annexe n° 3). Le milieu a été tamponné avec MOPS (Sigma M3183) (0.164 mol/L).

Une dilution de 1:10 a été préparée en ajoutant 0.9 ml de RPMI 1640 au 0.1 ml de chaque dilution de l'antifongique. Notons, que neuf séries de tubes CMI sont préparées avec ces volumes. Enfin, à l'aide d'une pipette, 0.1 ml a été distribué à nouveau de chaque concentration dans le fond de chaque tube à essai stérile en commençant par la plus faible concentration. Ensuite, chaque tube estensemencé avec 0.9 ml de l'inoculum correspondant, et la concentration finale de DMSO est de 1% (voir Figure 4).



Concentrations finales après inoculation 20 à 0.04 $\mu\text{l} / \text{ml}$

Figure 4 Préparation des tubes CMI de l'agent antifongique insoluble dans l'eau

(Espinell-Ingroff et Cantón, 2007)

1.3.3. Préparation des suspensions fongiques

Pour chaque champignon, l'inoculum est préparé à partir d'une culture de 7 jours en milieu PDA à 25°C. Les spores ont été récupérés en imbibant un écouvillon stérile avec du Tween 20 et le transféré dans 3 ml de solution saline stérile 0.9%. Pour empêcher l'agglutination des spores, la suspension de spores est mélangée vigoureusement à l'aide d'un vortex pendant 15-20 secondes, puis le surnageant est transféré dans un tube stérile en ajustant la densité optique (DO) à l'aide d'un spectrophotomètre (Jenway, 6405 UV/VIS) à 530 nm afin d'obtenir une suspension de stock de $0.4-5 \times 10^6$ spores/ml. La DO à laquelle l'inoculum doit être ajusté varie en fonction de la taille des spores (voir Annexe n°2). Enfin, une suspension de travail a été préparée en diluant la suspension mère 1:100 spores dans le milieu d'essai RPMI 1640 (Figure 5).

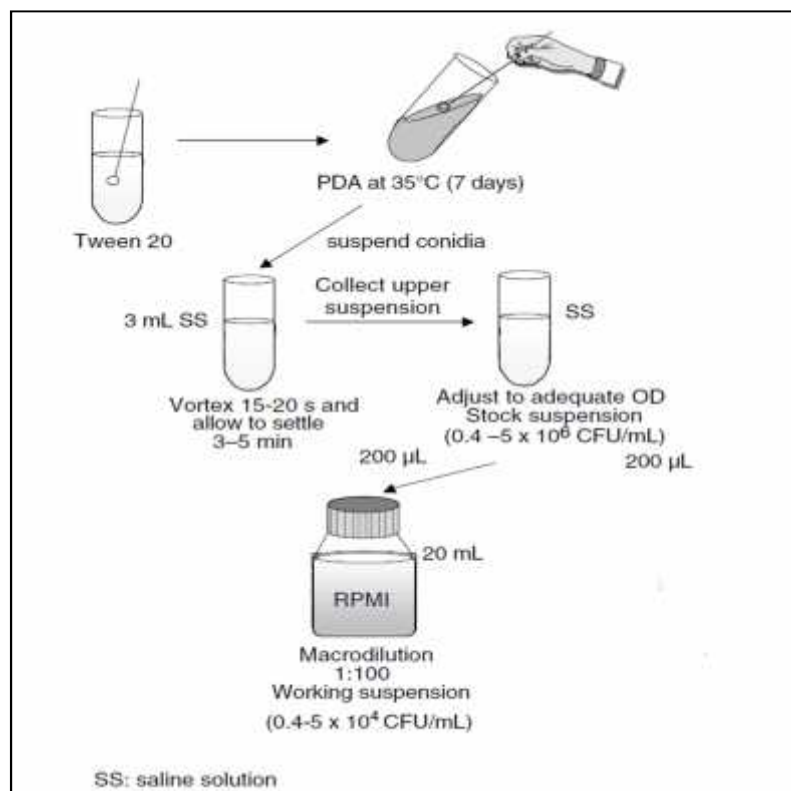


Figure 5. Préparation des suspensions fongiques (inoculum) pour la méthode de macro-dilution en milieu liquide

(Espinel-Ingroff et Cantón, 2007)

1.3.4. Inoculation des tubes CMI

Les tubes de l'antifongique sont organisés avant la préparation de l'inoculum dans l'ordre croissant, comprenant deux témoins, positif (contrôle de croissance) et négatifs (contrôle de stérilité) pour chaque souche. L'inoculation des tubes CMI a été commencée de la concentration la plus faible vers la plus forte, y a compris les témoins positifs. 0,9 ml de la suspension de travail sont ajoutés dans les tubes CMI ; en mélangeant cette suspension à l'aide d'un vortex avant l'étape d'inoculation. Notons que, chaque essai est répété deux fois afin de minimiser l'erreur expérimentale.

1.3.5. Incubation et lecture

Les tubes CMI sont incubés à 35°C (sans agitation) dans des conditions d'aérobiose pendant 72 heures. Si la croissance adéquate n'est pas présente, les tubes ont été re-incubés une deuxième fois. Cette croissance dépendra de l'espèce fongique testée. Enfin, le point final CMI a été déterminé par une lecture visuelle, en comparant la croissance à celle du

témoin. La CMI est définie comme la plus faible concentration de l'antifongique pour laquelle aucune croissance n'est visible (détection visuelle) comparativement au témoin.

1.3.6. Détermination de la CMF

Pour déterminer la CMF, 20 μ l de chaque tube CMI ont été inoculés en surface (sans agitation) sur le milieu Sabouraud Dextrose Agar (SAB) (Eur-Pharm, 1024.00), y compris tous les tubes qui ont montré une inhibition visuelle complète. Après incubation des boîtes à 35°C pendant 72 heures, la CMF est considérée comme la concentration la plus faible d'antifongique qui indique soit une croissance nulle, soit une croissance de moins de trois colonies pour obtenir une activité fongicide d'environ 99 à 99.5%.

PARTIE III
RÉSULTATS ET DISCUSSION

1. RÉSULTATS

1.1. Rendement et composition chimique

Le rendement en huile essentielle d'*Artemisia campestris* est de 0.71% (cf. figure 6). L'analyse chromatographique d'huile essentielle a permis d'identifier 42 composés qui représentent environ 99.92% (voir Tableau 5). Les composés majoritaires de l'huile essentielle d'*A. campestris* sont : le α -pinene (18.65%) et le β -pinene (16.78%), le γ -myrcene (17.34%) et le Germacrene (10.34%). D'autres composés sont également présents dans l'huile *A. campestris*, mais à des teneurs moins importantes.

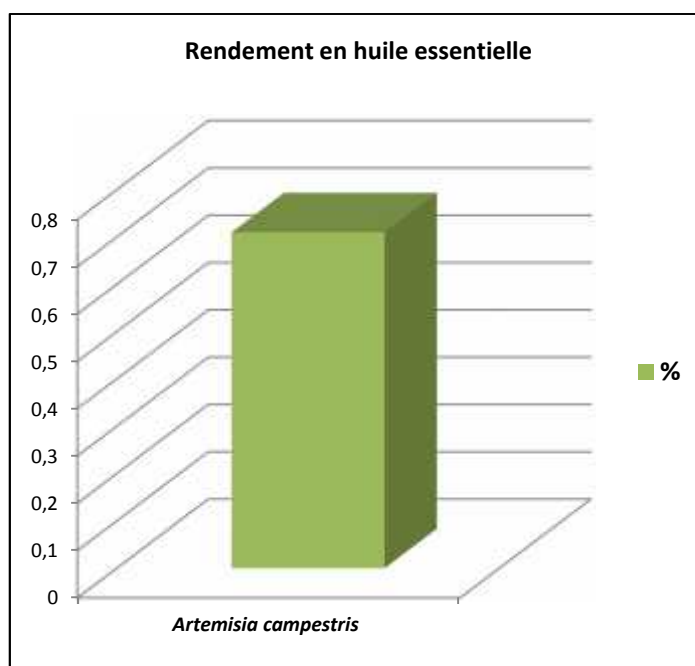


Figure 6. Rendement en huile essentielle de la plante *Artemisia campestris*

Tableau 5. Composition chimique de l'huile essentielle d'*Artemisia campestris*

N°	%	Composés
1	18.65	α-Pinene
2	16.78	β-Pinene
3	17.34	-Myrcene
4	5.90	Limonene
5	3.22	-Ocimene y
6	3.83	γ -Terpinene
7	0.71	α -Terpinolene
8	0.41	Alloocimene
9	0.17	α -Campholene aldehyde
10	0.32	Trans-Pinocarveol
11	0.16	Verbenol
12	0.19	Pinocarvone
13	0.36	4-Terpineol
14	0.51	α -Terpineol
15	0.28	Myrtenal
16	1.65	Carvone
17	0.28	Bornyl acetate
18	0.24	Thymol
19	0.35	Bicyclgermacrene
20	0.17	Citronellyl acetate
21	0.12	Neryl acetate
22	0.32	Copaene
23	0.32	Neryl acetate
24	0.21	Aromadendrene
25	1.68	1,5-Cyclohexadien-1-yl-
26	0.54	Caryophyllene
27	0.65	-Farnesene
28	10.34	Germacrene D
29	1.54	γ -Elemene
30	0.77	δ -Cadinene
31	3.65	Spathulenol
32	0.35	Photonol
33	0.73	Epiglobulol
34	1.12	T-Cadinol
35	1.05	-Eudesmol
36	0.86	2,4-Hexadiynophenone
37	0.39	Patchouli alcohol
38	0.69	Caryophyllene oxide
39	0.63	α -Copaen-15-ol
40	0.22	Bioallethrin
41	0.25	Heptanoic acid
42	1.95	5(6H)-Benzocyclooctenone
Total	99.92	

1.2. Activité antifongique d'huile essentielle

Le Tableau 6 ci-dessous montre les résultats de l'activité antifongique de l'huile essentielle d'*A. campestris* contre les champignons testés.

Tableau 6. Activité antifongique (CMI, CMF) de l'huile essentielle d'*Artemisia campestris*

<i>Artemisia campestris</i>		
Les souches	CMI * $\mu\text{l/ml}$ (v/v)	CMF * $\mu\text{l/ml}$ (v/v)
<i>Fusarium graminearum</i>	1.25	1.25
<i>Fusarium moniliforme</i>	2.5	2.5
<i>Fusarium culmorum</i>	2.5	2.5
<i>Penicillium expansum</i>	2.5	2.5
<i>Aspergillus flavus</i>	2.5	2.5
<i>Aspergillus ochraceus</i>	2.5	5
<i>Aspergillus parasiticus</i>	2.5	5
<i>Penicillium citrinum</i>	5	>20
<i>Penicillium viridicatum</i>	10	>20
<i>Aspergillus niger</i>	10	>20

* la CMI (concentration minimale inhibitrice) et la CMF (concentration minimale fongicide) sont déterminées par la méthode de macro-dilution en milieu liquide et exprimées en $\mu\text{l/ml}$ (v/v)

On note que le pouvoir antifongique de l'huile essentielle d'*Artemisia campestris* est varié d'une souche fongique à une autre en fonction de sa résistance. L'huile essentielle d'*Artemisia campestris* a exercé une forte activité antifongique sur toutes les souches fongiques testées. *Fusarium graminearum* est la souche la plus sensible à l'huile d'*A. campestris* pour une concentration inhibitrice et fongicide de 1.25 $\mu\text{l/ml}$ (v/v), alors que la concentration 2.5 $\mu\text{l/ml}$ (v/v) était suffisante pour inhiber la croissance de *Fusarium moniliforme*, *F. culmorum*, *Penicillium expansum*, *Aspergillus flavus*, *A. ochraceus* et *A. parasiticus*. Par contre *Penicillium viridicatum* et *Aspergillus niger* sont les plus résistants pour une concentration inhibitrice de 10 $\mu\text{l/ml}$ (v/v), tandis que une CIM de 5 $\mu\text{l/ml}$ est suffisante pour inhiber la croissance *P. citrinum*.

L'huile d'*Artemisia campestris* présente également une forte activité fongicide contre les champignons testés, à l'exception de *Penicillium citrinum*, *P. viridicatum* et *Aspergillus niger* (CMF >20 $\mu\text{l/ml}$). La concentration 2.5 $\mu\text{l/ml}$ (v/v) a montré un effet fongicide sur

les souches *Fusarium moniliforme*, *F. culmorum*, *Penicillium expansum* et *Aspergillus flavus*, alors que la concentration 5 µl/ml (v/v) de l'huile est suffisante pour exercer un effet fongicide sur *Aspergillus parasiticus* et *A. ochraceus*.

2. DISCUSSION

Le rendement de notre plante en huile essentielle est similaire au résultat enregistré par Baykan (2012) qui est de 0.7%. Belhattabe et *al* (2011) ont rapporté que le rendement de l'huile essentielle d'*A. campestris* est de 0.66%, alors que celui de la Tunisie est de 0.65% (Akrouit 2001). Cependant, les travaux de Saihi (2011) ont montré que le rendement de l'huile essentielle d'*A. campestris* varie entre 0.12 à 0.29 % en fonction de l'origine de récolte, de l'état de plante (fraîche ou sèche) et de la durée d'extraction.

Selon Saihi (2011), l'huile essentielle de l'*Artemisia campestris* de la région de Djelfa est constituée principalement de spathulenol environ 58.2%, tandis que α -pinène (34.2%) est le composé dominant de l'huile cette plante en Tunisie (Akrouit et *al*, 2011). Les travaux de Belhattab et *al* (2011) ont montré que α -terpényl acétate et le α -pinène sont les composés dominants de l'huile d'*A. campestris* avec des taux de 18.8 et 18.4% respectivement. Cependant, Bakchiche et *al* (2014) ont rapporté que l'huile essentielle de cette plante est constituée principalement de α -pinène 25.6% et sabinène (17%). Nos résultats montrent que la composition chimique de l'*Artemisia campestris* de la région de Laghouat est différente, constituée principalement de le α -pinène (18.65%) et le β -pinène (16.78%), le γ -myrcène (17.34%) et le Germacrène (10.34%). Cette variation rencontrées dans la composition chimique des huiles essentielles, du point de vue qualitatif et quantitatif, peut être due à certains facteurs écologiques, à la partie de la plante utilisée ainsi que l'âge de la plante et la période du cycle végétatif, ou même les facteurs génétiques (Kokkini et *al*, 1997 ; Russo et *al.*, 1998 ; Thompson et *al.*, 2003 ; Karousou et *al*, 2005). De plus, les travaux de Sefidkon et *al.* (2008) ont confirmé l'effet des facteurs climatiques et les techniques de l'extraction sur la variation de la composition chimique d'huile essentielle de la même plante. Malgré cette hétérogénéité dans leur composition chimique, les huiles essentielles ont des propriétés marquées qui sont valorisées dans de nombreux domaines, notamment l'aromathérapie et la cosmétique, auxquels s'ajoute récemment le biocontrôle des bio-agresseurs (Regnaut-Roger et *al*, 2008)

L'effet antifongique des huiles essentielles est dû essentiellement à la nature de leurs composés majeurs mais en partie à la nature de leurs composés mineurs. Des phénomènes de synergie entre les différents constituants peuvent être à l'origine d'une

activité beaucoup plus prononcée que celle prévisible par les composés majoritaires (Senhaji et al, 2006).

En effet, très peu d'études ont examiné l'activité antifongique des extraits bruts d'*Artemisia campestris* contre les différentes maladies fongiques. Les travaux de Gherib (2009) ont montré que le taux d'inhibition le plus fort d'huile essentielle d'*Artemisia campestris* contre *Aspergillus flavus* est de 68.84% et 84.64 % avec des concentrations 100 µl/ 20 ml de PDA et 200 µl/ 20 ml de PDA respectivement, comparant aux d'autres plantes *Artemisia herba alba*, *Artemisia judiaca* et *Warionia saharae*. Ainsi, pour une concentration 200 µl/ 20 ml de PDA les taux d'inhibitions contre *Aspergillus niger*, *Fusarium oxysporome*, *Rhizopus stolonifer* sont de 55.4, 87.65 et 87.85% respectivement. De plus, les résultats de Hechachna (2013) et Teldji (2014) ont montré que l'huile essentielle de *Mentha spicata* exerce une forte activité fongicide sur les mêmes souches testées dans la présente étude par rapport aux huiles essentielles de *Thymus vulgaris*, *Laurus nobilis*. Nos résultats concordent avec l'effet fongicide de la menthe contre les champignons *Fusarium moniliforme*, *Penicillium expansum*, *Aspergillus ochraceus*. Néanmoins, l'huile de menthe a exercé un effet fongicide moins important que l'huile d'*A. campestris* vis-à-vis de *F. graminearum*, *F. culmorum*, *A. flavus* et *A. parasiticus* pour des CMF de 2.5, 10, 5 et 10 µl/ml, respectivement, tandis que l'huile d'*A. campestris* a montré une faible activité fongicide contre *P. citrinum*, *P. viridicatum* et *A. niger*, comparée à l'essence de *Mentha spicata*. Mango et Olsen (2004) ont montré l'existence de cette différence de sensibilité à l'huile entre différentes espèces appartenant aux mêmes genres et entre les diverses structures fongiques du même genre: spores, sclérotites et fragments mycéliens. Sachant que cette activité n'est pas générale pour tous les types des moisissures, certains d'entre eux peuvent même consommer les terpènes en tant que source de carbone, les dégrader ou les transformer, ce qui peut expliquer l'inefficacité de certaines de ces molécules vis-à-vis de certains microorganismes (Heyen et Harder, 1995).

En présence d'huile essentielle, la diminution de la croissance de champignon pourrait expliquer par la présence dans ces huiles des composés terpéniques, qui possèdent une activité antifongique. Le mécanisme d'action des huiles essentielles contre des mycètes, jusqu'à maintenant, n'est pas totalement élucidé, mais quelques auteurs ont donné

plusieurs suppositions selon leurs observations (Kwouzou et *al*, 2009). La plupart des études sur le mécanisme d'action des huiles essentielles se sont accentuées sur leurs effets sur la membrane cellulaire (Bouguerra, 2012). Ourain et *al*, (2005) ont montré qu'à cause de la complexité de la composition chimique des huiles essentielles, il est difficile de donner une idée précise sur le mode d'action. Donc, chaque un des constituants d'une huile essentielle à son propre mécanisme. Par conséquent, l'huile essentielle de *Citrus sinensis*, qui présente une forte richesse en limonène (84.2 %), a exercé une forte activité contre *Aspergillus niger* par la destruction de ses parois cellulaires mycéliens (Sharma et Tripathi, 2008). De plus, Plusieurs auteurs, notamment de Sharma et Tripathi (2008), Billerberk *et al*. (2001) et Mares *et al*. (2004) ont constaté que les huiles essentielles peuvent causer des changements morphologiques comprenant l'insuffisance de sporulation, la perte de pigmentation, le développement anormal des conidiophores et la déformation des hyphes. Cependant, de tous les effets possibles des monoterpènes sur les membranes biologiques, les effets délétères sur les membranes mitochondriales devraient provoquer une inhibition du métabolisme énergétique mitochondrial, ce qui entraîne des perturbations dans un large éventail des processus physiologiques et biochimiques dans la cellule (Yoshimura et *al*, 2010).

CONCLUSION

CONCLUSION

Ce présent travail nous a permis d'étudier la composition chimique et l'activité antifongique de l'essence de la plante *Artemisia campestris* de la région de Laghouat. Le rendement en huile essentielle est de 0.71%. L'analyse chromatographique d'huile essentielle a permis d'identifier 42 composés dont les composés majoritaires sont : le α -pinene (18.65%) et le β -pinene (16.78%), le α -myrcene (17.34%) et le Germacrene (10.34%).

De plus, les résultats de l'activité antifongique de l'huile d'*A. campestris* en milieu liquide montrent que *Fusarium graminearum* est la souche la plus sensible à l'huile pour une concentration inhibitrice et fongicide de 1.25 μ l/ml (v/v). L'huile présente également une forte activité fongicide contre les champignons testés, à l'exception de *Penicillium citrinum*, *P. viridicatum* et *Aspergillus niger* (CMF >20 μ l/ml).

L'étude présente également un grand intérêt pour l'industrie agroalimentaire car elle propose d'une part l'utilisation de l'huile d'*Artemisia campestris* dans ce secteur comme un biofongicide afin de réduire la dépendance des fongicides synthétiques et de garantir une meilleure production agricole, et d'autre part la création des pépinières pour la valorisation des plantes médicinales et aromatiques et la disponibilité des biofongicides sur le marché des fongicides. De plus, elle suggère également l'application d'une combinaison de deux ou plusieurs huiles essentielles comme des antifongiques naturels dans l'industrie agroalimentaire, car chaque extrait de plante inactive efficacement une souche fongique spécifique.

Enfin et pour faire suite à cette étude, plusieurs pistes de travail peuvent être envisagées comme perspectives :

- Etudier *In situ* l'effet antifongique de l'huile *Artemisia campestris* sur la croissance des moisissures phytopathogènes ;
- Etudier l'effet insecticide de cette huile sur le développement des insectes responsables de la détérioration des céréales, des légumes et des fruits ;
- Réaliser des études toxicologiques sur les huiles essentielles avant leur application comme des biofongicides dans les cultures agricoles.

RÉFÉRENCES
BIBLIOGRAPHIQUES

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Abdoulayes, K. 2012. Sécurité alimentaire et organisation agricoles et rurale au Mali. Paris : Harmattan. 158p
- Akrouit A., Chemli R.C., Chrief., Hammami M. 2001. Analysis of the essential oil of *Artemisia campestris* L. J. *Flavour Fragr.* 16. 337–339.
- Akrouit A., Gonzalez L.A., El Jani H.J., and Madrid P.C. 2011. Antioxidant and antitumor activities of *Artemisia campestris* and *Thymelaeahirsuta* from southern of Tunisia. *J. Food. Chem. Tox.* 49: 342–347
- Aliou, D., Gruz, J. 1989. Génie agricole et développement technique d'entreposage (Butin des sévices agricoles de la FAO). FAO. 127p.
- Aliou, D., Jan, K.1991. Bulletin de service agricole FAO : guide pour établissement les opérations et la gestion des banques de céréales. FAO. 92p.
- Amri, L. Hamrouni, M. Hanana et al. 2014. Propriétés antifongiques des huiles essentielles de *Biotaorientalis* L. *Phytothérapie Springer-Verlag France* 12:170-174.
- Armand, B., Germain, M. 1992. Le blé : éléments fondamentaux et transformation. Canada : Dominique Johson. 443p.
- Bakchiche B, Gherib A, Maatallah M, and. Miguel M.G. 2014. Chemical composition of essential oils of *Artemisia campestris* and *Juniperus phoenicea* from Algeria. *International Journal of Innovation and Applied Studies ISSN 2028-9324* Vol. 9 No. 4, pp. 1434-1436
- Baykan E, Reznicek G, n enol S et al.2012. Antimicrobial and antioxidant properties of *Artemisia* L. species from western .*Anatolia Turk J Biol.* 36 .75-84
- Belhattab R., Boudjouref M., Barroso J.G., Pedro L.P., Figueirido A.C. Essential Oil Composition from *Artemisia campestris* Grown in Algeria. *Advances in Environmental Biology*, 5(2): 429-432, 2011
- Belyagoubi, L.2006. Effet de quelques essences végétales sur la croissance des moisissures de détérioration des céréales. Thèse magistère : Université Abou Becker Belkaid. 110p.
- Ben Nasr H, Hammami T. Serria, et al. 2014. Aqueous leaves extract of *Artemisia campestris* inhibition of the scorpion venom induced hypertension . *Journal of Medicinal Plant Research* . Vol. 8(13), pp. 538-542.

- Ben Sassi A., Harzallah-Skhiri F., Aouni M. 2007. Investigation of some medicinal plants from Tunisia for antimicrobial activities. *J. Pharmaco. Bio* . 45 (5) : 421–428
- Bernard C.B. et Philogène B.J.R., 1993. Insecticide synergists: role, importance and perspectives. *J. Toxicol. Env. Health*, 38. P.19-22.
- Bernard, P., Francis, F., Charles, P.2000. La lutte physique en phyto-protection. Paris: Quae. 348p.
- Billerbeck, V.G., Roques, C., Vanière, P., Marquier, P. 2001. *Activité antibactérienne et antifongique de produits à base d'huiles essentielles*. *Hygienes*. 3 (10). p. 248-251.
- Bnouham M, Mekhfi H, Legssyer A and Ziyat A. 2002. Ethnopharmacology Forum: Medicinal plants used in the treatment of diabetes in Morocco. *Int J Diabetes and Metabolism*, 10, 33-50.
- Boudjouref M. 2011. Etude de l'activité antioxydante et antimicrobienne d'extraits 'Artemisia campestris L. Mémoire de Magister En Biochimie . Université Ferhat Abbes, Sétif . 99p
- Bouguerra, Y. 2012. Etudes des activités biologiques des huiles essentielles extraites des graines de Foeniculum vulgare Mill. En vue de son utilisation comme conservateurs alimentaire. Thèse magistère : Université Montori Constantine. 128p
- Caratini R. 1971. Bordas encyclopedie. *Ed Bodas*. Belgique. 23: 137-195
- Castegnaro, M., Pfohl-Leszkowicz ,A. 2002. *Les mycotoxines : contaminants omniprésents dans l'alimentation animale et humaine, dans La sécurité alimentaire du consommateur*. Lavoisier. Tec Doc. p. 145.
- CDF. 2012. Biographie de la région de Laghouat. Rapport, 5p.
- Claude, R. 2004. Santé et qualité de l'environnement intérieur dans les bâtiments. 1ier édition. Italie : PPVR. 358p.
- Daniel, R., Chaurmont, J., Cleur,C., et al. 2008. *Conseilles en aromathérapie*. 2iem édition France : Wolters kluwer. 187p.
- David,M., Hervé, M. 2011. *Analyses statistique des risques agro-environnementaux*.France : Springer. 161p.
- Djebaili, S. 1978. Recherches phytosociologiques et phytoécologiques sur la végétation des hautes plaines steppiques et de l'Atlas saharien algérien. Thèse de Doctorat d'Etat : université de Science et technologie de Montpellier. 200 p.

- Dob T., Dahmane D., Berramdane T., Chelghoum C. 2005. Chemical Composition of the Essential Oil of *Artemisia campestris* L. from Algeria . *J. Pharm. Bio.* 43(6): 512–514.
- DSA., 2012. Etat des lieux de la situation actuelle de la wilaya de Laghouat, 24p.
- Espinel-ingroff, A., Canton, E. 2007. Antifungal susceptibility testing of filamentous fungi. In: Schwalbe, R., Steele-Moore, L Goodwin, A. C (Eds), Antifungal susceptibility testing protocols .USA: CRC Press , Taylor Francis Group, LLC, .p 210-240.
- Fabrice, V., Clair, D. 2006. Histoire et amélioration de cinquante plantes cultivées. Paris Quae. 817p.
- FAO, 1995. N°27. Les sorghos et les mils dans la nutrition humaine. 198p.
- FAO. 2003. Manuel du système de l'analyse des risques-points critiques pour leurs maitrises (HACCP) pour la prévention et contrôle des mycotoxines . 92p
- Fillatre, Y. 2011. Produits phytosanitaires : développement d'une méthode d'analyse multi-résidus dans les huiles essentielles par couplage de la chromatographie liquide avec la spectrométrie de masse en mode tandem. Thèse de doctorats : universités Angers. 288p.
- Gherib M. 2009 Etude des activités antimicrobienne et antioxydante des huiles essentielles et des flavonoïdes d'*Artemisia herba alba* Asso; *Artemisia judaica* .L. ssp. sahariensis; *Artemisia campestris* L; *Herniaria mauritanica* Murb et *Warionia saharae* Benth. et Coll. Mémoire de Magister en Biologie ; Université Abou Bekr Belkaid —Tlemcen 132p
- Giroux S., Côté J.C., Vincent C., Martel P., Coderre D., 1994. *Bacteriological insecticide M-One effects on the mortality and the predation efficiency of adult spotted lady beetle Coleomegilla maculata (Coleoptera: Coccinellidae)* . *J. Econ. Entomol.* 87. p. 39-43.
- Guillermo, G. 2004. Manuel pour l'établissement de petites entreprises semencières PES. Colombie : CIAT. 282p.
- Gury, A. 2007. The herbalist in the kitchen. America: Board of trustees . 235p.
- Gury, P. 1997. Maladies d'elvages des porcs. France : France agricole. 210p.
- Halitim A. 1988. Sols des régions arides d'Algérie. Ed. O.P.U., Alger. 384p.
- Hamiton, P., Franklein, R., Eichlom, S., et al. 1999. Biologie végétal. Etats Unis : Worthe Publishers. 623p.

- Harry, V. 2004. Production de semences à petite échelle avec l'amélioration des variétés. Pays Bas : Fondation Agromisa, Wagening 1 ier édition. 106p.
- Hechachna, H. 2013 . Etude de l'activité antifongique des huiles essentielles de quelques plants aromatiques. Mémoire d'ingénieur d'Etat en Agronomie. Université Amar Telidji. Laghouat .50p
- Henri, D., Jean, L., Malewiak, C., Leynoud, R., Berthier, M. 1992. Alimentation et nutrition humaine. Paris : ESF. 1537p.
- Heyen, U. Harder J. 1995. Geranic acid formation, an initial reaction of Gram-bacteria. *Journal of Applied Microbiology*.25.p:259-270.
- Homsy, M. 2009. Progrès en dermato-allergologie . France : John Eurotexte.393 p. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1472-765.2006.02011>.
- Inge, G. 2004. Protection des céréales et de légumineuses stockées. Pays Bas: Fondation Agromisa Wageningen. 1 ier edition 1996, 2 éme edition 2004. 74p.
- Jeane-claud, L.2002. Traité de phytothérapie: médecine et endobiologie. Paris: Maisson.827p
- Karabegoviü, I.Nikolova, M. Velipkoviü, D. Stojipeviü,S. Veljkoviü1,V. and Laziü, M. 2011. Comparison of Antioxidant and Antimicrobial Activities of Methanolic Extracts of the *Artemisia sp.* Recovered by Different Extraction Techniques. *Chinese Journal of Chemical Engineering*, 19(3) 504-511
- Karousou R., Koureas D.N. & Kokkini S., 2005. Essential oil composition is related to the natural habitats: *Coridothymus capitatus* and *Satureja thymbra* in NATURA 2000 sites of Crete. *Photochemistry* .66.p.2668-2673.
- Keon, D., Proost, C. 2002. L'impact de la nutrition sur la sante. Belgique: Garant. 221p.
- Kokkini, S. et al. 1997b. Autumn essential oils of Greek oregano. *Phytochemistry* .Vol. 44.n 5.p. 883-886.
- Kwazou, N., Jazet, D., Tatsadjieu, L., et al. 2009. Propriétés antifongiques des huiles essentielles de quelques plantes du genre *Aframomum* de Cameroun contre *Aspergillus flavus*.*Cameroon journal of experimental*. Vol.05. n :1. P44-51.
- Kyeong W.Y., Anwar M., and Jong H.K. 2007. Effects of the Aqueous Extract from *Artemisia campestris* ssp. *caudata* on Mycorrhizal Fungi Colonization and Growth of Sand Dune Grasses. *J. Plant. Biology*. 50 (3): 358-361.

- Lamaison, J., Polese, J. 2005. Encyclopédie visuelle des champignons. Espagne : Losange. 385p.
- Laurence,A., Nathahie,L .2009. Agriculture biologique : grande principe de la production . France : Educagri. 239 p.
- Lugauskas, A., Repeckiene, J., Novosinskas, H. 2005. *Micromycetes, producers of toxins, detected on stored vegetables*. Ann. Agric. Environ. Med. 12. p. 253–260.
- Lydie, S. 2010. La lutte biologique : vers de nouveaux équilibres écologiques. Paris : Quae et Educagri. 328p.
- Magan N. Olsen M., 2004-Mycotoxines in food: Detection and control, Woodhead Publishing in Food Science and Technology.P:190-203.
- Mares, D., Tosi, B., Poli, F., Andreotti, E., Romagnoli, C. 2004. Antifungal activity of *Tagetes patula* on some phytopathogenic fungi ultrastructural evidence on *phythium ultimum*. Microbiol. Res. 859. p. 295-304.
- Memmi A . Sansa G., Rjeibi I., El ayeb M., Srairi-Abid N., Bellasfer Z.,and Fekhih A. 2007. Use of medicinal plants against scorpionic and ophidian venoms. *Arch. Inst. Pasteur. Tunis* . 84 (1-4) : 49-55.
- Mirjalili. M.H., Tabatabaei S.M.F., Hadian J., Nejad S.E.,and Sonboli. A.2007. Phenological Variation of the essential oil of *Artemisia scoparia* from Iran. *J. Essent. OilRes.* 19 : 326–329
- Morin, O. 1994. *Aspergillus* et aspergilloses: biologie, Ed. Techniques Encyl. Med. Chir. (Elsevier, Paris), Maladies infectieuses 8-600-A-10.
- Mucciaralli et al, 1995, Essentiels oils from *Artemisia* species growing spontaneously in North-West Italy. *Flavour and Fragrance journal*, vol 10. 25-32
- Naili M.B., Alghazeer O.A., Saleh N.A., Al-Najjar A.Y. 2010. Evaluation of antibacterial and antioxidant activities of *Artemisia campestris* (Astraceae) and *Ziziphus lotus* (Rhamnaceae). *Arab. J. Chem.* 3: 79–84.
- Ourain, O., Agoumi, A., Alouik, et al. 2005. Approche thérapeutique des dermatophyties par les huiles essentielles de plantes aromatiques marocaines. *Pharmacologie.* n .1. p.3-12.
- Ozenda P. 1977. Flore du Sahara Ed : éditions du centre nationale de la recherche scientifique -Paris- 441p.
- Ozenda P.1983. Flore du Sahara Ed : éditions du centre nationale de la recherche scientifique -Paris- 441p.

- Pascal, D., John, L. 2005. Rhinite allergique et polypose nasosinusienne. Paris : Euronext. 159p.
- Philippe M. 2014. les famille des plante à flours d'Europe, botanique, systematique et utilitaire. 2^{ème} ed. Presse universitaires de namur Belgique. 280p
- Pierre, F. 2000. Le grain de blé. Paris : Quae. 313p.
- Quezel et Santa. 1962. Nouvelle flore de l'Algérie Ed : éditions du centre nationale de la recherche scientifique .Paris. Tome I. 990p.
- Raoul, C., Barriuso, E., Bedos, C. et al. 2005. Les pesticides dans le sol (conséquences agronomiques et environnementales. France : France Agricole. 641p
- Roger, C., Vincent, C., Coderre D., 1995. Mortality and predation efficiency of *Coleomegilla maculata lengi* Timberlake (Coccinellidae) following application of Neem extracts (*Azadirachta indica* A. Juss., Meliaceae). *J. Appl. Entomol.* 119.p. 439-443.
- Royer, C. 1990. Principes de phytopathologie et de lutte contre les maladies des plants. 1ier edition. Suisse PPUR. 287p.
- Russo, M., Galletti, C., Bocchini, P et al . 1998. Essential oil chemical composition of wild populations of Italian oregano spice (*Origanum vulgare* ssp. *hirtum* (Link)): a preliminary evaluation of their use in chemotaxonomy by cluster analysis. *Journal of Agricultural and Food chemisty* . 46.p.3741-3746.
- Sahi .R. 2011. Etude phytochimique, extraction des produits actifs de la plantes *Artemisia campestris*, de région de Djelfa . mise en évidence de l'activité biologique. Thèse de magistère en chimie. Universiti d'Oran. 83p
- Saoudi M., Allagui M.S., Abdelmouleh A., Jamoussi K., and El Feki A.2010 . Protective effects of aqueous extract of *Artemisia campestris* against puffer fish gocephalusgocephalus extract-induced oxidative damage in rats. *Exp.Tox.Pathol.* 62 : 601–605.
- Sayoud, R., Ezzahiri, B., Bouznad, Z. 2008. Les maladies des céréales et légumineuses en maghreb. Alger : ITGC. 63p.
- Sefi M., Fetoui H., MakniM., and Najiba Zeghal N. 2010. Mitigating effects of antioxidant properties of *Artemisia campestris* leaf extract on hyperlipidemia, advanced glycation end products and oxidative stress in alloxan-induced diabetic rats. *J. Food. Chem.Toxicol.* 48 :

- Sefidkon, F., Bahmanzadegan, A., Assarech, M. 2008. Effet of distillation methods and harvesting times on the essentielle oil and cimeole contente of *Eucalyptus deabbeta* .*Chemistry of naturel compound*. Vol 44. n: 2.p 250-253.
- Senhaji, O., Faid, M., Kalalou, L. 2006. Etude de pouvoir antifongique de l'huile essentielle de Cannelle. *Phytothérapie expérimentale*. n : 24.p 24-30.
- Sharma, N.,Tripathi ,A. 2008. Effects of *Citrus sinensis* (L.) *Osbeck epicarp* essential oil on growth and morphogenesis of *Aspergillus niger* (L.) *Van Tieghem*. *Microbiol Res* 163 (3). p. 337-344.
- Sogreah ., 2009. Etude d'inventaire et de developpement de la PMH. Inventaire de la PMH. Rapport définitif. Wilaya de Laghouat. 106p.
- Tabuc , C. 2007. Flore fongique de differents substrats et conditions optimales de des mycotoxines. These de doctorat. Toulouse. 190p
- Teldji , H. 2014. Détermination *in vitro* de l'activité antifongique des huiles ssentielles de trois plantes aromatiques sur la croissance des champignons phytopatogènes. Mémoire de Master en Protection Des Végétaux et d'Environnement. P.70.
- Thompson J.D. et al., 2003. Qualitative and quantitative variation in monoterpene co-occurrence and composition in the essential oil of *Thymus vulgaris* chemotype. *Journal Chemistry and Ecologie* .Vol.29.n.4.p.859-880.
- Valant-Vetschera K.M., Fischer R., and Wollenweber E. 2003. Exudate flavonoids in species of *Artemisia* (Asteraceae-Anthemideae): new results and chemosystematic interpretation. *Biochem. Syst. Ecol.* 31: 487-498
- Vernin G., Merad O., Vernin G.M.F., Zamkotsian R.M. and Parkanyi C.1995. GC-MS analysis of *Artemisia herba-alba* Asso essential oils from Algeria.*Dev. Food Sci.* 37A : 147-205.
- Vierling, E. 2008. Filières et produits. France : Wolters-Kluwer. 281p.
- Vincent, C ; Panneton, B ; Fleurat-Lessard, F. 2000. La lutte physique en phytoprotection. INRA, Paris 2000 – ISSN : 1250-5218 – ISBN : 2-7380-0918-2
- Yoshimura H., Sawai Y., Tamotsu S., and Sakai A.2010. 1,8-cineole inhibits both proliferation and elongation of BY-2 cultured tobacco cells. *J Chem Ecol.* 1-9.
- Zaid, N., Pierre, G. 2011. Danger dans l'assiette. Paris : Quae. 184p

Annexes

ANNEXE 1 : Les CMF d'huile essentielle d'*Artemisia campestris* contre les dix champignons testés

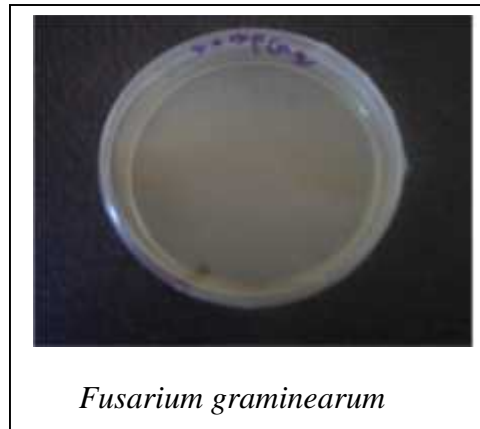


Photo 3 (originale) (CMF=1.25ul/ml)

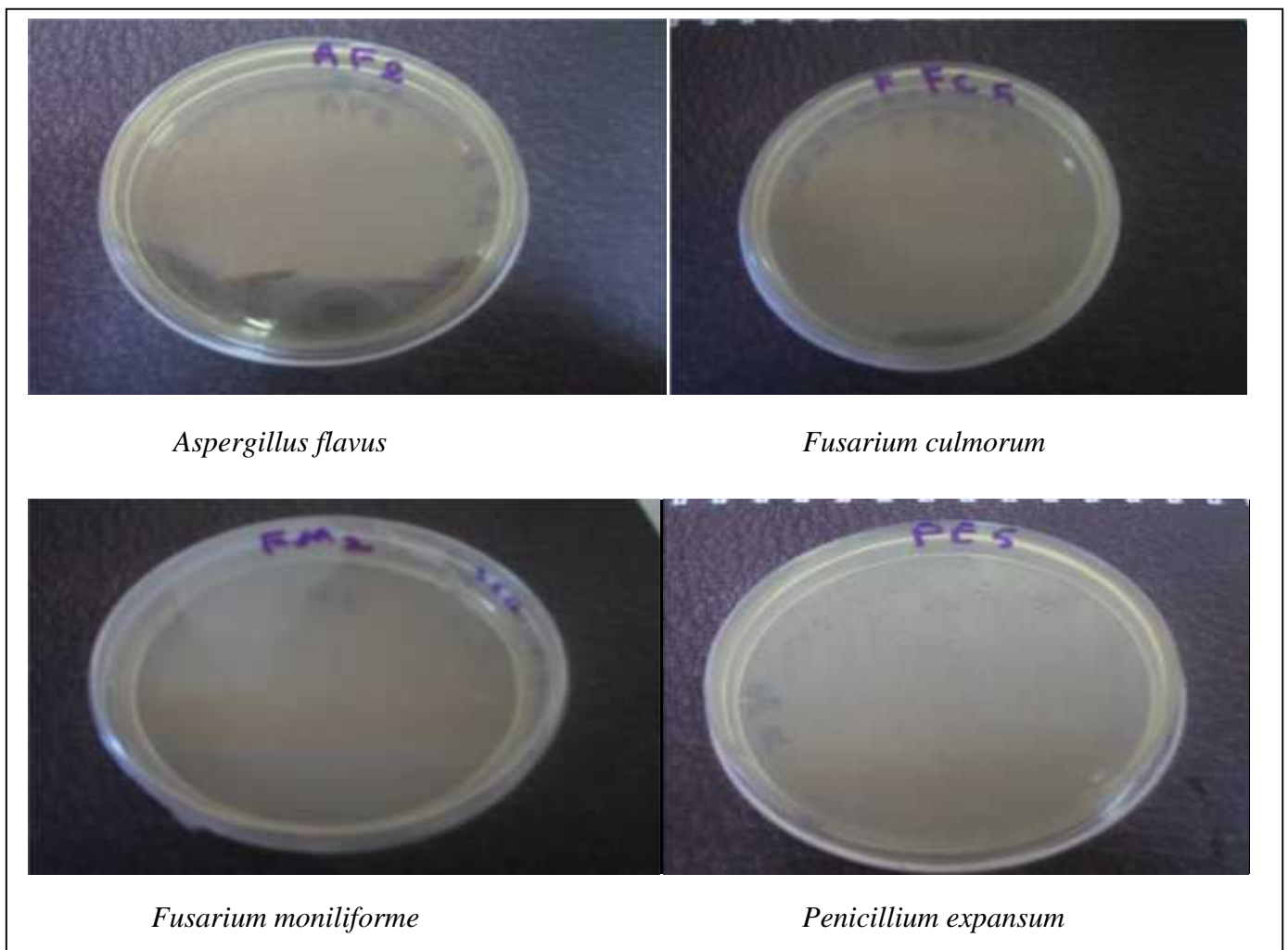


Photo 4 (originale) (CMF=2.5ul/ml)

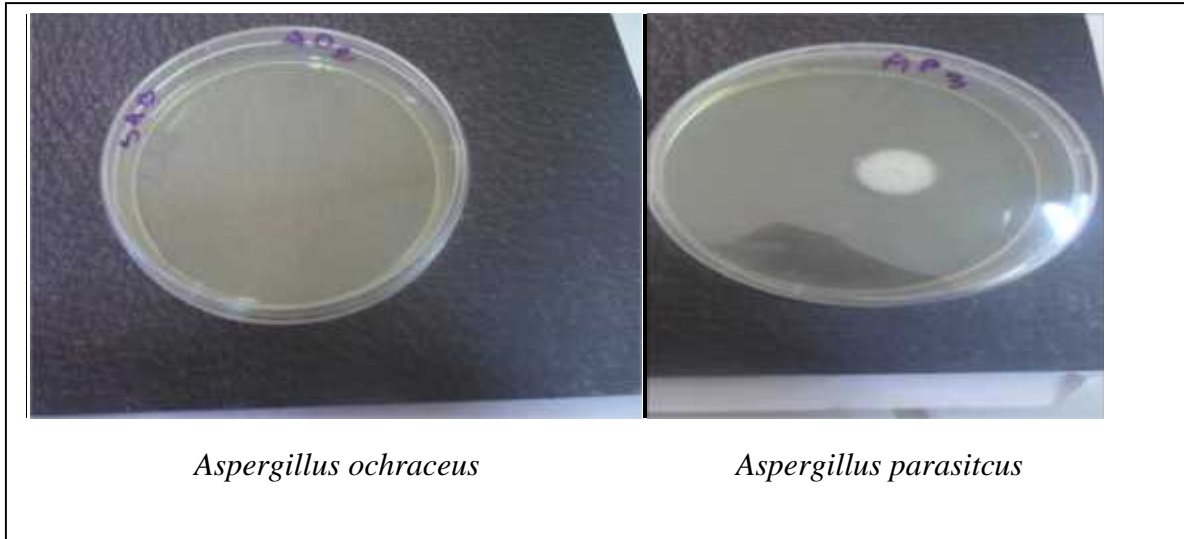


Photo 5 (originale) (CMF=5ul/ml)



Photo 6 (originale) (CMF=>20ul/ml)

ANNEXE N°2 : Les plages de la densité optique et la taille de l'inoculum pour les moisissures communes et rares

Species	OD Range (%T) ^a	10 ⁶ CFU/mL Range
<i>A. nidulans</i>	0.09–0.11 (80–82)	1.1–2
<i>A. flavus</i>	0.09–0.11 (80–82)	0.4–4
<i>A. fumigatus</i>	0.09–0.11 (80–82)	0.6–5
<i>A. terreus</i>	0.09–0.11 (80–82)	0.9–5
<i>Bipolaris hawaiiensis</i>	0.2–0.3	0.07–0.4
<i>B. spicifera</i>	0.2–0.3	0.3–3
<i>Cladophialophora bantiana</i>	0.15–0.17 (68–70)	0.4–3.1
<i>Dactylaria constricta</i>	0.15–0.17 (68–70)	0.4–1
<i>Fusarium oxysporum</i>	0.15–0.17 (68–70)	0.8–5
<i>F. solani</i>	0.15–0.17 (68–70)	0.5–5.9
<i>Paecilomyces lilacinus</i>	0.09–0.13	0.8–2.3
<i>P. variotii</i>	0.09–0.11 (80–82)	ND
<i>Scedosporium apiospermum</i>	0.15–0.17	0.4–3.2
<i>R. arrhizus</i>	0.15–0.17	0.4–2.6
<i>S. prolificans</i>	0.15–0.17	0.6–1.7
<i>S. schenckii</i>	0.09–0.11	
<i>Trichoderma longibrachiatum</i>	0.09–0.11	0.7–2.3
<i>Wangiella dermatitidis</i>	0.15–0.17	1.2–3.7

^a %T = percent transmission.

Source : Espinel-Ingroff et Cantón, 2007

ANNEXE 3 : Composition du milieu de culture RPMI-1640, Sigma R6504

Composé	g/L
L-Arginine [Free Base]	0.2
L-Asparagine [Anhydrous]	0.05
L-Aspartic Acid	0.02
L-Cystine·2HCl	0.0652
L-Glutamic Acid	0.02
L-Glutamine	0.3
Glycine	0.01
L-Histidine [Free Base]	0.015
Hydroxy-L-Proline	0.02
L-Isoleucine	0.05
L-Leucine	0.05
L-Lysine·HCl	0.04
L-Methionine	0.015
L-Phenylalanine	0.015
L-Proline	0.02
L-Serine	0.03
L-Threonine	0.02
L-Tryptophan	0.005
L-Tyrosine·2Na·2H ₂ O	0.02883
L-Valine	0.02
Biotin	0.0002
Choline Chloride	0.003
Folic Acid	0.001
myo-Inositol	0.035
Niacinamide	0.001
D-Pantothenic Acid Hemicalcium	0.00025
PABA	0.001
Pyridoxine·HCl	0.001
Riboflavin	0.0002
Thiamine·HCl	0.001
Vitamin B12	0.000005
Calcium Nitrate·4 H ₂ O	0.1
Magnesium Sulfate [Anhydrous]	0.04884
Potassium Chloride	0.4
Sodium Chloride	6.0
Sodium Phosphate Dibasic [Anhydrous]	0.8
D-Glucose	2.0
Glutathione, Reduced	0.001
Phenol Red·Na	0.0053

Préparation du RPMI 1640:

-10.4 g de poudre RPMI 1640,

-34.53 g de Tampon MOPS,

-1 L d'eau distillée,

-Ajuster le pH à 7.0

