

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

République Algérienne Démocratique et Populaire

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

Université Ibn Khaldoun – Tiaret

Faculté des Sciences de la nature et de la vie

Département Sciences de la Nature et de la Vie



THÈSE

Présentée par M. BOUFARES KHALED

Pour l'obtention du grade de

DOCTEUR EN SCIENCES BIOLOGIQUES

Option : Biotechnologies végétales appliquées à l'amélioration des plantes

Thème

**Extraction et étude phytochimique des huiles essentielles
de certaines plantes steppiennes et évaluation de leur efficacité
comme biopesticides**

Soutenue le : 05 / 03 / 2020

Devant le jury composé de :

M. Dellal Abdelkader	Professeur	Président	Univ. Tiaret
M. Belkhodja Moulay	Professeur	Examineur	Univ. Oran 1
M. Beghalia Mohamed	Professeur	Examineur	Univ. Tissemsilt
M ^{me} . Ayache Abbassia	Maître de conférences	Examinatrice	Univ. Sidi-Bel-Abbes
M. Kouadria Mostefa	Maître de conférences	Examineur	Univ. Tiaret
M. Hassani Abdelkrim	Professeur	Directeur de thèse	Univ. Tiaret

Remerciements

Cette thèse qui vise l'obtention du diplôme de docteur d'État en sciences biologiques, a été conduite à terme grâce à la précieuse contribution scientifique, matérielle et morale de plusieurs personnes. Qu'il me soit permis de les remercier : Je voudrais exprimer ma profonde gratitude à mon directeur de thèse, le professeur Hassani Abdelkrim, merci d'avoir cru en ce projet bien plus que courageux, voire même téméraire. Ça a été un immense privilège d'avoir bénéficié de votre immense expérience et de vos conseils toujours bien avisés.

Je tiens à remercier le professeur Belkhodja Moulay (Univ Oran 1), le professeur Beghalia Mohamed (Univ Tissemsilt), Madame la professeure Ayache Abbassia (Univ Sidi-Bel-Abbes) pour avoir accepté d'examiner le travail. Toutes vos remarques et suggestions feront que ce document sera encore meilleur.

Un grand merci au professeur Dellal Abdelkader pour toutes les facilités dont j'ai pu bénéficier tout au long du parcours. Également, je tiens à remercier professeur Kouadria Mostefa, je lui exprime toute mon amicale et immense reconnaissance de m'avoir accueilli dans son équipe avec gentillesse et bienveillance.

Également, ce travail m'a permis de réaliser de nombreuses collaborations très enrichissantes, ainsi, je tiens à remercier Messieurs Ait Hamou M, et Zedak M, Guemour D, pour votre disponibilité et pour toute l'aide que vous m'avez accordée pour mener à terme ce travail.

Je tiens à remercier vivement tous les tradipraticiens et toutes les personnes qui ont gentiment accepté de partager leurs expériences et leurs connaissances sur les plantes médicinales et leurs modes d'utilisation.

Je tiens à remercier tous les étudiants en fin de cycle que j'ai eu le plaisir d'encadrer.

La gratitude et l'admiration que je porte pour Messieurs Berrayah M, Adda A, tous Professeurs à l'université de Tiaret. Chacun par sa rigueur et son abnégation m'a apporté son précieux soutien et son savoir-faire dans l'accomplissement de cette œuvre combien noble.

Je tiens à remercier toute ma famille et mes amies, pour leur soutien inconditionnel.

Au final, je tiens à remercier toute personne ayant participé de près et de loin à ce travail.

Dédicace

À toutes les personnes qui me sont chères...

Table des matières

Liste des abréviations	i
Liste des tableaux	ii
Liste des figures	iii
Introduction	1

Synthèse bibliographique

Chapitre 01 : L'usine végétale	4
1. L'usine végétale	4
2. Les métabolites synthétisés par les plantes	5
2.1. Métabolites primaires	5
2.2. Métabolites secondaires	5
2.2.1. Les alcaloïdes	6
2.2.2. Les composés phénoliques	7
2.2.3. Les terpénoïdes.....	8
2.2.3.1. Les huiles essentielles	9
3. Voies de biosynthèse des huiles essentielles.....	10
3.1. Organisation générale des voies de biosynthèse	10
4. Sécrétion et stockage des HE	13
5. Techniques d'extraction des huiles essentielles	15
5.1. Entraînement à la vapeur d'eau	15
5.2. Hydrodistillation.....	16
5.3. Extraction par solvants volatils	17
5.4. Extraction par micro-ondes	18
5.5. Extraction par CO ₂ à l'état supercritique	20
6. Composition et propriétés physico-chimiques	22
6.1. Préservation des huiles essentielles	25
6.2. Chémotype ou chimiotype.....	25
7. Propriétés biologiques et pharmacologiques	26
7.1. Propriétés antimicrobiennes	26
7.1.1. Méthodes d'étude de l'activité antimicrobienne des HE.....	27
7.1.1.1. Méthode en micro-atmosphère (technique en phase vapeur).....	27
7.1.1.2. Méthodes par diffusion sur milieux solides.....	28
7.1.1.2. a) Méthode des disques.....	28
7.1.1.2. b) Méthode des puits	29

7.1.1.3. Méthodes sur milieux liquide	30
7.1.1.3. a) Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) ..	31
7.1.1.3. b) Détermination de la concentration minimale bactéricide (CMB)	33
Chapitre 02 : Les plantes et leur environnement	34
1. La plante et les facteurs de l'environnement.....	34
1.1. Les facteurs d'altération des cultures.....	34
1.1.1. Maladies non parasitaires (facteurs abiotiques).....	34
1.1.2. Maladies parasitaires et ravageurs (facteurs biotiques)	35
1.1.3. Agents phytopathogènes	37
1.1.3.1. Bactéries phytopathogènes	38
1.1.3.2. Champignons phytopathogènes	38
1.2. Généralités sur la tuberculose d'olivier	39
1.2.1. Symptômes de la tuberculose de l'olivier	39
1.2.2. Description de l'agent pathogène	41
1.2.3. Cycle biologique l'agent pathogène	42
1.3. Généralités sur les fusarioses de la tomate.....	42
1.3.1. Symptômes de la fusariose racinaire	43
1.3.2. Description de l'agent pathogène	45
1.3.3. Cycle biologique l'agent pathogène	46
2. Défenses préexistantes de la plante	48
Partie expérimentale	
Chapitre 01 : Matériel et méthodes	49
1. Zone d'étude	49
2. Systématique et description botanique des espèces étudiées.....	50
2.1. Cupressus sempervirens	50
2.1.1. Description.....	51
2.1.2. Répartition du Cyprès commun en Algérie	52
2.1.3. Intérêt économique et écologique	52
2.2. Genévrier de Phénicie	53
2.2.1. Description.....	53
2.2.2. Répartition du genévrier de Phénicie en Algérie	54
2.2.3. Intérêt économique et écologique	54
2.3. Genévrier oxycèdre.....	55
2.3.1. Description.....	55

2.3.2. Répartition du Genévrier oxycède en Algérie	56
2.3.3. Intérêt économique et écologique	57
2.4. Thuya de Berbérie	57
2.4.1. Description	58
2.4.2. Répartition du thuya de Berbérie en Algérie	58
2.4.3. Intérêt économique et écologique	59
2.5. Collecte des échantillons de plantes	59
2.6. Extraction des huiles essentielles	60
2.6.1. Calcul du rendement	62
3. Analyses des propriétés physico-chimiques des HE	62
3.1. Mesures physiques	63
3.1.1. Densité	63
3.1.2. Indice de réfraction	63
3.1.3. Pouvoir rotatoire	64
3.1.4. Caractéristique organoleptique	64
3.2. Analyses chromatographiques	65
3.2.1. Chromatographie en phase gazeuse	65
4. Méthodes microbiologiques	67
4.1. Activité antibactérienne	67
4.1.1. Préparation de l'inoculum	67
4.1.2. Méthode de contact indirect aromatogramme	67
4.1.3. Méthode de dilution en milieu liquide	69
4.1.3.1. Détermination de la concentration minimale bactéricide (CMB) en milieu solide	70
4.2. Activité antifongique	71
5. Analyse statistique	72
Chapitre 02 : Résultats et discussion	73
1. Résultats de l'étude des huiles essentielles	73
1.1. Rendement des huiles essentielles	73
1.2. Analyses des propriétés physico-organoleptiques	74
1.3. Analyse de la composition chimique des huiles essentielles	77
2. Activité antibactérienne	83
2.1. Criblage de l'activité antibactérienne (Aromatogramme)	83
2.1.1. Détermination des CMI et CMB	85

2.1.2. Caractérisation du mode d'action des huiles essentielles.....	88
3. Activité antifongique.....	90
3.1. Criblage de l'activité antifongique des HE	90
4. Discussion.....	93
Conclusion	96
Listes des Annexes	99
Références bibliographiques	101

Resume

La protection des cultures contre les bio-agresseurs est une composante principale dans la gestion des cultures. Or, depuis plusieurs décennies, la lutte chimique conventionnelle exerce une pression sur l'environnement et affiche ses limites d'application. L'objectif de cette recherche est de valoriser les composés actifs tels que les huiles essentielles en les exploitant dans la lutte phytosanitaire naturelle à travers la détermination de leur composition chimique et de mettre en évidence certaines de leurs activités antimicrobiennes.

À cet effet, l'extraction des huiles essentielles a été effectuée par hydrodistillation et les rendements en huiles obtenus varient de 0,4 % à 0,91 %, avec un meilleur rendement pour *C. sempervirens*. Les analyses chromatographiques ont révélé une richesse en molécules chimiques diversifiées. Toutefois, la composition chimique de *J. phoenicea*, *J. oxycedrus* et *C. sempervirens* est largement dominée par les monoterpènes à des taux supérieurs à 34 % avec α -pinène comme constituant majoritaire. Par ailleurs, les résultats de l'activité antibactérienne ont montré une activité significative exercée par l'ensemble des essences, une supériorité est remarquée chez l'huile essentielle de *J. phoenicea* par rapport à celles des autres espèces, où la plus faible valeur de la CMI a été obtenue avec une valeur de 1.25 mg/mL, suivi par *C. sempervirens* et *J. oxycedrus* qui ont montré une activité antibactérienne similaire et modérée (CMI = 10 mg/mL), par contre l'huile essentielle de *T. articulata* a été la moins efficace avec une CMI = 40 mg/mL. S'agissant du rapport CMB/CMI, les résultats indiquent que l'ensemble des huiles essentielles testées sont bactéricides. D'autre part, l'effet d'inhibition de la croissance mycélienne a été très significatif pour les huiles essentielles de *J. phoenicea* et *J. oxycedrus*, avec des taux respectifs de 68% et 63%, les moins efficaces sont celles du *Cupressus sempervirens* et *Tétracelinis articulata*.

Ces propriétés antimicrobiennes, seraient dues à la richesse de ces essences en composés bioactifs tels que les terpénoïdes, les polyphénols et les alcaloïdes connus pour leur implication dans l'autodéfense des végétaux. Par conséquent, l'effet inhibiteur de ces huiles sur le développement microbien laisse entrevoir des perspectives d'application comme alternative aux composés de synthèse pour lutter contre les microorganismes phytopathogènes.

Mots clés : Biopesticide, Huiles essentielles, Effet antimicrobien, Cupressaceae, Chromatographie, Hydrodistillation, Pseudomonas, Fusarium.

المخلص : تعد حماية النباتات ضد الافات عنصراً رئيسياً في إدارة المحاصيل ، اين فرض استعمال المبيدات الكيميائية التقليدية لعدة عقود تأثير سلبي على البيئة وبرز عن تباين واضح حول مدى نجاعتها . و عليه فهدفنا من هذا البحث هو تميم المركبات النشطة مثل الزيوت الأساسية من خلال استغلالها كبديل لمعالجة النباتات ، تحديد تركيبها الكيميائي وتسلط الضوء على بعض أنشطتها المضادة للميكروبات. لهذا الغرض ، تم استخلاص الزيوت الأساسية بطريقة التقطير. اين تم تسجيل فروقات في مردودية الزيوت المحصل عليها من 0.4% إلى 0.91% ، مع مردودية أكبر لـ *C. sempervirens*. كما كشفت التحليل الكروماتوغرافي عن ثراء في التركيبة الكيميائية لمختلف الزيوت مع تسجيل تقارب في التركيب الكيميائي لكل من *J. phoenicea* و *J. oxycedrus* و *C. sempervirens* اين لاحظنا سيطرة المونوتربينات بمستويات تزيد عن 34% مع α -pinene كمواد رئيسية. زيادة على ذلك ، أظهرت نتائج النشاط المضاد للبكتيريا فعالية كبيرة لجميع الزيوت العطرية المستخلصة ، مع تفوق لـ *J. phoenicea* مقارنةً بالأنواع الأخرى ، حيث تم الحصول على أدنى قيمة للتركيز الأدنى المثبط $CMI = 1.25 \text{ mg/mL}$ ، تليها *C. sempervirens* و *J. oxycedrus* ، والتي أظهرت نشاط مضاد للجراثيم مماثل ومعتدل ($CMI = 10 \text{ mg/mL}$) ، في حين أن *T. articulata* كان الأقل فعالية مع $CMI = 40 \text{ mg/mL}$. فيما يخص معامل CMB/CMI ، اشارت النتائج إلى أن جميع الزيوت الأساسية التي تم اختبارها ذات فعالية مبيدة للجراثيم. من ناحية أخرى ، كان تأثير تثبيط نمو الفطريات مرتفع بالنسبة للزيوت الأساسية لـ *J. phoenicea* و *J. oxycedrus* ، بنسبة 68% و 63% على التوالي ، والأقل فعالية هي تلك الخاصة بـ *Cupressus sempervirens* و *Tetraclinis articulata*.

ترجع هذه الخصائص المضادة للميكروبات إلى ثراء هذه الزيوت العطرية بمركبات نشطة بيولوجياً مثل تيربينويد والبوليفينول والقلويات المعروفة بمساهمتها في الحماية الذاتية للنباتات . لذلك ، فإن التأثير المثبط لهذه الزيوت على نمو الميكروبات يفتح المجال إلى إمكانية استعمالها كبديل للمبيدات الكلاسيكية لحماية النباتات من الميكروبات الممرضة

الكلمات المفتاحية : المبيدات الحيوية ، الزيوت الأساسية ، تأثير مضادات الميكروبات ، سرويات (فصيلة)، الكروماتوغرافيا ، استخراج بالتقطير ، بسودوموناس ، الفيزاريوم.

Abstract

Crop protection against bio-aggressors is a key component in crop management. However, for several decades, conventional chemical control has put pressure on the environment and shows its limits of application. The objective of this research is to valorize the active compounds such as the essential oils by exploiting them in the natural phytosanitary control through the determination of their chemical composition and to highlight some of their antimicrobial activities.

For this purpose, the extraction of the EO was carried out by hydrodistillation and the yields of oils obtained vary from 0.4% to 0.91%, with a better yield for *C. sempervirens*. The chromatographic analyses revealed a richness in diversified chemical molecules. However, the chemical composition of *J. phoenicea*, *J. oxycedrus* and *C. sempervirens* is largely dominated by monoterpenes at levels greater than 34% with α -pinene as the major constituent. Moreover, the results of the antibacterial activity showed a significant activity exerted by all the species, a superiority is noticed in the essential oil of *J. phoenicea* compared to those of the other species, where the lowest value of the MIC was obtained with a value of 1.25 mg / mL, followed by *C. sempervirens* and *J. oxycedrus*, which showed similar and moderate antibacterial activity (MIC = 10 mg / mL), whereas the essential oil of *T. articulata* was the least effective with a MIC of 40 mg / mL. As for the CMB / MIC ratio, the results indicate that all the essential oils tested are bactericidal. On the other hand, the effect of inhibition of mycelial growth was very significant for the essential oils of *J. phoenicea* and *J. oxycedrus*, with 68% and 63% respectively, the least effective are those of *Cupressus sempervirens* and *Tetraclinis articulata*.

These antimicrobial properties are due to the richness of these species in bioactive compounds such as terpenoids, polyphenols and alkaloids known for their involvement in the self-defense of plants. Therefore, the inhibitory effect of these oils on microbial growth suggests prospects for application as an alternative to synthetic compounds for controlling phytopathogenic microorganisms.

Keywords: Bio-insecticide, Essential oils, Antimicrobial effect, Cupressaceae, Chromatography, Hydrodistillation, *Pseudomonas*, *Fusarium*

Liste des abréviations

∅	Diamètre d'inhibition
AFNOR	Association Française de Normalisation
BN	bouillon nutritif
CC	Chromatographie sur colonne ouverte
CCM	Chromatographie en couche mince
CLHP	Chromatographie liquide haute performance,
CMB	Concentration Minimale Bactéricide
CMI	Concentration Minimale Inhibitrice
CPG	Chromatographie en phase gazeuse
CPG-SM	Chromatographie en phase gazeuse couplée à un spectromètre de masse
Desf.	Desfontaines (botaniste)
DMF	Diméthyl formamide
DMSO	Diméthylsulfoxyde
DMSO	Sulfoxyde de diméthyle
DO	Densité optique
EDS	Eau distillée stérile
f. sp.	Forma specialis (plural ff. spp.)
FAO	Food and Agriculture Organization of the United Nations.
H.E	Huile Essentielle
ISO	Organisation Internationale de Normalisation.
MHA	Müeller-Hinton Agar
MHB	Müeller-Hinton Broth
PDA	Potato Dextrose Agar
pv.	pathovar groupe de bactéries phytopathogènes
RM	Rouge de méthyle
RMN	Résonance magnétique nucléaire
SM	Spectromètre de masse
sp.	Species singular (espèce).
spp.	Species plural (espèces).
OMS	Organisation mondiale de la Santé
UFC	Unités formant Colonie
var.	Variété.

Liste des tableaux

Tableau 1 : Principales familles de constituants des huiles essentielles.	24
Tableau 2 : Classification des ennemis des cultures.....	37
Tableau 3 : Rendement des plantes utilisées en huiles essentielles.	73
Tableau 4 : Résultats de l'analyse de la variance pour le rendement des plantes utilisées.	73
Tableau 5 : Caractéristiques physiques et organoleptiques des huiles essentielles.	75
Tableau 6 : Composition chimique des HE des feuilles sèches de différentes espèces étudiées.	79
Tableau 7 : Résultats de l'analyse de la variance pour test de l'activité antibactérienne générée par les HEs des différentes espèces.....	84
Tableau 8 : Tests de détermination de la CMI et de la CMB des huiles essentielles.	85

Liste des figures

Figure 1 : Structure chimique de quelques métabolites secondaires.....	9
Figure 2 : Élaboration naturelle des molécules aromatiques.	11
Figure 3 : Localisation cellulaire des principales voies de synthèse des composés organique volatils chez les végétaux.	12
Figure 4 : Diversité des structures de sécrétion des huiles essentielles.	14
Figure 5 : Résumé du principe de la distillation à la vapeur d'eau.....	16
Figure 6 : Principe schématisé de l'appareillage d'hydro distillation.....	17
Figure 7 : Représentation schématique d'un extracteur de Soxhlet.	18
Figure 8 : Schéma de principe d'extraction par micro-ondes.	20
Figure 9 : Schéma du procédé d'extraction au CO ₂ supercritique.	21
Figure 10 : Étude de l'activité antimicrobienne par la méthode micro-atmosphère.....	28
Figure 11 : Étude de l'activité antimicrobienne par la méthode de diffusion sur milieux solides (méthode des disques et méthode des puits).	30
Figure 12 : Méthode de détermination de la CMI en milieu liquide.	32
Figure 13 : Détermination de la CMB en milieu solide.	33
Figure 14 : Principales causes des maladies non parasitaires (abiotiques).....	35
Figure 15 : Schéma de l'environnement biotique des plantes.	36
Figure 16 : Tumeurs dues au <i>Pseudomans savastanoi</i> sur les branches et les rameaux (a), le tronc (b), et feuille (c).	40
Figure 17 : Symptômes de la Fusariose vasculaire sur la tomate.	44
Figure 18 : Cycle de vie du <i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>lycopersici</i>	47
Figure 19 : Localisation géographique des stations de prélèvement des échantillons de plantes.....	50
Figure 20 : Photographies des différentes parties du <i>C. sempervirens</i> (feuilles, fruits, rameaux).	52
Figure 21 : Photographies des différentes parties du <i>J. phoenicea</i> (feuilles, fruits, rameaux).	54

Figure 22 : Photographies des différentes parties du <i>J. oxycedrus</i> (feuilles, fruits, rameaux).	56
Figure 23 : Photographies des différentes parties du <i>T. articulata</i> (feuilles, fruits, rameaux).	58
Figure 24 : Protocole expérimental.....	60
Figure 25 : Montage de l'hydrodistillation utilisé.	61
Figure 26 : Schéma simplifié de différents modules du chromatographe en phase gazeuse.	66
Figure 27 : Photographie d'un chromatographe en phase gazeuse.	66
Figure 28 : Illustration de la méthode des aromagrammes sur boîte de Pétri.....	68
Figure 29 : Etapes de la méthode des aromagrammes sur boîte de Pétri.....	69
Figure 30 : Méthode de détermination de la CMI en milieu liquide.	70
Figure 31 : Méthode de détermination de la CMB en milieu solide.	71
Figure 32 : Profils chromatographiques de l'huile essentielle de <i>Juniperus oxycedrus</i> . ..	77
Figure 33 : Profils chromatographiques de l'huile essentielle de <i>Juniperus phoenicea</i> . ..	78
Figure 34 : Profils chromatographiques de l'huile essentielle de <i>Cupressus sempervirens</i>	78
Figure 35 : Profils chromatographiques de l'huile essentielle de <i>Tetraclinis articulata</i> . ..	78
Figure 36 : Structures chimiques des composés majoritaires identifiés dans les HE de différentes espèces.....	81
Figure 37 : Activité antibactérienne des HE évaluée par la méthode de diffusion par disque.....	83
Figure 38 : Activités antibactériennes des HE des différentes espèces.....	84
Figure 39 : Tests de détermination de la CMI, CMB et la nature de l'activité antibactérienne des huiles essentielles.....	86
Figure 40 : Activités antifongiques des HE des différentes espèces en fonction de la concentration appliquée	91
Figure 41 : Photos des zones d'inhibitions des HE sur <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i>	91

Introduction

INTRODUCTION

L'utilisation des pesticides est une des composantes de la fabuleuse progression des rendements observée au cours des dernières décennies. Cette utilisation de produits chimiques pour lesquels des compromis sur la sécurité pour l'homme et l'environnement ont été considérés comme inévitables pose actuellement problème et leur impact a certainement été insuffisamment estimé. Parmi les conséquences les plus directes, citons l'apparition de résistances des bio-agresseurs, l'appauvrissement de la faune auxiliaire utile, entraînant de graves perturbations au niveau des équilibres biocénotiques, ainsi qu'une contamination de l'environnement et l'apparition de résidus toxiques dans les denrées récoltées ou leurs produits de transformation (Descoins, 1991).

Face à l'inquiétude et à la méfiance accrue des consommateurs et agriculteurs suscitée par l'usage des pesticides synthétiques dérivés de l'industrie chimique, et suivant les recommandations de l'OMS, (2007) en faveur de leur élimination, et la recherche d'alternatives inoffensives et non polluantes, un regain d'intérêt pour l'utilisation des biopesticides, autrefois relativement marginaux sur le plan de l'importance commerciale (Philogène, et al., 2008), laisse percevoir des espoirs de développement beaucoup plus généralisé, et mieux évalué scientifiquement.

Les plantes ont, par sélection naturelle au cours de l'évolution, développé des mécanismes d'adaptation aux conditions environnementales variées, de pressions de sélection, exercées par les agents pathogènes et les prédateurs. Ces mécanismes adaptatifs sont aussi le résultat d'associations bénéfiques entre espèces. Faune et flore ont co-évolué, les individus les mieux adaptés et les plus aptes à survivre transmettant les meilleurs gènes (Deshayes, 1991). Il existe donc, à l'intérieur de chaque plante une réserve, de substances naturelles bioactive, avec des fonctions différentes, cela peut être un moyen de défense contre des parasites ou autres agresseurs, une technique pour empêcher la croissance d'autres plantes à proximité et donc lui assurer une bonne nutrition, ou comme moyen de croissance ou pour le renouvellement de l'espèce (Quiret, 2008). L'étude de ces interactions peut être une nouvelle source d'informations sur les activités biologiques des substances végétales et pourrait être favorisée en recherche pharmacologique.

La connaissance des remèdes traditionnels déterminés empiriquement, ainsi que les récentes découvertes des activités antimicrobiennes, des huiles essentielles, parallèlement à une meilleure connaissance de leur action, constituent actuellement une base de données très importante pour servir à un développement scientifique rigoureux inhérent à la lutte biologique par l'utilisation de ces substances naturelles.

Par ailleurs, de par leur situation géographique particulière, les régions steppiques algériennes, avec leur climat caractéristique, sont dotées d'une biodiversité végétale riche avec une panoplie de plantes aromatiques et médicinales dont un grand nombre est endémique (Benkhattou, et al., 2016). Ces ressources floristiques sont très importantes, dans la valorisation de certaines terres marginales inadaptées à d'autres cultures et constituent un patrimoine par leur diversité et la richesse de leurs dérivés, ces précieux bio-dérivés sont la source d'une formidable diversité de molécules, possédant parfois des propriétés thérapeutiques, mais servant aussi de modèles à l'imagination des chimistes, pour créer des molécules plus actives. Seule une poignée de ces richesses a été explorée et font actuellement l'objet d'un fort regain d'intérêt en vue de nouvelles applications (Boufares, et al., 2019).

L'extraction et la production de molécules bioactives à partir de ces plantes, peut constituer un moyen de valorisation de ces espèces et extériorise leur potentiel.

L'objectif de ce présent travail de thèse s'inscrit dans le cadre de la valorisation des espèces végétales non cultivées dites spontanées telles les plantes steppiques riches en substances naturelles pouvant représenter une alternative aux produits chimiques utilisés en phytoprotection. Ainsi cette étude vise à l'analyse des propriétés phytothérapeutiques notamment l'activité antimicrobienne des huiles essentielles de quelques espèces de Cupressaceae à savoir : le Cyprès commun (*Cupressus sempervirens*), le Genévrier rouge (*Juniperus phoenicea*), le Genévrier cade (*Juniperus oxycedrus*), et le Thuya de Berberie (*Tetraclinis articulata*), collectées dans à la région sud de Tiaret.

Pour ce faire, ce travail comportera deux grandes parties.

- ◆ Dans la première partie, les bases bibliographiques, sur lesquelles s'est construit le projet de recherche, sont exposées tels que quelques exemples de l'incroyable diversité des composés secondaires et des utilisations pharmacologiques que l'homme en a fait auxquels, succèdent des observations pouvant permettre de

supposer un rôle écologique de défense des plantes contre les différents types de bio-agresseurs. Et enfin quelques caractéristiques des espèces choisies comme modèle d'étude sont présentées, soulignant leurs caractéristiques systématiques et morphologiques.

- ◆ La deuxième partie débute par un chapitre sur la méthodologie de travail adoptée avec le matériel végétal et les différentes analyses effectuées (analyse phytochimique et activités biologiques des huiles essentielles des espèces étudiées, ainsi que l'identification de quelques molécules responsables des activités) puis un deuxième chapitre qui traite de l'interprétation des résultats obtenus et de leur discussion par rapport à des travaux publiés antérieurs au notre et enfin la conclusion ainsi que des perspectives offertes par ce travail sont envisagées.

***Synthèse* bibliographique**

Chapitre 01 :

L'usine végétale

Synthèse bibliographique

Chapitre 01 : L'usine végétale

1. L'usine végétale

Tous les êtres vivants possèdent un réseau de réactions chimiques interdépendantes que l'on désigne globalement par le terme de métabolisme. Ces cascades de réactions sont médiées par des enzymes, elles permettent de répondre à deux exigences vitales qui caractérisent le vivant : extraire de l'énergie de son environnement et synthétiser des molécules simples servant ensuite à la synthèse des macromolécules, constituants indispensables des cellules (Bouzillé, 2014).

Toutes ces réactions de base se retrouvent d'une façon générale dans tout le règne vivant, quel que soit l'organisme considéré. On les regroupe sous le terme de métabolisme primaire. Sa principale caractéristique est qu'il n'est pas spécifique aux organismes qui l'utilisent. On distingue l'**anabolisme** qui correspond à la biosynthèse de métabolites et consomme de l'énergie, et le **catabolisme** qui désigne les réactions de dégradation générant de l'énergie (ATP, NADH, FADH). (Daniel, et al., 2018).

Comme le fait remarquer le professeur Jean-Louis Guignard dans Biochimie végétale (2004), la plante est une véritable « usine chimique » capable de faire en même temps de la « chimie lourde » (amidon, cellulose) et de la « chimie fine » (stérols, acides gras, polyphénols). Grâce à son autotrophie, la plante synthétise des molécules organiques complexes à partir d'éléments inorganiques simples.

Les végétaux sont aussi capables de synthétiser des molécules aussi diverses que complexes et qui ne semblent pas jouer un rôle déterminant dans l'économie de l'organisme qui les produit. Ces molécules que l'on nomme métabolites secondaires ont comme précurseurs des dérivés du métabolisme primaire (Bruneton, 2016).

2. Les métabolites synthétisés par les plantes

Les plantes synthétisent une large gamme de substances, qui ont été subdivisées en deux groupes : les métabolites primaires et les métabolites secondaires. Le métabolisme primaire, qui permet à l'organisme d'assurer sa croissance, sa survie et son développement, du métabolisme secondaire, qui permet à l'organisme d'interagir avec son environnement (communication, défense, adaptation) (Daniel, et al., 2018).

Il est bien sûr impensable de présenter dans le cadre de cette thèse un exposé détaillé des différents types de substances synthétisés par les plantes. Tout au plus, les pages qui suivent tracent un aperçu non exhaustif de différents composés rencontrés, de leur rôle lorsqu'il est connu, de leur activité biologique et de leur utilisation.

2.1. Métabolites primaires

On considère souvent d'une façon globale que les métabolites primaires sont communs à tous les êtres vivants (des polymères de haut poids moléculaire comme : les acides nucléiques, les protéines, les glucides, les acides gras, etc.), ce sont des composés issus du métabolisme primaire, par la voie du cycle de Krebs (Croteau, et al., 2000).

Les métabolites primaires sont produits en énormes quantités par les végétaux, car ils sont essentiels à leur croissance et survie et représentent environ 90 % de la matière biologique. Tous les animaux dépendent de ces ressources que seul le monde végétal a la capacité de produire (on parle de production primaire) (Tourte, et al., 2005).

2.2. Métabolites secondaires

Une des originalités majeures des végétaux réside dans leur capacité à produire des substances naturelles très diversifiées. En effet, à côté des métabolites primaires classiques (glucides, protides, lipides, acides nucléiques), ils synthétisent et accumulent fréquemment des molécules de petit poids moléculaire dits « métabolites secondaires ». La notion de « métabolite secondaire » résultait initialement de trois groupes d'observations : d'abord une difficulté à attribuer à ces métabolites une fonction précise dans la physiologie même de la plante, ensuite une répartition très inégale selon les végétaux, quelquefois entre des espèces très voisines ou même entre différentes sous-espèces ou variétés à l'intérieur d'une même espèce, enfin une certaine

« inertie biochimique » car ces substances sont rarement remobilisées dans la plante après qu'elles y ont été accumulées (Tourte, et al., 2005).

Les métabolites secondaires sont biosynthétisés à partir de métabolites primaires et ont la particularité d'être présentes à faibles concentrations dans les plantes, et ne sont pas communs à toutes les plantes mais plutôt plus spécifiques des genres, voire des espèces (terpénoïdes, stéroïdes, polycétides, dérivés phénoliques, peptides particuliers) (Croteau, et al., 2000).

Même si nous ne connaissons pas toujours leur finalité exacte, il est cependant clair qu'ils interviennent dans les relations qu'entretient la plante avec les organismes vivants qui l'entourent. Ils sont probablement des éléments essentiels de la coévolution des plantes avec les organismes vivants, tels que parasites, pathogènes et prédateurs, mais aussi pollinisateurs et disséminateurs. (Krief, 2003). Elles sont impliquées dans des stratégies de survie et de communication qui compensent l'apparente immobilité du végétal. (Macheix, et al., 2005).

Outre leurs implications dans le fonctionnement des végétaux, ces molécules représentent une source importante de substances intéressantes pour l'Homme. Leurs applications concernent des domaines aussi variés tels que les principes actifs pharmaceutiques, les produits cosmétiques et les additifs alimentaires (Croteau, et al., 2000).

En fonction de leurs structures, les métabolites secondaires sont divisés en trois grands groupes : les alcaloïdes, les composés phénoliques et les terpénoïdes.

2.2.1. Les alcaloïdes

Les alcaloïdes forment un groupe important de substances naturelles d'intérêt thérapeutique par leur diversité structurale et l'éventail de leurs propriétés pharmacologiques et médicinales (Raven, et al., 2015).

Les alcaloïdes sont des composés azotés alcalins produits par les plantes, parmi lesquels la morphine, la cocaïne, la caféine, la nicotine et l'atropine. En général, ces composés possèdent au moins un atome d'azote inclus dans un hétérocycle. Actuellement, les structures chimiques d'environ 16 000 alcaloïdes sont connues. Environ 20 % des espèces de plantes produisent des alcaloïdes. Les alcaloïdes ont en général une activité biologique et à ce titre, ils entrent dans la composition de nombreux

médicaments comme principes actifs. Les plantes les utilisent, essentiellement, pour lutter contre les herbivores et les microorganismes pathogènes car ces composés sont toxiques (Charrié, et al., 2017).

Ces structures azotées, plus ou moins basiques, sont issues au moins pour une partie du métabolisme des acides aminés (Bruneton, 2016).

Les molécules qui répondent à ces critères sont des alcaloïdes vrais tandis que d'autres qui n'y répondent que partiellement sont considérées comme des pseudo-alcaloïdes. C'est le cas des molécules qui ne sont pas issues du métabolisme des acides aminés (aconitine) ou les protoalcaloïdes : qui correspondent aux molécules dont l'atome d'azote n'est pas inclu dans un hétérocycle (éphédrine, colchicine) (Bruneton, 2016).

2.2.2. Les composés phénoliques

L'appellation "polyphénols" ou "composés phénoliques" regroupe un vaste ensemble de molécules (plus de 8000), divisé en une dizaine de classes chimiques qui présentent toutes un point commun : la présence dans leur structure d'au moins un cycle aromatique à 6 carbones, lui-même porteur d'un nombre variable de fonctions hydroxyles (OH). Il existe de nombreuses classes de polyphénols : quinones, stilbénoides, coumarines, acides-phénols, flavonoïdes, anthocyanes, tanins... (Macheix, et al., 2005). Ces structures peuvent également être acylées, glycosylées, ce qui donne une grande variété de structures et de polarités.

On connaît actuellement plusieurs milliers de composés phénoliques, un nombre qui augmente sans cesse et qui en fait un groupe chimique particulièrement important. La plupart d'entre eux sont caractéristiques des végétaux. Cependant, à titre plus exceptionnel, certains peuvent être présents chez les animaux, par exemple l'œstradiol, la plus importante des hormones de type œstrogène chez les Mammifères. Il faut également signaler que la tyrosine, acide aminé de nature phénolique, entre dans la composition des protéines chez tous les êtres vivants tout en étant également à l'origine de métabolites secondaires chez les végétaux (dont certains composés phénoliques et certains groupes d'alcaloïdes). Les produits d'oxydation et de polymérisation de la tyrosine conduisent par ailleurs, chez les champignons, les animaux et les plantes, à la formation des mélanines, pigments bruns ou noirs qui colorent la peau et les cheveux ainsi que la cuticule des insectes (Kalili, et al., 2011).

Le rôle des composés phénoliques est maintenant reconnu dans différents aspects de la vie de la plante et dans l'utilisation que fait l'homme des végétaux. Ils peuvent en effet intervenir :

- dans certains aspects de la physiologie de la plante (lignification, régulation de la croissance, interactions moléculaires avec certains microorganismes symbiotiques ou parasites ...) ;
- dans les interactions des plantes avec leur environnement biologique et physique (relations avec les bactéries, les champignons, les insectes, résistance aux UV), soit directement dans la nature soit lors de la conservation après récolte de certains végétaux ;
- dans les critères de qualité (couleur, astringence, amertume, qualités nutritionnelles ...) qui orientent les choix de l'homme dans sa consommation des organes végétaux (fruits, légumes, tubercules ...) et des produits qui en dérivent par transformation ;
- dans les variations de certaines caractéristiques des végétaux lors des traitements technologiques (préparation des jus de fruits, des boissons fermentées ...) pendant lesquels apparaissent fréquemment des brunissements enzymatiques qui modifient la qualité du produit fini ;
- dans la protection de l'homme vis-à-vis de certaines maladies en raison de leur interaction possible avec de nombreuses enzymes et de leurs propriétés antioxydantes (Macheix, et al., 2005).

2.2.3. Les terpénoïdes

Les terpénoïdes, appelés aussi terpènes, sont composés d'unités isoprène et comprennent les huiles essentielles, le taxol, le caoutchouc et les glycosides cardiotoniques, ils existent chez toutes les plantes et représentent de loin la plus vaste catégorie de métabolites secondaires, avec plus de 22 000 composés décrits (Daniel, et al., 2018). Le terpénoïde le plus simple est un hydrocarbure, l'isoprène (C₅H₈). On peut classer tous les terpénoïdes en fonction du nombre de leurs unités isoprène. Les monoterpénoïdes, avec deux unités isoprène, les sesquiterpénoïdes (trois unités) et les diterpénoïdes (quatre unités terpène) sont des catégories usuelles. Une même plante peut synthétiser beaucoup de terpénoïdes différents à différents endroits de l'organisme, dans des buts différents et à des stades différents de son développement

(Bouzillé, 2014). Les terpénoïdes jouent de multiples rôles chez les plantes. Certains sont des pigments photosynthétiques (les caroténoïdes) ou des hormones (les gibbérellines, l'acide abscissique), tandis que d'autres sont utilisés en tant que composants de la structure des membranes cellulaires (les stérols) ou transporteurs d'électrons (l'ubiquinone, la plastoquinone) (Raven, et al., 2015).

2.2.3.1. Les huiles essentielles

L'huile essentielle, ou essence végétale, se définit comme étant un ensemble de substances volatiles d'odeur tout à fait caractéristique sécrétés par une plante. Ce mélange complexe de diverses molécules (alcools, terpènes, cétones, etc.) est obtenu, soit par entraînement à la vapeur d'eau, soit par distillation sèche, soit par expression, par incision de la plante, ou bien parfois par séparation à l'aide de solvants, soit encore par adsorption sur des graisses (enfleurage) (Marouf, et al., 2015).

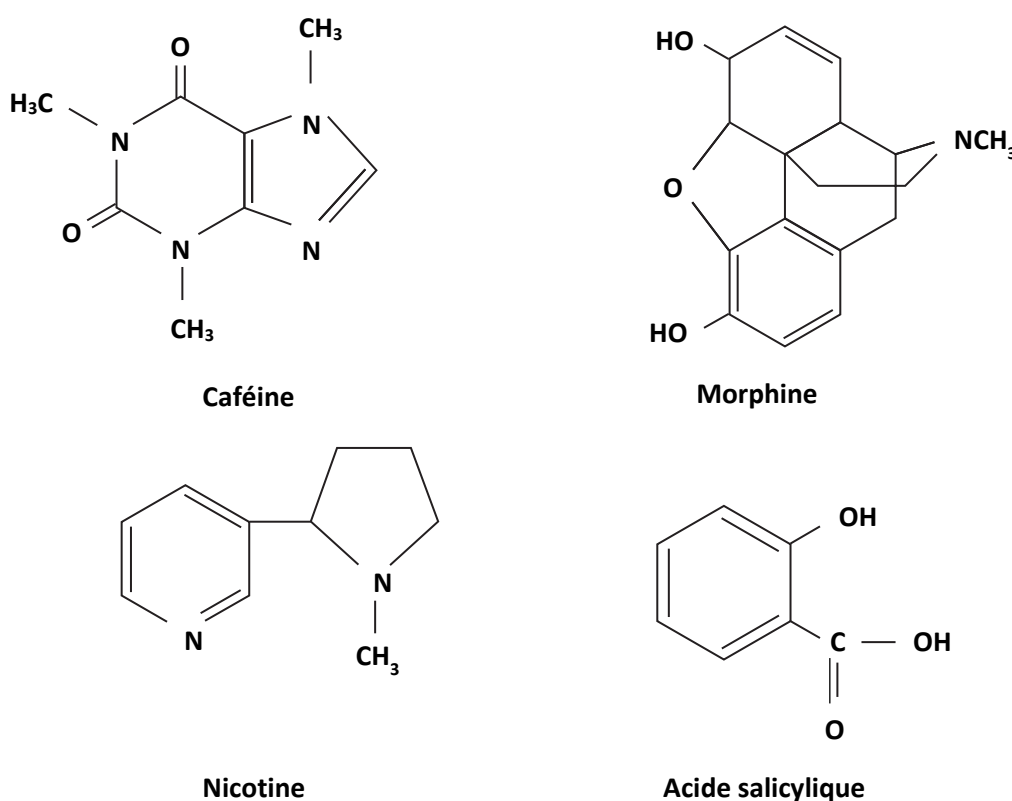


Figure 1 : Structure chimique de quelques métabolites secondaires.

3. Voies de biosynthèse des huiles essentielles

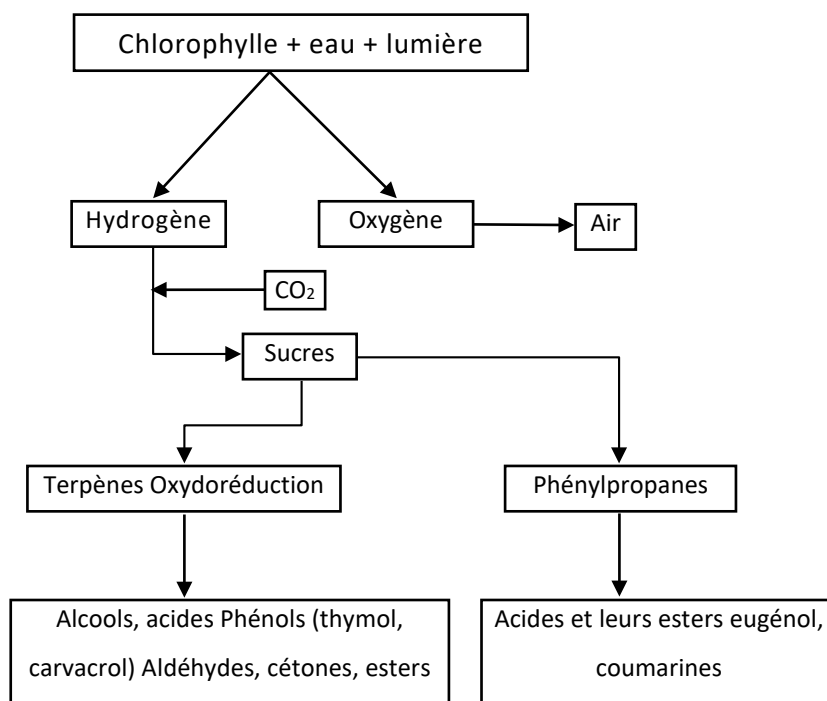
Toutes les plantes ont potentiellement la capacité de produire des essences, le plus souvent à l'état de traces. Les plantes dites « aromatiques » sont celles qui en fabriquent le plus, aussi bien en termes de quantité que de diversité (Bruneton, 2016).

Les avancées spectaculaires réalisées ces dernières décennies dans le domaine de la chimie analytique ont permis de montrer que chaque huile essentielle était constituée de dizaines, voire de centaines, de composés aux structures chimiques très diversifiées. Tout aussi impressionnants ont été les progrès récents permettant d'expliquer comment des enzymes végétales sont capables de transformer des substances carbonées nutritives non volatiles en une myriade de composés organiques volatils (Marouf, et al., 2015).

3.1. Organisation générale des voies de biosynthèse

Les constituants des huiles essentielles sont issus de multiples voies de biosynthèse qui opèrent dans des compartiments cellulaires différents. Toutes ces voies prennent ancrage sur des intermédiaires métaboliques des principaux constituants cellulaires que sont les sucres, les lipides et les acides aminés (figure 02) (Fernandez, et al., 2012).

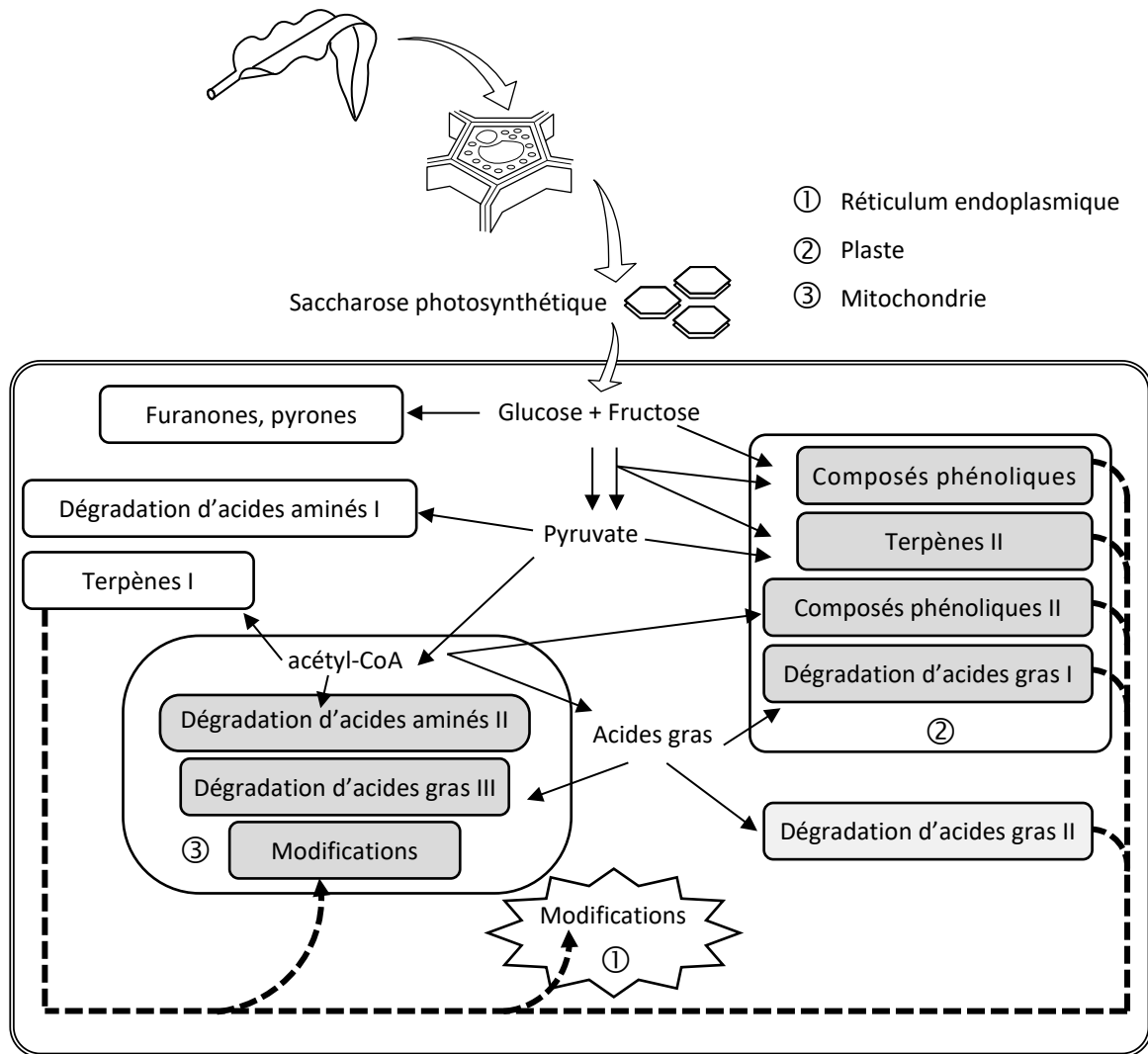
Les teneurs en huile essentielle de certains végétaux étant importantes (jusqu'à quelques pour cent du poids sec et certainement plus si on ne considère que les cellules productrices), leur production requiert la consommation d'une quantité importante de photosynthétats (substances carbonées issues du processus de la photosynthèse) pour ne pas aveulir (affaiblir par manque d'énergie) les cellules productrices. Ceux-ci proviennent de la sève élaborée (sous forme de saccharose), car les cellules productrices d'huile essentielle sont souvent achlorophylliennes (cellules de tête des trichomes sécréteurs chez les lamiacées, cellules entourant les canaux résinifères chez les conifères) (Fernandez, et al., 2012).



Heitz et Escriva, (2017)

Figure 2 : Élaboration naturelle des molécules aromatiques.

Une observation synthétique des voies de synthèse des composés organiques volatils révèle qu'un grand nombre fonctionne dans le chloroplaste (figure 03). Ce sont aussi celles qui sont responsables de la synthèse de la majeure partie des constituants de la plupart des huiles essentielles. Certaines de ces voies (voie des terpènes et voie de dégradation des acides gras) fonctionnent différemment dans plusieurs compartiments cellulaires, où elles produisent des composés organiques volatils différents. Une fois une structure carbonée de base fabriquée dans un compartiment cellulaire, il est fréquent que le composé organique volatils ainsi produit soit oxydé/ réduit, méthylé ou acétylé dans son compartiment d'origine et/ou dans un autre compartiment cellulaire (mitochondrie, réticulum endoplasmique, cytoplasme). Ceci augmente le nombre de composés organiques volatils et modifie leur volatilité et perception sensorielle. La nature des transports intracellulaires est cependant peu connue. Si la plupart des voies de synthèse émettent des composés organiques volatils comme produits terminaux, certaines produisent des composés hydrosolubles (souvent dus à la présence d'un groupement glycosidique) qui sont stockés dans les cellules et non dans des poches d'huile essentielle (Fernandez, et al., 2012).



Heitz et Escriva, (2017)

Figure 3 : Localisation cellulaire des principales voies de synthèse des composés organique volatils chez les végétaux.

Les voies nommées « dégradation d'acides aminés » ne concernent pas les acides aminés aromatiques qui sont présents dans les voies des composés phénoliques.

4. Sécrétion et stockage des HE

La synthèse des essences se fait au sein de différents tissus sécréteurs présents dans tous les organes de la plante : les fleurs (bergamotier), les feuilles (menthe poivrée), mais aussi dans des écorces (cannelier de Ceylan), des bois (santal), des racines (angélique), des rhizomes (gingembre), des fruits (badiane), ou encore des graines (muscade). Ces tissus peuvent également produire des résines, de composition chimique proche des huiles essentielles et également insoluble dans l'eau, mais non volatiles (Svoboda, et al., 2000). On retrouve 4 structures sécrétrices :

◆ Les cellules sécrétrices isolées

Ces cellules peuvent se retrouver dans tous les tissus de la plante mais c'est au niveau de l'épiderme qu'elles sont les plus fréquentes, principalement au niveau des feuilles et des organes floraux. L'essence produite ne reste pas à l'intérieur de la cellule mais s'accumule généralement dans une vacuole extracytoplasmique. De telles cellules existent par exemple dans les organes floraux des *Rosaceae* ou les organes souterrains du gingembre (*Zingiber officinale* Roscoe) (Yves, et al., 2005).

◆ Les poils sécréteurs

Ce sont des structures très variables, uni- ou pluricellulaires, résultant de la différenciation de cellules épidermiques. Ils sont ancrés par une cellule dite basale, surmontée d'une ou plusieurs cellules sécrétrices. L'essence produite par le cytoplasme s'accumule entre la membrane et la cuticule. On retrouve ces structures dans de nombreuses familles comme les *Lamiaceae* ou les *Solanaceae* (Jean-François, et al., 2017).

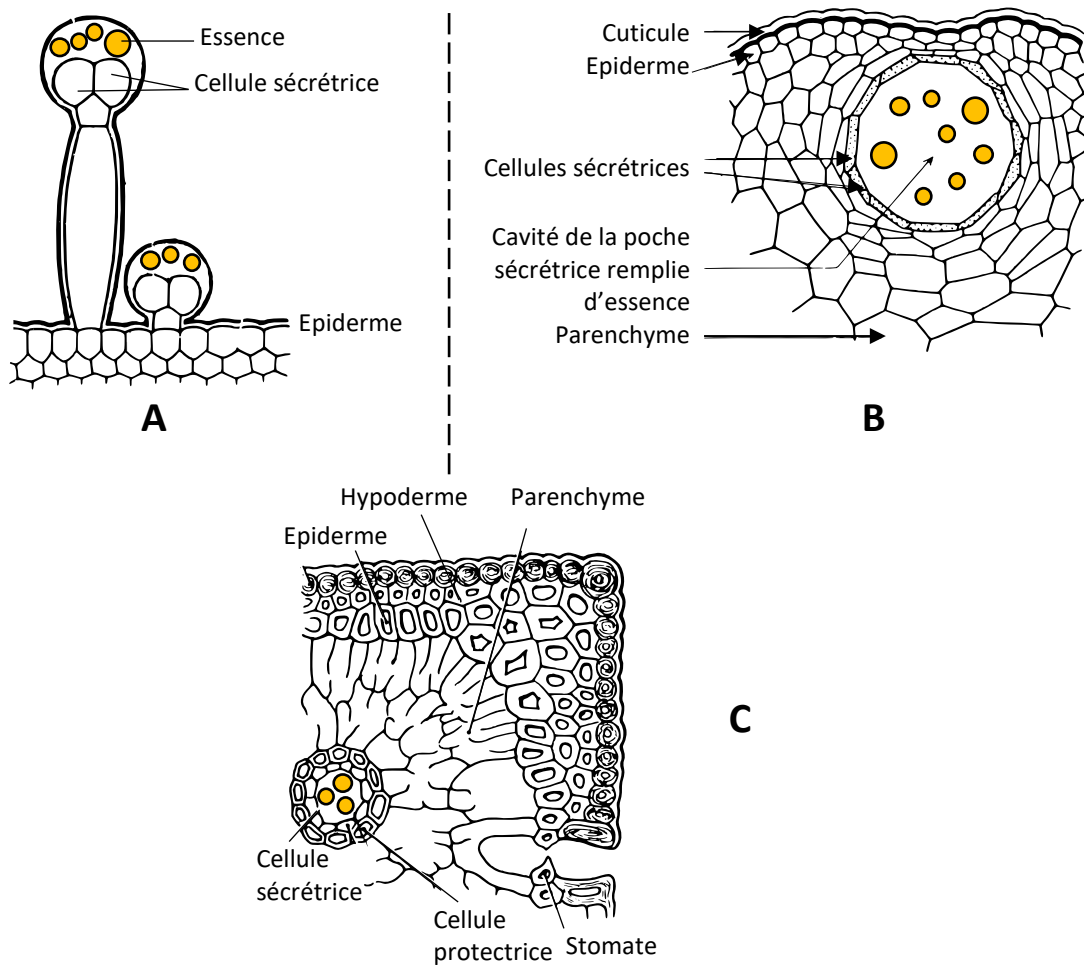
◆ Les poches sécrétrices

Les poches sécrétrices sont des cavités du parenchyme de certains organes, délimitées par des cellules sécrétrices qui y déversent leurs produits de sécrétion. De forme arrondie, elles sont issues d'une seule cellule qui se cloisonne de deux façons possibles, ce qui permet de distinguer les poches schizogènes et les poches schizolysigènes. Dans le cas des poches schizogènes, les cellules se disjoignent et forment en leur centre un méat où l'essence s'accumule. Ces poches sont présentes chez l'eucalyptus (*Eucalyptus globulus* Labill.). La formation des poches schizolysigènes se fait selon le même

principe mais s'accompagne de la lyse des cellules en contact direct avec la lumière. On les retrouve dans le péricarpe des agrumes (Rutaceae) (Svoboda, et al., 2000).

◆ Les canaux sécréteurs

Leur origine est proche de celle des poches schizogènes, mais ils viennent d'une file de cellules et non d'une unique cellule. En s'écartant, ces cellules ne forment plus une poche mais un canal qui recueille les sécrétions. Ces canaux sont par exemple présents dans le fruit de l'anis (*Pimpinella anisum* L.) (Jean-François, et al., 2017).



Daniel, et al., (2018)

Figure 4 : Diversité des structures de sécrétion des huiles essentielles.

(A): Poils sécréteurs : poils sécréteurs de la tige de la Ballote (*Ballota foetida*)., (B): Poche excrétrice du péricarpe d'une orange., (C): Canaux excréteurs : coupes transversales dans une feuille de Pin (Daniel, et al., 2018).

5. Techniques d'extraction des huiles essentielles

Les matières premières nécessaires à l'obtention des huiles essentielles sont d'origine végétale. Les huiles essentielles sont généralement présentes à de très faibles concentrations, et sont de polarités, solubilités, volatilités et stabilités très variables, elles sont obtenues de diverses manières (Catier, et al., 2007). Le choix de la technique dépend de la localisation histologique de l'huile dans le végétal et de son utilisation.

5.1. Entraînement à la vapeur d'eau

Ce procédé d'entraînement directe à la vapeur d'eau consiste à soumettre le matériel végétal à l'action d'un courant de vapeur, sans macération préalable. Les vapeurs saturées en composés organiques volatils sont condensés et récupérés par décantation. Ce procédé permet de traiter les matières végétales sensibles qui pourraient souffrir d'une ébullition prolongée. Les techniques utilisées sont fort bien connus depuis longtemps; peu d'amélioration depuis la réalisation des alambics à feu nu de la fin du siècle dernier ont été apportées (Mailhebiau, 2017).

Dans ce système d'extraction, les organes végétaux (fleurs, feuilles, graines, fruits, tiges, racines, ou plantes entières) sont placés dans un alambic (figure 05), qui possède à sa base une grille perforée au-dessous de laquelle on introduit de la vapeur d'eau fournie par une chaudière. La vapeur d'eau traverse le matériel végétal, éclate les cellules et entraîne les molécules volatiles. En traversant un tube réfrigérant, la vapeur d'eau saturée en composés volatils se condense en un mélange hétérogène, d'huiles essentielles et d'eau florale ou hydrolat (contenant encore des traces d'huiles essentielles), récupéré dans un vase de décantation (appelé séparateur ou essencier) par simple différence de densité. En fonction de la densité de l'huile extraite par rapport à l'eau florale, le mode opératoire sera différent : *densité plus faible*, c'est la partie surnageante qui est recueillie directement; *densité plus forte*, l'huile est recueillie en présence de xylène qui la dissout et qui forme avec elle un mélange plus léger que l'eau (Mailhebiau, 2017).

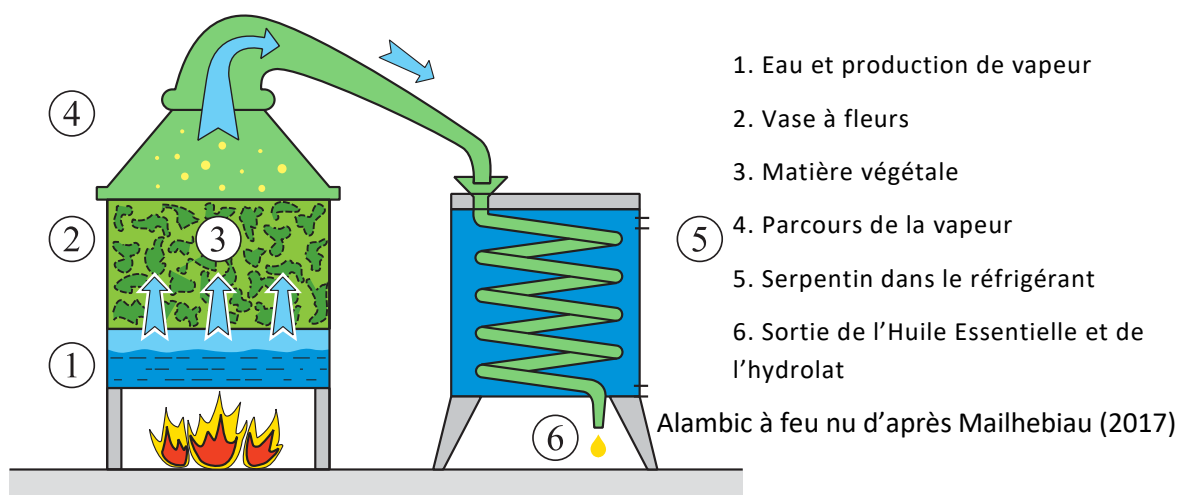
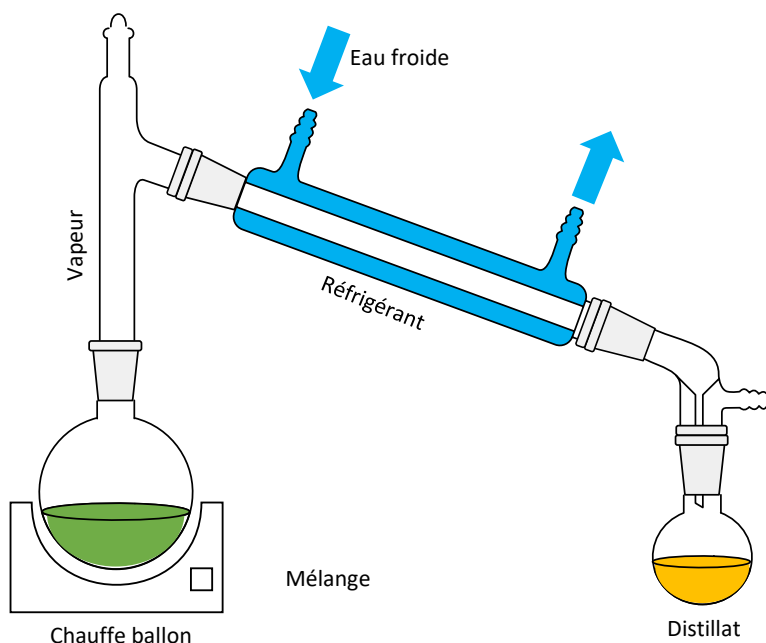


Figure 5 : Résumé du principe de la distillation à la vapeur d'eau.

5.2. Hydrodistillation

Cette méthode consiste à immerger le matériel végétal dans un bain d'eau. L'ensemble est porté à ébullition. Elle est généralement conduite à pression atmosphérique. La chaleur permet l'éclatement et la libération des molécules volatiles contenues dans les cellules végétales. Le mélange volatil est ensuite refroidi, condensé puis séparé en une phase aqueuse et une phase organique qui constitue l'huile essentielle. La distillation peut s'effectuer avec ou sans recyclage de la phase aqueuse obtenue lors de la décantation. Toutefois cette technique ne peut être utilisée pour des produits fragiles qui seraient dénaturés à une température supérieure à 100°C (Festy , 2008).

L'hydrodistillation est également utilisée à l'échelle laboratoire, son but est purement analytique, le système basé sur ce principe qui est généralement utilisé pour l'extraction des huiles essentielles en accord avec la pharmacopée européenne est l'appareil de Clevenger (figure 06).



(Xavier, et al., 2012)

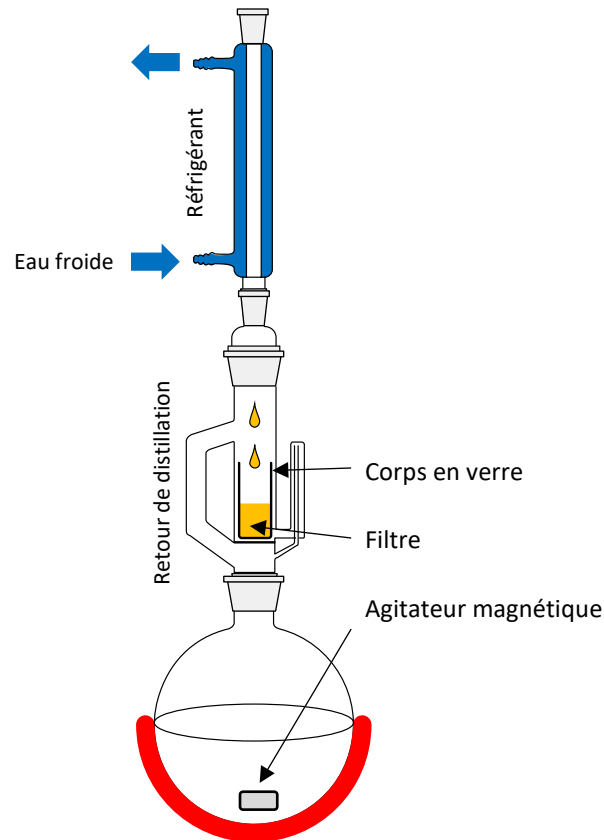
Figure 6 : Principe schématisé de l'appareillage d'hydro distillation.

5.3. Extraction par solvants volatils

Cette technique est la plus répandue, elle consiste à épuiser la matière végétale de ses constituants odorants au moyen d'un solvant, puis à l'éliminer de l'extrait par évaporation sous vide (figure 07). On obtient alors une substance appelée essence concrète en raison de son aspect solide. Il s'agit d'un mélange, généralement homogène, une fraction volatile et une fraction lourde contenant les cires, les tanins et les colorants naturels. Un traitement secondaire est alors nécessaire pour séparer ces deux fractions, des lavages répétés de ces concrètes avec l'alcool éthylique (seuls les constituants odorants sont solubles dans l'alcool) permettent d'éliminer les cires et les autres matières inertes. L'élimination de l'alcool par distillation conduit aux essences absolues (Festy , 2008).

Bien que, par rapport à la distillation, les rendements soient généralement plus importants, les solvants organiques utilisés posent des problèmes de sécurité et de toxicité, ainsi que des problèmes de réglementation liés à la protection de l'environnement qu'il convient de prendre en compte. Des analyses par les méthodes modernes ont révélé que les proportions de solvants résiduaire dans les concrètes se situent entre 2 et 4 % atteignant souvent 6 % voire plus. Les solvants les plus utilisés

sont le cyclohexane (qui a remplacé le benzène), l'alcool éthylique, des carbures aliphatiques (butane, pentane), le propylène glycol et surtout l'hexane (dérivé du pétrole en C₆) (Guignard, 2004) ; (Lucchesi, 2006).



(Xavier, et al., 2012)

Figure 7 : Représentation schématique d'un extracteur de Soxhlet.

5.4. Extraction par micro-ondes

On emploie les micro-ondes pour deux types d'extractions : le VMHD (Vacuum Microwave Hydrodistillation : hydrodistillation à micro-onde sous vide), et l'ESSAM (extraction sans solvant assistée par micro-ondes). Il s'agit en fait d'une hydrodistillation sans eau pour le VMHD et sans solvant pour l'ESSAM réalisée à l'aide de micro-ondes. Cette technique vise essentiellement à opérer la distillation à une température inférieure à 100 °C, de façon à préserver la qualité olfactive des huiles essentielles obtenues.

La matière première fraîche ou sèche est chauffée par micro-ondes. Lorsque la température de la charge atteint une valeur prédéfinie (habituellement de 60 à 90 °C), la cuve est mise en dépression et le passage de l'eau de la charge (eau de constitution

exclusivement, dans le cas des végétaux frais) à l'état vapeur permet une hydrodistillation rapide de l'huile essentielle (figure 08). L'effet endothermique se traduisant par une diminution progressive du débit de condensat, la cuve est alors remise à pression atmosphérique afin de remonter la température de charge jusqu'à la valeur de déclenchement d'une nouvelle phase de mise en dépression. Le chauffage micro-ondes permanent associé à l'alternance des phases à pression atmosphérique et sous pression réduite permet ainsi d'épuiser rapidement la charge en huile essentielle (Lucchesi, 2006).

Cette technique présente de nombreux avantages :

- contrairement à l'hydrodistillation traditionnelle, le procédé VMHD ne produit que peu d'eau résiduelle. Les résidus d'extraction sont solides et permettent une évacuation, une manutention et une mise en décharge, ou un traitement extractif ultérieur, simplifiés ;
- la consommation énergétique est réduite, puisque l'entraînement des huiles essentielles est assuré par la vapeur générée par la seule eau de constitution des matières végétales fraîches ou, dans le cas des matières premières sèches, par des quantités d'eau rajoutées juste nécessaires ;
- la rapidité du procédé ainsi que les températures modérées de travail aboutissent à l'obtention d'HE dont les profils aromatiques diffèrent notablement de ceux des HE produites par les procédés traditionnels (Lucchesi, 2006).

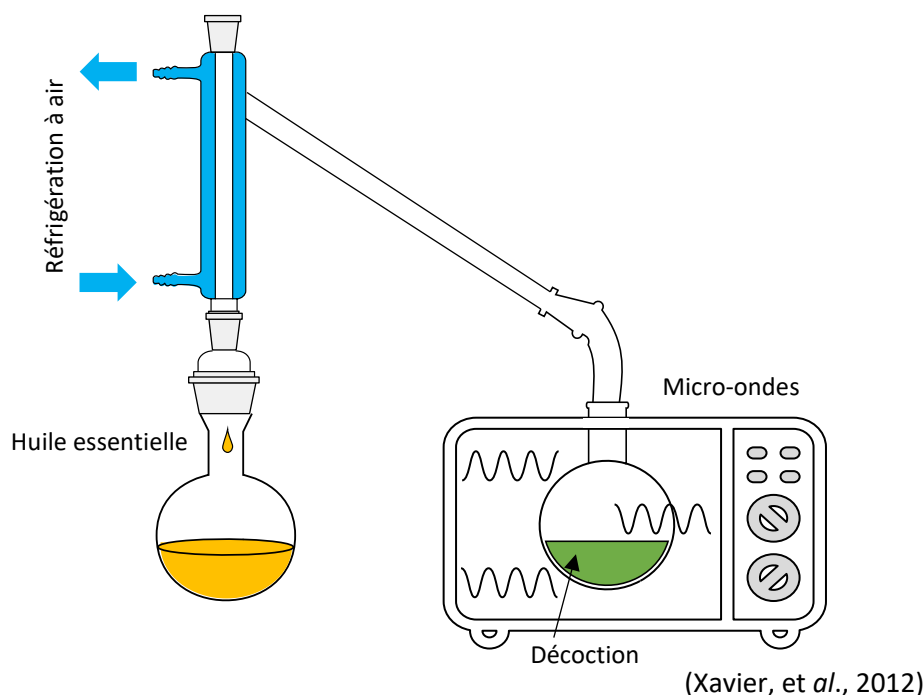


Figure 8 : Schéma de principe d'extraction par micro-ondes.

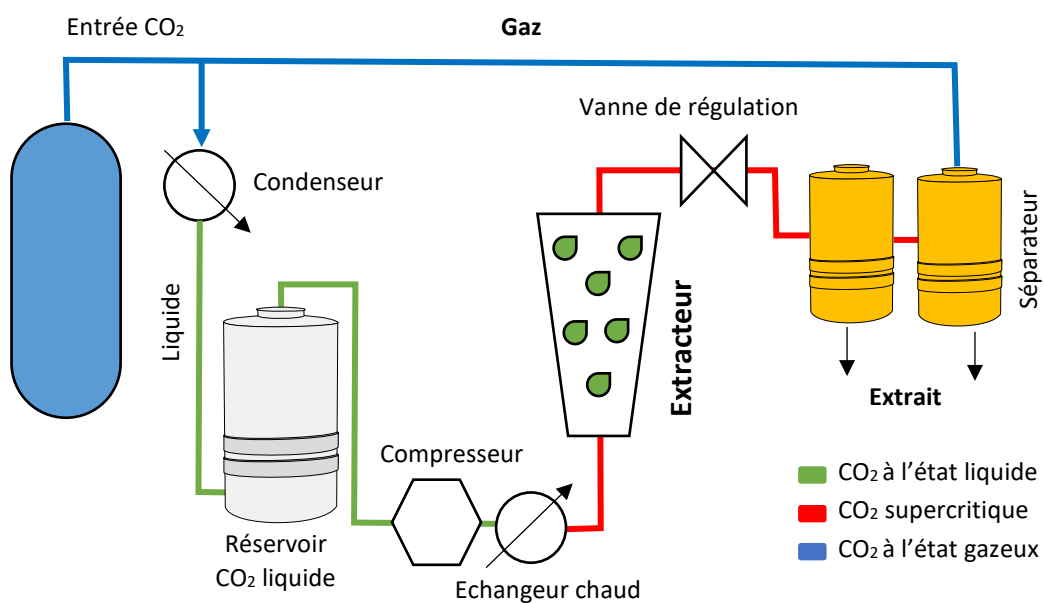
5.5. Extraction par CO₂ à l'état supercritique

L'extraction par CO₂ supercritique est une technologie alternative à l'extraction par solvant organique pour les composés naturels, notamment les plus fragiles. Elle nécessite d'utiliser des appareils résistants à des pressions pouvant aller jusqu'à 400 fois la pression atmosphérique. Cette technologie est basée sur le pouvoir solvant du CO₂ qui est modulable à volonté, dans certaines limites, selon les conditions de pression et de température qu'on lui applique. À l'état supercritique (plus de 74 bars et de 31 °C) le CO₂ possède des propriétés très particulières. Le fluide obtenu est caractérisé par une grande diffusivité (de l'ordre de celle des gaz), ce qui lui confère une bonne aptitude à la dissolution, et une densité élevée qui le dote d'une capacité de transport et d'extraction importante (Guignard, 2004) (figure 09). L'utilisation du dioxyde de carbone supercritique présente plusieurs avantages :

- ◆ le CO₂ est un produit naturel, abondant dans la nature et peu coûteux ;
- ◆ elle évite les problèmes associés aux solvants puisqu'il est inodore, sans goût, non toxique et ininflammable. De plus, lors du retour à pression atmosphérique, il est automatiquement éliminé par vaporisation ;

- ◇ son utilisation n'altère pas les produits, et ne génère pas de résidus polluants ;
- ◇ les extraits obtenus présentent une grande stabilité et surtout ne contiennent pas de résidus toxiques. Les molécules solubles dans le CO₂ supercritique, donc extractibles, sont les composés peu polaires de faible masse moléculaire, tels que les composés aromatiques, des alcools, des esters, de nombreux pigments, les stérols, les oligomères ... (Heitz, et al., 2017)

Le coût élevé des appareillages lié à l'application de pressions de plusieurs centaines de bars demeure le principal frein au développement de cette technologie.



Guignard (2004)

Figure 9 : Schéma du procédé d'extraction au CO₂ supercritique.

En conclusion, nous dirons que le choix d'une technique d'exploitation des plantes aromatiques doit être adaptée aux composés spécifiquement recherchés. Chacune d'elles étant sélective, l'option dépend du type de produit souhaité ou de la nature chimique des molécules odorantes ciblées.

6. Composition et propriétés physico-chimiques

Les essences et les huiles essentielles ont des propriétés physiques communes, qui peuvent cependant varier en fonction de leur composition chimique, ce sont des substances à forte odeur aromatique, généralement liquides, faiblement colorées, de densité inférieure à celle de l'eau (à l'exception de quelques essences) (Fernandez, et al., 2012).

Les huiles essentielles sont solubles dans l'alcool et les solvants organiques habituels des huiles comme le chloroforme, le benzène ou l'éther, pratiquement très peu ou pas solubles dans l'eau. Elles sont liquides à la température ambiante. Leur point d'ébullition varie de 160 à 240 °C et leur densité de 0,759 à 1,096, généralement. Elles sont dextrogyres ou lévogyres, le plus souvent optiquement actives et possèdent un indice de réfraction caractéristique (Marouf, et al., 2015).

Les huiles essentielles sont volatiles, c'est ce qui les rend entraînables à la vapeur, ce caractère les différencie aussi des huiles végétales grasses qui sont fixes et tachent le papier d'une manière permanente, alors que pour les huiles essentielles leur tâche sur le papier disparaît plus ou moins rapidement. La volatilité étant très liée à la composition chimique, les monoterpènes sont par exemple beaucoup plus volatiles que les sesquiterpènes (Kaloustian, et al., 2012).

D'un point de vue chimique, il s'agit de mélanges extrêmement complexes contenant pour la plupart plusieurs centaines de constituants, on les divise en :

◆ Huiles essentielles hydrocarburées : essence de térébenthine (oléorésine de divers pins), de citron ... Ce sont les plus nombreuses ;

◆ Huiles essentielles oxygénées : essence de rose, de menthe ... ;

◆ Huiles essentielles sulfurées : celles des Brassicacées, des Liliacées ;

◆ Huiles essentielles à carbures terpéniques et leurs dérivés oxygénés :

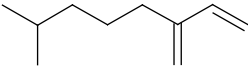

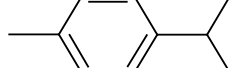
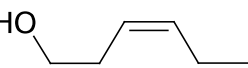
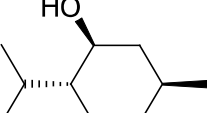
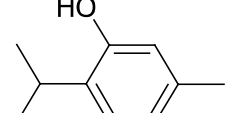
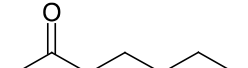
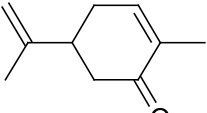
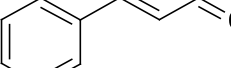
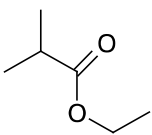
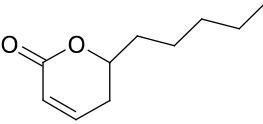
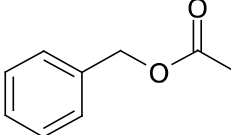
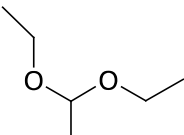
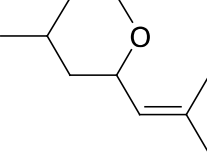
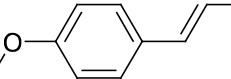
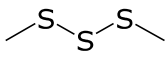
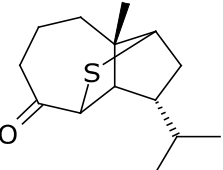
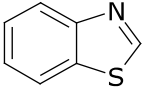
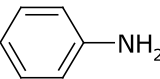
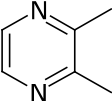
◆ Monoterpénoïdes : limonène, pinène, camphène, cymène ... sont, de loin, les constituants majoritaires, suivis des sesquiterpènes.

◆ Alcools : menthol, linalol, bornéol, géraniol. ..

◆ Esters : acétate de linalyle, de bornyle, salicylate de méthyle ...

- ◇ Aldéhydes : essences d'amandes amères, aldéhydes benzoïques et cinnamiques, citral...
- ◇ Cétones : menthone, carvone, thuyone ...
- ◇ Ether-oxydes : cinéole ...
- ◇ Huiles essentielles à composés aromatiques :
 - ◇ Dérivés d'acides phénoliques simples (benzoïque, vanilline) ou du phénylpropane (cinnamique),
 - ◇ Phénols : anéthol, thymol, eugénol, carvacrol, apiol... (Bruneton, 2016).

Tableau 1 : Principales familles de constituants des huiles essentielles.

Type de chaîne			
	Linéaire	Cyclique	Aromatique
Hydrocarbure			
	Myrcène mestic, céleri	Limonène citrus	p-cymène, thym
Alcool			
	(Z)-hexèn-3-ol	marthol	thymol
Carbonyle			
	Heptan-2-one	carvone	cinnamaldéhyde
Ester / lactone			
	isobutyrate d'éthyle	massoïa lactone	acétate de benzyle
Éther			
	1,1-diéthoxyéthane	oxyde de rose	anéthol
Soufré			
	trisulfure de diméthyle	mint sulfide	benzothiazole
Azoté			
	aniline, fenugrec		2,4-diméthyl pyrazine

Source : (Xavier et Farid, 2012)

6.1. Préservation des huiles essentielles

La relative labilité des molécules constitutives des huiles essentielles et leur réactivité rend leur conservation difficile. Certains constituants des huiles essentielles, comme les monoterpènes se combinent facilement avec l'oxygène de l'air, surtout s'ils sont dans un environnement chaud ou en présence de lumière. Certains peuvent former des résines (polyterpènes). La position des doubles liaisons peut être modifiée, des chaînes ouvertes peuvent se cycliser, la nature des groupements fonctionnels peut changer comme, par exemple, des alcools primaires en aldéhydes. Il est donc important de stocker les huiles essentielles dans des conditions qui minimisent leur contact avec l'air, avec la lumière (flacons en verre de couleur sombre) et avec la chaleur (réfrigération). (Fernandez, et al., 2012).

6.2. Chémotype ou chimiotype

La notion de chémotype (chimiotype ou encore race chimique) est une notion clé en aromathérapie. Terme utilisé pour la première fois en 1968 par le Dr R. Santesson et son fils, le chémotype est alors défini comme un « groupe chimiquement défini au sein d'une population d'individus morphologiquement indiscernables » (Ken, et al., 2009).

Le concept de chémotype permet de distinguer deux ou plusieurs huiles essentielles de composition chimique différente produites à partir de plantes de la même espèce, définie par sa dénomination scientifique et non à partir de sa dénomination commune. Ainsi, la différence entre le thym à thymol et le thym à linalol (tous deux issus de *Thymus vulgaris* L.) n'est pas la même que celle entre la lavande fine et la lavande aspic (*Lavandula angustifolia* Mill et *Lavandula latifolia* Medik) (Deschepper, 2017).

Cela signifie que des individus de la même espèce botanique, ayant donc le même génome et le même phénotype, peuvent présenter des différences significatives au niveau de leur composition chimique. Celle-ci est en effet sous l'influence de nombreux facteurs autres que la détermination génétique, comme la qualité du sol, le climat, l'altitude, l'hygrométrie, etc. Nous montrerons plus tard que les huiles essentielles sont particulièrement sujettes à ce phénomène.

7. Propriétés biologiques et pharmacologiques

Bien que cette thèse ne traite que d'un groupe de substances naturelles, celui des huiles essentielles, elle a cependant une valeur beaucoup plus générale car elle illustre de manière frappante deux caractéristiques communes à tous les végétaux : d'une part leur remarquable capacité de biosynthèse, d'autre part l'intérêt fondamental et appliqué que l'on peut accorder aux métabolites secondaires et leur diversité.

Pour interagir avec leur environnement, les plantes synthétisent, de manière constitutive ou induite, une multitude de molécules, plus cette interaction est efficace et plus la plante a un avantage par rapport à sa voisine (André, 1979). L'originalité de ce système d'interaction réside dans l'exceptionnelle variabilité chimique des molécules produites. Ces dernières constituent, de par la diversité des groupements structuraux et fonctionnels qu'elles arborent, un vaste réservoir de substances actives (Macheix, et al., 2005). Elles possèdent de nombreuses propriétés pharmacologiques qui peuvent être, selon les cas : antioxydante, antiinfectieuses, antimicrobienne, insecticide, herbicide.... (Guignard, 2004).

7.1. Propriétés antimicrobiennes

Les huiles essentielles et autres extraits, possèdent de nombreuses propriétés pharmacologiques, et sont actuellement considérés comme des alternatives potentielles aux antibiotiques pour traiter diverses maladies infectieuses, et aux agents chimiques de conservation des denrées alimentaires et produits cosmétiques (Guignard, 2004).

La phytothérapie n'a pas attendu les découvertes scientifiques pour exploiter les vertus des plantes. En effet, la fonction antimicrobienne des huiles essentielles est exploitée depuis l'Antiquité, mais n'a été prouvée scientifiquement qu'au début du XX^e siècle. Son utilisation s'est développée depuis une quarantaine d'années et les huiles essentielles sont actuellement candidates à de multiples applications de traitement ou de conservation (Burt, 2004). Les premières recherches expérimentales des propriétés antibactériennes des huiles essentielles seraient à attribuer à De la Croix, en 1881. De nombreuses études sur la composition chimique des huiles essentielles et leurs activités biologiques ont été publiées à l'échelle mondiale. Ces recherches ont montré que la fonction antimicrobienne s'exerce de deux manières selon les types de micro-organismes et de biomolécules :

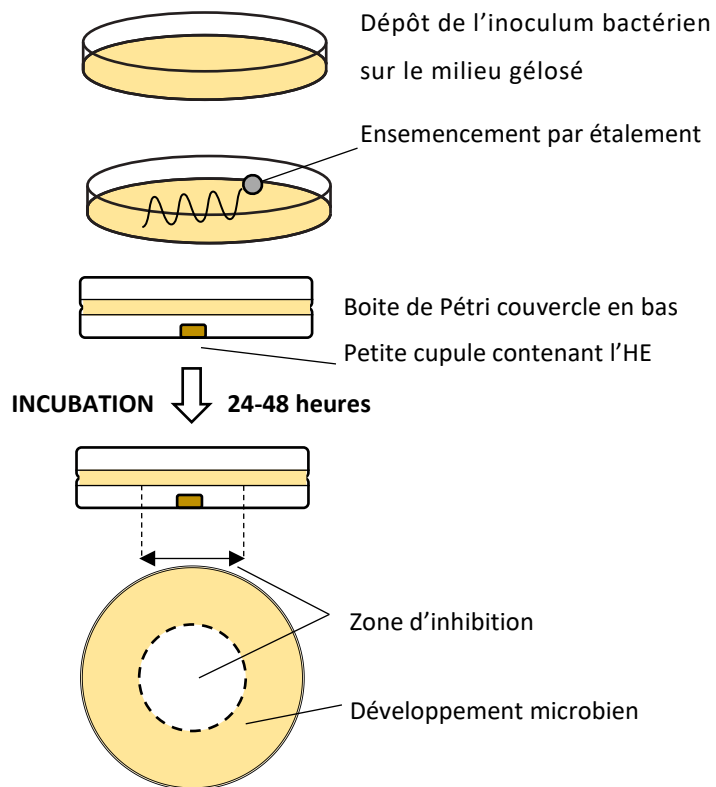
- activité inhibitrice ou microbiostatique : blocage de la multiplication des cellules microbiennes ;
- activité létale ou microbicide : mort des cellules microbienne (Fortino, et al., 2012).

7.1.1. Méthodes d'étude de l'activité antimicrobienne des HE

Les diverses études menées dans ce domaine ont montré la diversité des méthodologies employées pour mettre en évidence les activités antimicrobiennes des huiles essentielles. Le choix des techniques utilisées pour déterminer leur activité antimicrobienne a une grande influence sur les résultats. L'insolubilité des constituants des huiles essentielles dans l'eau et leur volatilité constituent les principales difficultés rencontrées. Les techniques classiques mises au point *in vitro* permettent soit de caractériser le pouvoir antimicrobien soit de le quantifier en termes de concentration minimale inhibitrice ou de concentration minimale microbicide. Ces méthodes sont appliquées en milieu solide ou en milieu liquide. Les différents protocoles peuvent être classés selon la nature du contact de l'HE avec le germe (Xavier, et al., 2012).

7.1.1.1. Méthode en micro-atmosphère (technique en phase vapeur)

Cette technique permet de mettre en évidence l'action des composants volatils des HE sur le développement des germes en milieu solide dans une boîte de Pétri. Le micro-organisme estensemencé en surface sur le milieu gélosé, quelques gouttes d'HE sont déposées sur un papier-filtre ou dans une petite cupule placée au fond et au centre du couvercle. La boîte de Pétri est incubée à température optimale du germe, couvercle en bas (figure 10). L'évaporation des substances volatiles agit sur la croissance des germes. L'absence de développement microbien dans une zone translucide sur le milieu gélosé plus ou moins claire traduit l'action antimicrobienne de ces substances. Cette méthode ne permet pas de quantifier l'activité antimicrobienne réelle des huiles essentielles elle ne montre que l'activité des composants volatils à la température d'incubation (López, et al., 2005).



Xavier et Farid (2012)

Figure 10 : Étude de l'activité antimicrobienne par la méthode micro-atmosphère.

7.1.1.2. Méthodes par diffusion sur milieux solides

Il s'agit de méthodes qualitatives permettant de tester la sensibilité ou la résistance des micro-organismes aux huiles essentielles par contact direct.

7.1.1.2. a) Méthode des disques

L'évaluation technique de l'activité antibactérienne des huiles essentielles est l'aromatogramme, semblable à l'antibiogramme qui permet de tester les antibiotiques, appelée « méthode des disques ». La suspension microbienne est d'abord inoculée et ensemencée en surface sur milieu gélosé en boîte de Pétri (figure 11). Un disque de papier-filtre de 6 mm de diamètre imbibé d'HE diluée dans le solvant (15µl) est juste après plaqué sur la surface de la gélose ensemencée et les boîtes de Pétri sont alors incubées dans les conditions optimales de température et de temps du micro-organisme considéré. Pendant l'incubation, les germes se développent sous forme de colonies visibles à l'œil nu. L'obtention d'un halo clair autour du disque indique l'inhibition du

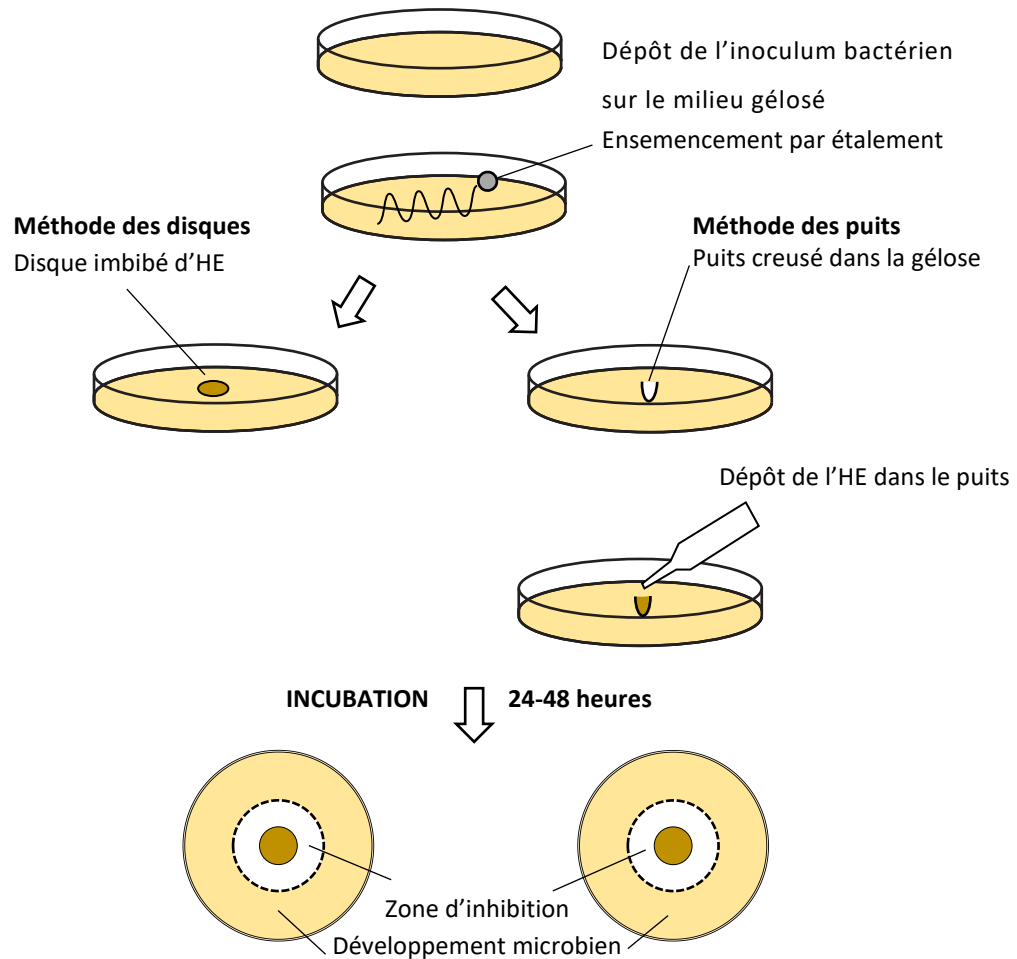
développement microbien. Le diamètre de la zone d'inhibition est mesuré en millimètres, incluant le diamètre du disque. Deux témoins sont réalisés dans les mêmes conditions opératoires : un témoin négatif avec le solvant ayant servi à la solubilisation des HE et un disque d'antibiotique comme témoin positif (Onawunmi, 1989).

7.1.1.2. b) Méthode des puits

La préparation de la suspension microbienne et l'ensemencement se font de la même manière que pour la méthode des disques. Mais à la place du disque de papier filtre, un puits de 6 mm de diamètre est creusé stérilement à l'aide d'un tube de verre fin. L'huile essentielle est ensuite déposée dans le puits à l'aide d'une micropipette (figure 11). L'incubation des boîtes de Pétri à la température optimale de croissance du germe permettra le développement de colonies. La formation du halo clair autour du puits traduit l'absence de croissance microbienne, dont le diamètre dépend de la sensibilité à l'huile essentielle. De la même manière que pour la méthode précédente, des témoins sont réalisés dans les mêmes conditions opératoires (Sahraoui, et al., 2007). Ces deux méthodes (des disques et des puits) largement utilisées dans les publications sont généralement employées pour la présélection de l'activité antimicrobienne de l'huile essentielle car le diamètre d'inhibition n'est pas une mesure directe de l'activité des huiles essentielles mais une indication qualitative de la sensibilité ou de la résistance des germes. Une classification des huiles essentielles chémotypées en rapport avec leur spectre d'activité antimicrobienne peut être ainsi déterminée par l'importance du halo d'inhibition. Cependant, ces techniques connaissent des limites dues à divers facteurs :

- les différents constituants de l'huile essentielle ne diffusent pas de la même manière dans le milieu gélosé ;
- le diamètre d'inhibition varie en fonction de la densité de l'inoculum, l'épaisseur du milieu de culture gélosé et le volume de l'huile essentielle déposé ;
- la nature du solvant de solubilisation des huiles essentielles ;
- les souches microbiennes appartenant à la même espèce peuvent présenter des sensibilités différentes (Xavier, et al., 2012).

Il est donc nécessaire de normaliser toutes ces conditions afin de pouvoir comparer les résultats, ce qui n'est pas toujours le cas dans les différentes études réalisées sur le sujet.



Xavier et Farid (2012)

Figure 11 : Étude de l'activité antimicrobienne par la méthode de diffusion sur milieux solides (méthode des disques et méthode des puits).

7.1.1.3. Méthodes sur milieux liquide

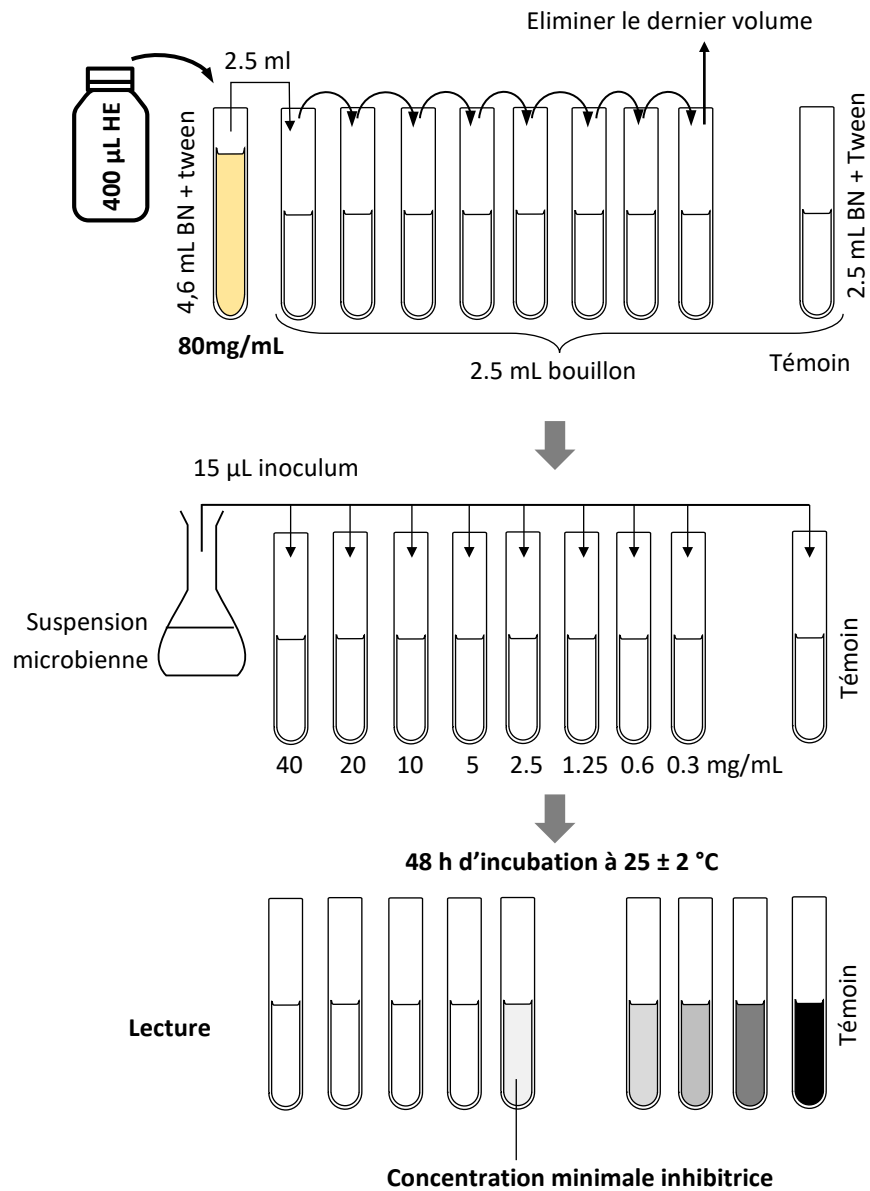
Il s'agit de la méthode en bouillon de culture dans une série de tubes à essai, appelée « méthode des dilutions », dont le but est de déterminer la concentration la plus faible de l'antimicrobien qui inhibe la croissance de la bactérie testée (la concentration minimale inhibitrice: CMI, généralement exprimée en $\mu\text{l/ml}$ ou mg/l). Cette technique est appliquée aux micro-organismes considérés ayant présenté une sensibilité aux huiles essentielles par l'une des méthodes précédentes. La dilution en bouillon est une technique dans laquelle une suspension microbienne est testée à des concentrations

variables de l'agent antimicrobien dans un milieu de culture liquide. Une dilution en cascade de l'agent inhibiteur est effectuée directement dans le bouillon qui servira à la culture. La gamme de tubes est ensuite inoculée par le micro-organisme test puis incubée (Oussalah, et al., 2007).

7.1.1.3. a) Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI)

En bactériologie médicale, chaque souche est caractérisée en termes de résistance ou de sensibilité aux antibiotiques au moyen de deux valeurs : la concentration minimale inhibitrice (CMI) et concentration minimale bactéricide (CMB).

La CMI est la plus faible concentration requise pour l'inhibition complète de l'organisme test en 24 ou 48 heures d'incubation, fréquemment elle n'est pas bactéricide et les cellules d'inoculum sont capables de se développer après repiquage sur milieu exempt du composé inhibiteur (Burt, 2004). La CMI est réalisée par la méthode des dilutions en milieu liquide. La dilution en bouillon est une technique dans laquelle une suspension microbienne est testée à des concentrations variables de l'agent antimicrobien dans un milieu de culture liquide (figure 12). La croissance microbienne se traduit par un trouble mesuré par l'absorbance au spectromètre. La CMI de l'HE est déduite à partir du premier tube de la gamme dépourvue de croissance bactérienne (Oussalah, et al., 2007).

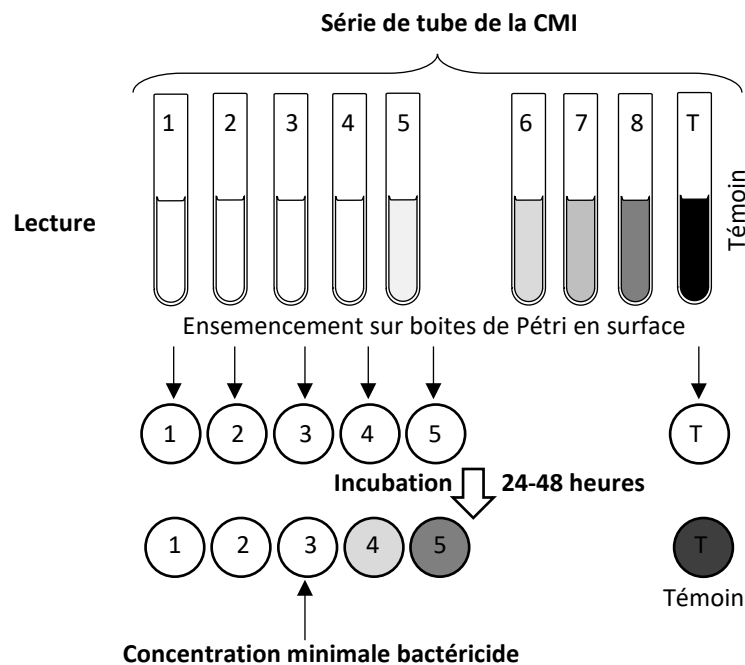


Xavier et Farid (2012)

Figure 12 : Méthode de détermination de la CMI en milieu liquide.

7.1.1.3. b) Détermination de la concentration minimale bactéricide (CMB)

La concentration minimale bactéricide (CMB) correspond à la concentration en inhibiteur nécessaire à laquelle l'action bactéricide est totale. Elle est définie par Onawunmi, (1989) comme étant la plus faible concentration à laquelle aucune croissance n'est observée après repiquage en bouillon frais. C'est la concentration capable d'engendrer 99,9 % de mortalité des cellules microbiennes initiales. Elle est déterminée en milieu liquide ou en milieu solide par l'évaluation des survivants après l'élimination du composé inhibiteur. Le test de la CMB succède directement au test de la CMI. Les cultures en présence de concentrations en inhibiteur n'ayant pas donné de développement, elles sont à nouveauensemencées sur milieu de culture neuf (liquide ou solide), puis incubées à la température optimale du germe considéré pendant 24 à 48 heures. Des prélèvements sont effectués à partir du tube témoin et de chacun des tubes dépourvus de développement bactérien (résultat du test de la CMI), puis ensemencés en surface sur gélose en boîtes de Pétri (figure 13). Après incubation, la concentration minimale en composé inhibiteur pour laquelle aucun développement n'est observé est considérée comme étant la CMB (Xavier, et al., 2012).



Xavier et Farid (2012)

Figure 13 : Détermination de la CMB en milieu solide.

Chapitre 02 :

Les plantes

et leur environnement

Chapitre 02 : Les plantes et leur environnement

1. La plante et les facteurs de l'environnement

Malgré leur apparente passivité, essentiellement liée à leur mode de vie fixée, les plantes entretiennent de nombreuses relations aussi bien avec le monde minéral qui les entoure qu'avec tous les autres êtres vivants : plantes, animaux, champignons et micro-organismes vivant à proximité mais, également, à une certaine distance (Daniel, et al., 2018). Ces relations leur apportent les éléments nutritifs et l'énergie nécessaires à leur développement. Elles sont de natures très variées : physiques (électriques), chimiques (trophiques et hormonales), biologiques (pariétale, ecto- ou endo-cellulaires). Elles peuvent s'établir directement entre les partenaires ou via l'intermédiaire d'autres organismes, comme les bactéries et les Mycophytes. Elles sont toujours très complexes: parfois excellentes, souvent neutres ou simplement concurrentes. Elles peuvent être aussi mauvaises, et même, dans certains cas, tragiques. Elles vont ainsi de la symbiose parfaite au parasitisme le plus agressif si ce n'est mortel, en passant par des intermédiaires comme le mutualisme, le commensalisme et la compétition (Yves, et al., 2005).

1.1. Les facteurs d'altération des cultures

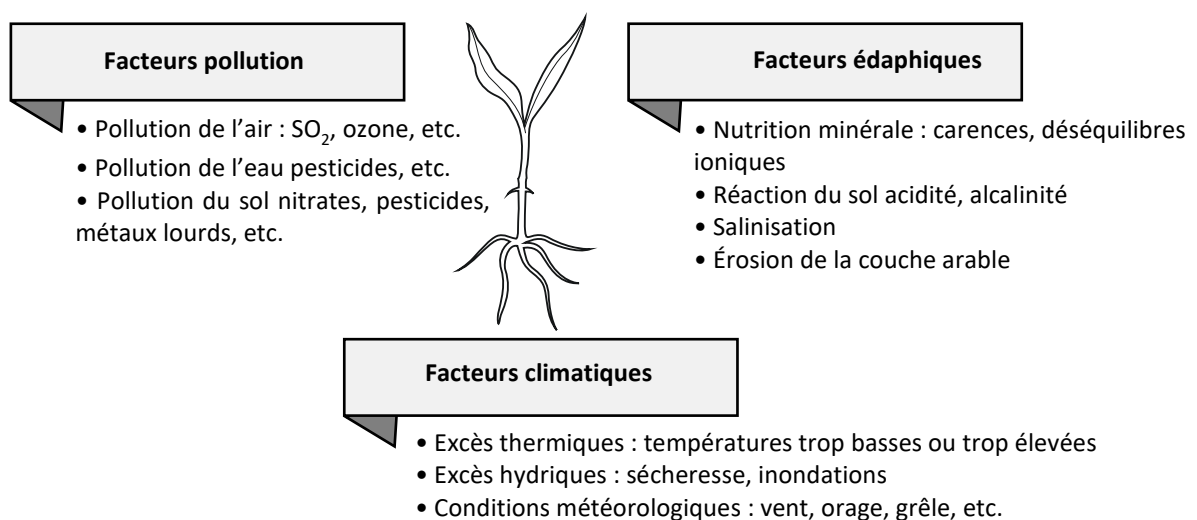
Les cultures sont menacées en permanence par des facteurs altérageux susceptibles de déprécier la valeur des productions en quantité et en qualité. Les altérations peuvent concerner les cultures sur pied aux différentes phases de leur développement, les produits de la récolte (grains, fruits, légumes, tubercules, bois, etc.), pendant leur transport ou leur conservation et le potentiel de production par des facteurs d'altération de nature biotiques et abiotiques (Tourte, et al., 2005).

1.1.1. Maladies non parasitaires (facteurs abiotiques)

Contrairement aux animaux qui peuvent se déplacer lorsque les conditions de vie ne leur sont plus favorables, les plantes sont pour la plupart fixées. Elles ont de ce fait développé des stratégies d'adaptation pour répondre aux changements environnementaux en modulant et en ajustant en permanence leurs systèmes métaboliques (Sauvion, et al., 2013).

Les plantes doivent affronter différents types d'agressions ou de stress abiotiques et s'y adapter. Nombre d'altérations résultant d'une inadéquation des conditions écologiques *sensu lato* sont dites non parasitaires, les causes correspondantes étant de nature abiotique. Les maladies non parasitaires sont non infectieuses et non transmissibles (Tourte, et al., 2005).

Parmi ces facteurs abiotiques, on peut citer : le manque ou l'excès d'eau, les fortes ou faibles luminosités, la pollution de l'air, la salinité des sols, les températures extrêmes et le vent (figure 14). Ces facteurs deviennent alors des contraintes qui vont affecter le développement de la plante (Agrios, 2005).

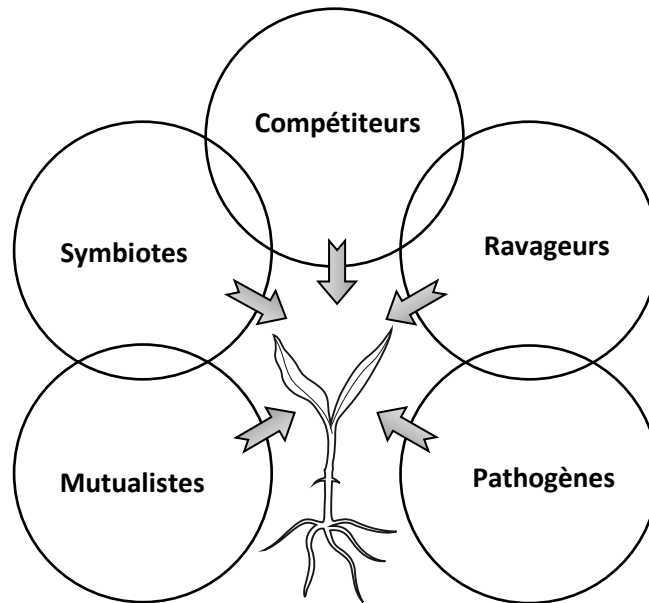


(Boufares, 2020)

Figure 14 : Principales causes des maladies non parasitaires (abiotiques).

1.1.2. Maladies parasitaires et ravageurs (facteurs biotiques)

L'environnement biotique d'une plante est représenté par l'ensemble des êtres vivants qui interagissent avec celle-ci. Ces organismes peuvent être pathogènes pour la plante, ou bien mutualistes ou symbiotiques ou encore constituer des ravageurs ou des compétiteurs (figure 15) (Jean-François, et al., 2017).



(Boufares, 2020)

Figure 15 : Schéma de l'environnement biotique des plantes.

Les ennemis des cultures, ou nuisibles, appelés aussi bio-agresseurs, sont des organismes qui causent des dégâts aux plantes cultivées (et aux denrées récoltées). Il existe une grande diversité de maladies parasitaires causées par l'action d'agents pathogènes (virus, bactéries, mycoplasmes, champignons, phanérogames), qui se développent aux dépens d'un végétal vivant (tableau 02). Ces parasites sont généralement infectieux (ils envahissent l'hôte et s'y multiplient) et contagieux (ils se transmettent d'une plante infectée à une plante saine) (Sauvion, et al., 2013).

Tableau 2 : Classification des ennemis des cultures.

	Règne	Groupe	Ravageurs ou parasites
Animal	Invertébrés	Némathelminthes	Nématodes
		Mollusques	Gastéropodes (escargots, limaces,)
		Arthropodes	Insectes, acariens
	Vertébrés	Oiseaux	Moineaux, étourneaux
		Mammifères	Menones, surmulot, rat noir
Végétal	Phanérogames	Dicotylédones	Cuscutacées : <i>Cuscuta</i>
			Convolvulacées
			Orobanchacées <i>Orobanche</i>
			Scrophulariacées <i>Striga</i>
			Loranthacées : <i>Arceuthobium</i> , <i>Phoradendron</i> <i>Viscum</i>
Microbien	Eucaryotes	Champignons	Archimycètes
			Phycomycètes
			Ascomycètes
			Basidiomycètes
			Deutéromycètes
			Agonomycètes
	Procaryotes	Protozoaires	<i>Phytomonas</i>
		Bactéries	<i>Pseudomonas</i> , <i>Xanthomonas</i> ,...
		Mollicutes	Mycoplasmes, spiroplasmes
Macromolécules infectieuses	- Virus	Particules allongées ou particules isométriques	Virus de la mosaïque du tabac,
			Virus Y de la pomme de terre,...
	- Viroïdes		Virus de la mosaïque du concombre
			Exocortis des <i>Citrus</i> ,
			Sommet buissonnant de la tomate (TBSV).

Source : (Sauvion, et al., 2013)

1.1.3. Agents phytopathogènes

Les agents phytopathogènes sont de différents types : virus, viroïdes, bactéries, mollicutes, champignons. Pour chacun d'entre eux de nombreux genres et espèces provoquent des maladies. L'agent pathogène peut être nécrotrophe, il tue les cellules de la plante puis s'y multiplie, il présente alors généralement un large spectre d'hôte et peut attaquer plusieurs familles de plantes. L'agent pathogène peut aussi être biotrophe,

il se multiplie à l'intérieur de son hôte lorsque celui-ci est en vie, son spectre d'hôte est alors souvent étroit et il ne peut infecter qu'une famille, voire qu'un genre ou qu'une espèce de plante. Enfin, l'agent pathogène peut être hémibiotrophe, c'est-à-dire biotrophe aux premiers stades de l'infection puis nécrotrophe ensuite (Jean-François, et al., 2017).

Dans le cadre de cette thèse, nous n'exposons que l'exemple de deux microorganismes phytopathogènes impliquant des maladies chez la tomate et olivier et qui seront examinées dans la partie expérimentale.

1.1.3.1. Bactéries phytopathogènes

Les bactéries sont des organismes vivants microscopiques unicellulaires dont la taille est de l'ordre du micron, ce sont des procaryotes qui ne possèdent pas un noyau "vrai" pourvu d'une membrane mais un unique chromosome nu (Richard, et al., 2018).

Les bactéries phytopathogènes sont classées en huit genres : *Pseudomonas*, *Agrobacterium*, *Corynebacterium*, *Erwinia*, *Pectobacterium*, *Xanthomonas*, *Ralstonia* et *Streptomyces*. Ces huit genres sont répartis pour certains sous toutes les latitudes et causent des dégâts considérables aux cultures (Madigan, et al., 2000). Ces bactéries peuvent être nécrotrophes ou biotrophes, elles sont responsables de l'apparition de symptômes qui ne se distinguent en rien de ceux occasionnés par des champignons ou des insectes. Pour cette raison la seule observation des symptômes ne permet jamais de fixer un diagnostic sûr (Agrios, 2005).

1.1.3.2. Champignons phytopathogènes

Les champignons sont des êtres vivants eucaryotes pluricellulaires ou unicellulaires. Ils sont la principale cause de maladies chez les plantes, on estime environ 2 % des 100 000 espèces recensées de champignons sont susceptibles d'infecter les plantes (Madigan, et al., 2000).

Les champignons phytopathogènes peuvent être nécrotrophes, biotrophes ou même hémibiotrophes, ils sont capables d'infecter n'importe quel tissu à n'importe quel stade de croissance de la plante, de manière générale, ces trois types de champignons mettent en place une machinerie particulière permettant une pénétration active dans la plante. L'infection se déroule selon un processus, appelé « cycle de la maladie », dont la

complexité varie selon les espèces, mais qui comprend toujours un certain nombre d'étapes obligatoires (inoculation, adhérence, germination, pénétration et invasion) (Raquel, et al., 2011).

1.2. Généralités sur la tuberculose d'olivier

L'olivier comme d'autres arbres fruitiers est souvent attaqué par une multitude de bioagresseurs, les plus fréquents sont des microorganismes phytopathogènes (bactéries et champignons). La tuberculose d'olivier est une maladie bactérienne très répandue actuellement dans les champs des oliviers, causée par *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*. Elle avait été décrite pour la première fois par les Grecs au 4^{ème} siècle (Surico, et al., 1985).

La maladie a été signalée en Afrique depuis du 19^{ème} siècle. En Algérie, la maladie est traditionnellement appelée « thoulal ». Elle était localisée dans la région de l'Est vers les années 1960. Actuellement, elle est propagée dans presque toutes les wilayas du pays, infligeant des pertes considérables (Benjama, 1994).

1.2.1. Symptômes de la tuberculose de l'olivier

Le principal symptôme visible de cette maladie est l'apparition, de protubérances sur les rameaux et les branches, généralement au niveau des intersections ou des nœuds à la base des feuilles et des tiges des fruits, on note aussi la présence de petites tumeurs parenchymateuses avec un aspect spongieux et de forme irrégulière. Au début de leur apparition, elles sont molles, de couleur verte et à surface lisse (Rodríguez-Palenzuela, et al., 2010).

Les parties internes de la tumeur se composent de masses de cellules spongieuses dans lesquelles se trouvent des cavités bifurquées. Les murs des cavités sont recouverts de cellules mortes contenant un nombre important de bactéries (Berardo, et al., 2018).

Les jeunes rameaux âgés d'un an perdent leurs feuillages et se dessèchent. Au cours de son développement, la tumeur peut cerner tous les périmètres de rameau et en provoquer la mort en stoppant le transport de l'eau et des nutriments aux tissus. En conséquence, les vieilles tumeurs, et celles qui se forment sur des branches moins développées sont les plus dangereuses (Ramos, et al., 2012).

Les rameaux vigoureux deviennent chétifs, en effet, à mesure que les nœuds se développent, ils les ceinturent et tuent, provoquant une réduction de la taille et de la qualité des fruits ou la mort de l'arbre dans le cas de vergers nouvellement plantés. Autrement, les arbres infectés montrent une vigueur et une croissance réduite (Bouaichi, 2019).



Figure 16 : Tumeurs dues au *Pseudomans savastanoi* sur les branches et les rameaux (a), le tronc (b), et feuille (c).

1.2.2. Description de l'agent pathogène

La tuberculose de l'olivier est une maladie bactérienne causée par *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*. Le genre *Pseudomonas* est classé dans la famille des pseudomonadaceae

Règne :	Bacteria
Division :	Proteobacteria
Classe :	Gamma Proteobacteria
Ordre :	Pseudomonadales
Famille :	Pseudomonadaceae
Genre :	<i>Pseudomonas</i>
Espèce :	<i>Pseudomonas savastanoi</i> (Young, et al., 2004)

C'est une bactérie phytopathogène qui attaque diverses espèces de plantes. Considérée auparavant comme un pathovar de *Pseudomonas syringae*, des études de phylogénie moléculaire de son ADN on conduit à la classer comme une espèce nouvelle (Young, et al., 2004). Cette espèce a été divisée en 5 pathovars :

P. s. pv. *fraxini*

P. s. pv. *nerii*

P. s. pv. *glucinea*

P. s. pv. *phaseolicola*

P. s. pv. *Savastanoi* (Boulssen, et al., 2016)

L'épithète spécifique savastanoi lui a été attribuée en hommage à Luigi Savastano, bactériologiste italien qui a démontré, entre 1897 et 1896, que le chancre de l'olivier était causé par une bactérie, qu'il a isolée et décrite sous le nom de *Bacillus oleae tuberculosis*, et qui fut renommée *Bacterium savastanoi* par Erwin F. Smith en 1908.

1.2.3. Cycle biologique l'agent pathogène

La dissémination de la bactérie s'effectue essentiellement par des vecteurs tels que les insectes contaminés par l'agent pathogène ou via les éclaboussures de pluie, causées éventuellement par des phénomènes naturels (vent, grêle...), ou encore par l'intervention de l'homme au cours des différents travaux culturaux (greffage, taille, cueillette...), les cicatrices foliaires, et les plaies de taille sont les points les plus communs d'entrée de la bactérie. Durant l'hiver, les dégâts dus au gel sont particulièrement problématiques car ils coïncident généralement avec les jours pluvieux, créant les conditions parfaites pour une épidémie (Boulssen, et al., 2016).

Les conditions climatiques optimales au développement de la bactérie de la tuberculose de l'olivier se résument à des températures comprises entre 25 et 30°C, et une humidité relative supérieure à 80%. Les galles apparaissent dans les 10 jours à plusieurs mois après les infections (Bouaichi, 2019).

Pendant les périodes de chaleur et de sécheresse en été, et durant la saison hivernale, les bactéries de la tuberculose de l'olivier se réfugient à l'intérieur des galles, où près de 90% des parasites pourront survivre et reprendre leur activité l'année d'après (Benjama, 1994).

1.3. Généralités sur les fusiaroses de la tomate

La tomate peut être victime de deux maladies fusariennes différentes soit la flétrissure fusarienne (*fusarium wilt*) causée par *Fusarium oxysporum lycopersici* abrégée FOL et la pourriture de la racine et du collet (*fusarium crown and root rot*) causée par *Fusarium oxysporum radicis-lycopersici* abrégée FORL (Blancard, et al., 2009).

La FORL est apparu dans les tomates de serre au début des années 70. La maladie s'est répandue très rapidement sur la planète. Elle peut sévir aussi bien en plein champ que sous abris, en sol comme en hors-sol. C'est dans les cultures hors sol, sur divers substrats qu'elle provoque des dégâts considérables, en particulier durant les saisons froides.

La condition favorable à la maladie est habituellement un sol froid (17-19 °C). Il semble que la disponibilité du fer dans le sol soit aussi favorable à la maladie (Anchisi, et al., 1985).

1.3.1. Symptômes de la fusariose racinaire

Les *Fusarium* sont parmi les champignons telluriques les plus agressifs, causant des flétrissements et des pourritures sur de nombreuses espèces végétales cultivées (Benhamou, et al., 1989).

Contrairement à *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*, le *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* ou FORL (Fusarium crown and root rot) est inféodé au système racinaire de la tomate, sur lequel il provoque le brunissement de nombreuses racines qui finissent par pourrir. Généralement, les tronçons de xylème situés dans le pivot et dans certaines grosses racines brunissent aussi ainsi que, par la suite, les vaisseaux de la tige. Ainsi, une strie brune, large de quelques millimètres, peut s'étendre dans celle-ci sur plusieurs centimètres (figure 17). Par la suite, le brunissement affecte une portion plus importante de vaisseaux et peut être observé jusqu'à plus de 30 cm au-dessus du sol ou du substrat).

Ces différentes altérations provoquent le flétrissement de folioles et de feuilles plutôt situées à l'apex et/ou un jaunissement des feuilles de la base des plantes. Ces symptômes foliaires surviennent souvent à l'approche de la récolte, lors de journées chaudes et à un moment où les plantes commencent à être chargées en fruits (Blancard, et al., 2009).



(Agris, 2005)

Figure 17 : Symptômes de la Fusariose vasculaire sur la tomate.

1.3.2. Description de l'agent pathogène

Systematique du champignon

Règne :	Fungi
Division :	Ascomycota
Classe :	Sordariomycetes
Ordre :	Hypocreales
Famille :	Nectriaceae
Genre :	Fusarium
Espèce :	<i>Fusarium oxysporum</i>
Sous-espèce :	<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i> (Jarvis, et al., 1978)

L'agent pathogène, *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis lycopersici*, appartient à l'ordre des Hypocreales, dans la classe des Sordariomycetes, dans la division des Ascomycotas.

Cette systématique fut cautionnée par une conférence internationale qui a eu lieu à Madison en 1924, où le premier manuel de clé d'identification des espèces de *Fusarium* fut publié (Menzies, et al., 1994).

De toutes les espèces du genre *Fusarium* que l'on rencontre dans le sol, c'est l'espèce *F. oxysporum* qui est la plus répandue. Ce champignon a la capacité de provoquer des maladies sur de nombreuses espèces végétales cultivées, d'intérêt économique. En effet, certaines souches de *F. oxysporum* sont dites pathogènes et engendrent des fusarioses (trachéomyose, nécrose, fonte de semis) sur des plantes hôtes (Blancard, et al., 2009).

Ces souches pathogènes ont une grande spécificité d'hôte et sont ainsi regroupées en formes spéciales. D'autres souches sont dites non pathogènes car leur effet pathogène n'a encore été observé chez aucune espèce végétale. Les *Fusarium oxysporum* comprennent un ensemble très diversifié de formes plus ou moins spécialisées. Les formes spécialisées de *Fusarium oxysporum* (*forma specialis* : f.sp) présentent une virulence particulière et s'attaquent à la plupart des plantes cultivées mono et dicotylédones (Menzies, et al., 1994).

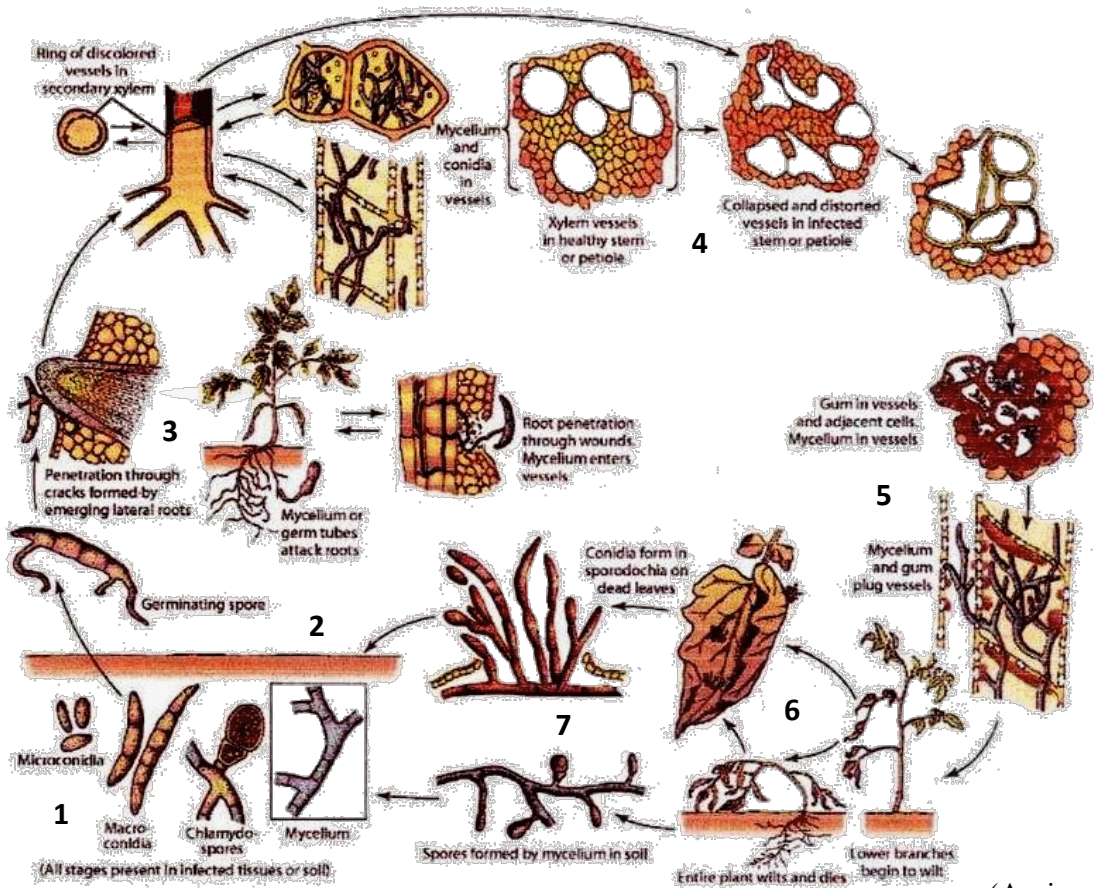
Certaines formes spéciales ne présentent plus de réel problème agronomique, c'est le cas de la forme spéciale *lycopersici*, pour laquelle la plupart des variétés de tomate cultivées sont résistantes (El Modafar, 1994). Pour des raisons économiques des variétés sensibles sont toujours cultivées dans de nombreux pays, notamment en Afrique du Nord comme l'Algérie (Si mohammed, 2012).

L'évolution génétique de ces champignons a laissé apparaître de nouvelles races capables de contourner les résistances de ces plantes, en effet, trois races de *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici* ont été récemment rapportées, elles se distinguent entre elles par leur degré de virulence vis-à-vis des cultivars de tomate. Actuellement, peu de cultivars résistants à la race 3 sont commercialisés (Jones, et al., 2014).

1.3.3. Cycle biologique l'agent pathogène

Les *Fusarium oxysporum* ne sont pas des parasites obligatoires, en absence de la plante hôte, le pathogène, parasite facultatif, survit dans le sol sous forme de mycélium, ou il mène une vie de saprophyte sur des débris végétaux et des matières organiques, ou sous forme de spores de résistance (chlamydo-spores) en état de dormance (Fuchs, 1993). Sa dissémination se fait au niveau du sol par les eaux de ruissellement, le vent ou les éclaboussures ou les importations dans l'exploitation de terreaux ou de plants contaminés (Booth, 1975).

En contact de l'hôte et une fois les conditions favorables, les chlamydo-spores germent et les jeunes filaments pénètrent au niveau des racines. Après pénétration dans la cellule épidermique, le mycélium se ramifie, colonisent ainsi toutes les cellules avoisinantes. Les hyphes mycéliens progressent à l'intérieur des cellules puis colonisent le cortex, arrivé au niveau du cylindre central, le parasite s'installe dans les vaisseaux du xylème d'où il se propagera dans la tige par l'intermédiaire des microconidies aisément véhiculées par la sève dans toutes les parties de la plante. A la surface des feuilles, se forment des organes fructifères appelés sporodochies qui produisent des macroconidies qui vont à leur tour contaminer d'autres plantes lorsqu'elles sont transportées par le vent, par l'eau ou bien par l'intermédiaire des insectes (Blancard, et al., 2009).



(Agrios, 2005)

Figure 18 : Cycle de vie du *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici*.

1. Conidies, chlamydo-spores ou mycélium vivant dans le sol.
2. Germination des spores.
3. Pénétration du tube germinatif à l'intérieur des racines.
4. Invasion des vaisseaux par les conidies et/ou mycélium.
5. Production de gomme à l'intérieur des vaisseaux.
6. Flétrissement et mort de la plante.
7. Sporodochies ou mycélium produisant des conidies.

2. Défenses préexistantes de la plante

Difficile de se défendre contre une agression quand on a les pieds plantés dans le sol. Face aux attaques de virus, d'insectes, de champignons, ou de bactéries, les végétaux ont dû ruser pendant des millions d'années pour survivre (Catier, et al., 2007).

Qu'il s'agisse de virus, de mycoplasmes, de bactéries, de champignons, de nématodes ou d'insectes, les plantes se trouvent exposées, en permanence, à une multitude d'organismes potentiellement pathogènes (Charrié, et al., 2017).

Pourtant, même dans des conditions de température et d'humidité favorables à l'établissement d'infections, le plus souvent, beaucoup de plantes demeurent saines; c'est donc qu'elles disposent de moyens de défense efficaces (André, 1979). Les plantes saines synthétisent de nombreux métabolites secondaires servant à se défendre contre d'éventuels agresseurs.

Ces molécules antimicrobiennes ou anti-herbivores sont, soit stockées sous une forme inactive, et activées suite à l'attaque pathogène, soit séquestrées dans un compartiment cellulaire, et libérées lors de la destruction des tissus par l'agresseur (Morot-Gaudry, et al., 2017). Mal connus, ces dispositifs font aujourd'hui l'objet de recherches intenses devant l'enjeu de la protection des cultures.

Les métabolites secondaires élaborés en réponse aux attaques des différents microorganismes phytopathogènes font plus particulièrement l'objet de cette thèse ; ils sont considérés comme source naturelle d'antimicrobiens.

Partie expérimentale

Chapitre 01 :

***Matériel* et Méthodes**

Partie expérimentale

Chapitre 01 : Matériel et méthodes

L'objectif de ce présent travail de thèse s'inscrit dans le cadre de la valorisation des substances naturelles à travers l'analyse de la composition chimique des huiles essentielles de quelques cupressacées, et l'évaluation de leurs propriétés antibactériennes et antifongiques dans le dessin de contribuer à trouver des solutions aux problèmes engendrés par l'utilisation des pesticides conventionnels.

Les matériels utilisés dans ce travail sont de trois ordres : (1) matériel végétal, constitué de quatre espèces de cupressacées (*Juniperus phoenicea*, *Juniperus oxycedrus*, *Cupressus sempervirens* et *Tetraclinis articulata*), (2) matériel biologique constitué de souches fongique et bactérienne phytopathogènes et (3) des équipements de laboratoire.

1. Zone d'étude

Les différents sites de collecte d'échantillons végétaux se répartissent sur tout l'espace sud de la wilaya de Tiaret (figure 19), une région qui fait partie des Hautes Plaines steppiques sud-oranaises, appartenant à l'étage bioclimatique semi-aride caractérisé par un profil très spécifique du point de vue de ses contraintes et potentialités (Benkhettou, et al., 2016). Les approches climatologique, géomorphologique, pédologique et biogéographique montrent que ce milieu est particulièrement contraignant pour les activités humaines. Les immenses espaces ouverts, la chaleur caniculaire de l'été et le froid rigoureux de l'hiver, les vents violents, les sols squelettiques peu favorables à la mise en valeur, ainsi que la végétation naturelle au faible taux de recouvrement résumant en quelque sorte cette inclémence du milieu steppique (Aidoud, 1989; Le Houérou, 1995). La formation steppique, aux multiples variétés végétales à caractère herbacé ou plus ou moins arbustif n'est en définitive qu'une réponse biologique à des conditions écologiques sévères. (Hadeid, et al., 2015).

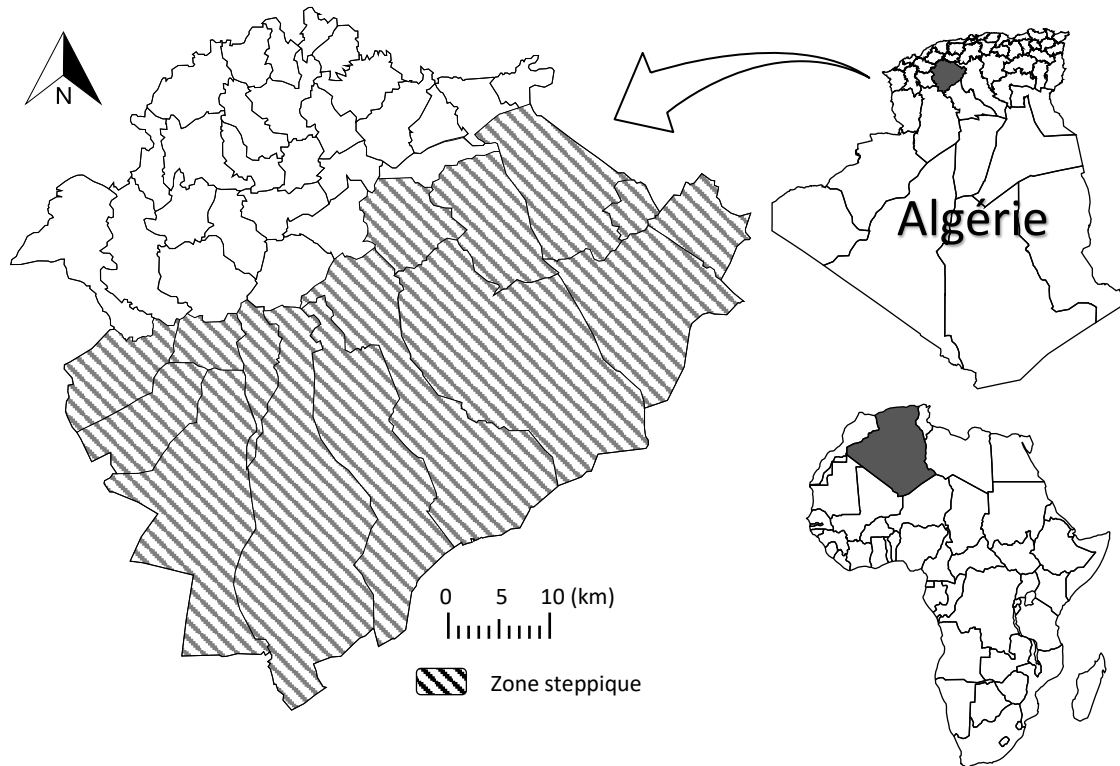


Figure 19 : Localisation géographique des stations de prélèvement des échantillons de plantes.

2. Systématique et description botanique des espèces étudiées

En Algérie, les ressources floristiques sont très importantes, elles constituent un patrimoine par leur diversité et la richesse de leurs dérivés. Dans ce présent travail, nous nous intéressons à quelques espèces de cupressacées. Ces dernières remplissent plusieurs rôles dans la nature, entre autres : écologiques (essence de protection et ornementale), économiques (production de bois, résines et huiles essentielles), etc.

2.1. *Cupressus sempervirens*

Le Cyprès commun est un genre d'arbres sempervirents de la famille des Cupressacées originaires des régions tempérées chaudes de l'hémisphère nord. Certains auteurs pensent le nom *Cupressus* vient du latin Cyprus qui indique son origine chypriote, *sempervirens* signifie toujours vert, persistant, mot qui vient du latin « *semper* » toujours et « *virens* » qui signifie vert (Mitchell, et al., 2006). Le cyprès commun a été

depuis très longtemps, planté sur tous le pourtour du bassin méditerranéen, c'est un arbre représentatif de la flore méditerranéenne, l'arbre des cimetières, symbole du deuil (Vidakovic, et al., 1993).

Systematique du Cyprès commun

Embranchement :	Spermaphytes
Sous- Embranchement :	Gymnospermes
Classe :	Pinopsida
Ordre :	Pinales
Famille :	Cupressacées
Genre :	Cupressus
Espèce :	<i>Cupressus sempervirens</i> L. (Quézel, et al., 1962)

2.1.1. Description

Le Cyprès commun un conifère à grande longévité, monoïque et thermophile, au tronc rectiligne à l'écorce d'un gris brunâtre fibreuse se fissure verticalement avec l'âge. Les branches dressées, proches du tronc présentent un port très étroit et allongé, à sommet très effilé, malgré une longévité, il ne devient pas très haut : de 20 à 30 m tout au plus (Mitchell, et al., 2006). Les feuilles sont en forme de petites écailles vert foncé de 1 mm de long, opposées, très denses et se chevauchant à la manière des tuiles d'un toit, recouvrant entièrement le rameau. Elles ne dégagent qu'une odeur très faible, même froissée. Les cônes sont globuleux, de 2 à 3 cm, fixés sur des rameaux de 2 ans et composé de 10 à 14 écailles polygonales avec une petite protubérance d'un brun clair à brun foncé à maturité (tous les deux ans), contenant de nombreuses graines ailées (Quézel, et al., 2004).



(Tiaret, 2017)

Figure 20 : Photographies des différentes parties du *C. sempervirens* (feuilles, fruits, rameaux).

2.1.2. Répartition du Cyprès commun en Algérie

Le cyprès vert (*Cupressus sempervirens* L.) ne forme pas de massif forestier, et ne concurrence pas le pin d'Alep sur les pentes, mais se maintient disséminé, dans les fonds. Il est typique du paysage algérien et a souvent été planté à des fins ornementales, en brise-vent ou encore en tant qu'arbre forestier. Par ailleurs, peu de données sont fournies quant à la répartition sectorielle et du peuplement du cyprès (Quézel, et al., 2004).

2.1.3. Intérêt économique et écologique

Le Cyprès vert, depuis son existence forme une source vitale des populations et assure une activité économique très importante, du fait de ses qualités remarquables : sa longévité, sa résistance à la compression et sa bonne production de bois qui possède une bonne valeur technologique (Ait Youssef, 2006). L'espèce est aussi utilisée comme brise-vent permettant de border et délimiter les champs et pour créer un microclimat favorable aux cultures (Letreuch, 1991).

2.2. Genévrier de Phénicie

Le Genévrier de Phénicie, est un arbrisseau de la région méditerranéenne, il occupe une place importante dans le paysage nord-africain, essentiellement en raison de sa rusticité et de son dynamisme ; cet arbre tire son nom du mot celtique *Juneperus* qui signifie un buisson âpre ou rude, à cause de la saveur des fruits. Il se distingue du genévrier cade, qui a le même habitat, par ses feuilles en écailles et non en aiguilles (Ait Youssef, 2006).

Systematique du genévrier de Phénicie

Embranchement :	Spermaphytes
Sous- Embranchement :	Gymnospermes
Classe :	Conifères
Ordre :	Coniférales
Famille :	Cupressacées
Genre :	Juniperus
Espèce :	<i>Juniperus phoenicea</i> L. (Quézel, et al., 1962)

2.2.1. Description

Le Genévrier de Phénicie ou genévrier rouge (*J. phoenicea* L.) est un arbrisseau touffu ou un arbuste de 1 à 3 m de hauteur, mais pouvant atteindre cependant jusqu'à 08 à 10 mètres avec une couronne dense et conique et une écorce brune foncée, très mince d'environ 01 mm de diamètre. Au jeune âge, certaines feuilles sont en aiguilles et d'autres en écailles très petites, très imbriquées, opposées, formant le feuillage vert persistant de l'arbre après les premières années. Les branches forment une corbeille très compacte de rejets, dont certaines ont 05 mètres de diamètre et 03 mètres de hauteur, mais cette faculté de rejet de la tige n'a lieu, sans doute, que pour des sujets jeunes, de moins de 50 à 60 ans (Boudy, et al., 1952). Les fleurs sont monoïques, c'est à dire, que c'est une plante à fleurs unisexuées mâles et femelles séparées, portées par le même pied. Les fruits sont globuleux, d'environ 1 cm de diamètre, brillant, jaunâtre ou brun rougeâtre, légèrement prune, portés sur une tige d'environ 5 mm de long et lors de la deuxième année ils sont composés de 06 à 08 écailles avec 03 à 09 graines

(Vidakovic, et al., 1993). Cette espèce est indifférente au substrat ; elle est présente en bioclimat surtout semi-aride et aride en ambiance nettement continentale se contentant de précipitations comprises entre 200 et 400 mm (Quézel, et al., 1962).



(Tiaret, 2017)

Figure 21 : Photographies des différentes parties du *J. phoenicea* (feuilles, fruits, rameaux).

2.2.2. Répartition du genévrier de Phénicie en Algérie

En 1962, le genévrier de Phénicie n'était présent qu'en kabyle, dans les rochers des hautes montagnes du Djurdjura. Aujourd'hui, l'espèce est retrouvée sur l'ensemble du littoral, sur les hauts plateaux et l'Atlas saharien de l'Oranais, de l'Algérois et du Constantinois. Il constitue, au côté du cèdre, la principale couverture végétale dans les montagnes des Aurès, notamment dans le sud de ce massif (régions de Maafa, Beni Fodhala, etc.) (Ait Youssef, 2006).

2.2.3. Intérêt économique et écologique

Le bois du genévrier clair pour le houpplier, jaune sombre pour le cœur, est imputrescible. Il a de grandes qualités pour la construction et la menuiserie. Comme bois de feu, il est excellent. Seules ses faibles dimensions limitent son emploi (Boudy, et al., 1952).

Les feuillages sont parfois utilisés pour l'alimentation de bétail et en médecine traditionnelle en décoction contre les troubles digestifs. Quant aux branches, elles sont utilisées pour la production du goudron végétal naturel, qui est utilisé pour traiter certains cas d'eczéma. On l'utilise aussi en inhalation contre l'asthme, les maux de tête et les étourdissements (Ait Youssef, 2006).

Les rameaux sont riches en huiles essentielles dont le rendement d'extraction est de l'ordre de 0,8 % à 1%. De nombreux auteurs ont rapporté que les extraits sont pourvus de composés chimiques ayant une activité antimicrobienne (Aouni, et al., 2013; Bourkhiss, et al., 2011; Laib, 2012).

2.3. Genévrier oxycède

Le Genévrier oxycède (*Juniperus oxycedrus* L.) appartient à la famille des cupressacées, c'est un arbre aromatique qui se rencontre dans la région méditerranéenne et du Proche-Orient.

Systematique du genévrier oxycède

Embranchement :	Spermaphytes
Sous- Embranchement :	Gymnospermes
Classe :	Conifères
Ordre :	Coniférales
Famille :	Cupressacées
Genre :	Juniperus
Espèce :	<i>Juniperus oxycedrus</i> L. (Quézel, et al., 1962)

2.3.1. Description

Le Genévrier oxycède (*Juniperus oxycedrus* L.), ou cade, est un petit arbre ou un arbrisseau fréquent en région côtière méditerranéenne, où il est l'une des plantes caractéristiques des garrigues et des maquis. Cette espèce peut atteindre jusqu'à 14 m de hauteur, mais elle se présente généralement sous la forme d'un arbuste de 01 à 02

m, parfois moins. Les feuilles, persistantes, se présentent sous la forme d'aiguilles de couleurs vertes, elles sont disposées par trois sur un même niveau (verticillées), terminées en pointe aigüe, marquées au-dessus de deux bandes blanchâtres séparées par la nervure médiane verte. Les fruits sont rouges et luisants à maturité (au bout de 02 ans) en forme de cônes arrondis de 06-08 mm, c'est d'ailleurs par ses fruits qu'on le distingue du Genévrier commun (ainsi que des 02 sillons blancs sous les feuilles). L'écorce, plutôt rugueuse, est de couleur grise ou rougeâtre (Quézel, et al., 1962).



Figure 22 : Photographies des différentes parties du *J. oxycedrus* (feuilles, fruits, rameaux).

2.3.2. Répartition du Genévrier oxycède en Algérie

Le Genévrier oxycède est l'espèce la plus courante dans le bassin méditerranéen. Il est présent sur tout le pourtour méditerranéen jusqu'au Moyen-Orient (Quézel, et al., 2004). Il est très répandu en Algérie, on le rencontre dans le secteur saharo atlasique (monts des Ksours, Djebel Amour, monts des Ouleds Nail, monts des Zab), il apprécie les lieux arides, rocaillieux, sur calcaire ou sur sols acides, où il est fréquemment associé au chêne vert et au chêne kermès, il colonise également les dunes littorales (Bouyahyaoui, et al., 2017).

2.3.3. Intérêt économique et écologique

Cet arbre joue un rôle socio-économique important en Afrique du Nord, il constitue un lieu de pâturage pour le bétail et fournit des produits pour les usages domestiques. L'arbre est très rameux, exploité pour le bois, qui est homogène et à grain fin est très utilisé en ébénisterie, les activités artisanales, voire à d'autres fins industrielles (Letreuch, 1991). Il est assez apprécié pour le chauffage et donne un charbon de bonne qualité. Les baies et la résine sont très aromatiques, on en extrait, par distillation, l'huile de Cade, produit pharmaceutique. (Mitchell, et al., 2006).

2.4. Thuya de Berbérie

Le thuya de Berbérie, *Tetraclinis articulata* (Vahl) Master, espèce résineuse, thermoxérophile, de la famille des Cupressacées, le genre *Tetraclinis* ne contient que l'espèce *articulata*, c'est une plante endémique de l'Afrique du Nord (Maroc, Algérie et Tunisie) (Bourkhiss, et al., 2011) et constitue un élément important dans la végétation forestière nord-africaine puisqu'il couvre plus d'un million d'hectares (El Mouridi, 2011).

Systématique de la plante

Embranchement :	Spermaphytes
Sous Embranchement :	Gymnospermes
Classe :	Conifères
Ordre :	Coniférales
Sous ordre :	Taxales
Famille :	<i>Cupressacées</i>
Genre :	<i>Tetraclinis</i>
Espèce :	<i>Tetraclinis articulata</i> Vahl (Quézel, et al., 1962)

2.4.1. Description

Le thuya de Berbérie, est un résineux à feuillage léger et persistant, qui atteint rarement 6-8 m de haut, avec un tronc mesurant jusqu'à 1 m de circonférence, son port est pyramidal à branchage épais caractérisé par un arrangement unique des branches, à l'écorce brun grisâtre riche en tanin (Hadjadj, 2016). Les feuilles sont réduites en écailles opposées et imbriquées par deux et dégagent une odeur aromatisée. Le fruit est un cône de forme quadrangulaire de 5 à 6 mm de diamètre, rouge brun à maturité, appelé galbules, s'ouvre, à maturité, par quatre valves ligneuses, sous l'effet de la chaleur libérant ainsi six graines ailées (Maatoug, 2003). La longévité du Thuya du Maghreb peut dépasser les 400 ans, et il possède une odeur très caractéristique à lui, il ne possède pas des canaux résinifères dans le bois comme le pin, mais il en existe dans l'écorce (Boudy, et al., 1952).



(Tiaret, 2017)

Figure 23 : Photographies des différentes parties du *T. articulata* (feuilles, fruits, rameaux).

2.4.2. Répartition du thuya de Berbérie en Algérie

Le thuya de berbérie (*Tetraclinis articulata*), est une essence qui est essentiellement cantonnée en région méditerranéenne méridionale occidentale. Au niveau de l'Afrique du Nord, les forêts de thuya de Berbérie couvrent une superficie totale de 1 million d'hectares, parmi lesquels 600 000 ha sont au Maroc (El Mouridi, 2011). En Algérie,

il est surtout dans le Nord occidental et il apparaît comme le prolongement de son aire marocaine, Boudy *et al* (1952) ont mentionné que le thuya était très commun dans le secteur littoral oranais, assez commun dans le secteur algérois et le sous-secteur des hauts plateaux et très rare dans le Tell constantinois aussi bien que dans la région littorale orientale à cause du froid et de l'humidité. L'espèce aurait occupé, en 1950, une superficie de 161 000 ha. Actuellement, il s'étend encore sur un peu plus de 143 000 ha et occupe la quatrième place en matière de superficie, après le pin d'Alep, le chêne vert et le chêne-liège (Maatoug, 2003).

2.4.3. Intérêt économique et écologique

Le thuya est une plante médicinale, surnommé au XVII^e siècle « arbre de vie » en raison de sa valeur médicinale attribuée à son feuillage et sa résine balsamique où l'extrait de cette résine est utilisé à des fins thérapeutiques (Bourkhiss, et al., 2011)

Le thuya joue également un rôle socio-économique important, il constitue un lieu de pâturage pour le bétail et son bois fournit des produits pour les usages domestiques et on l'utilise aussi pour la charpente de maisons traditionnelles (El Mouridi, 2011). Le thuya est un grand classique parmi les arbres utilisés pour créer des haies et maintenir la biodiversité. Il est apprécié pour sa croissance rapide, sa résistance à la pollution (Letreuch, 1991).

2.5. Collecte des échantillons de plantes

Les plantes ayant fait l'objet de cette étude appartiennent à quatre espèces de cupressacées (*Juniperus phoenicea*, *Juniperus oxycedrus*, *Cupressus sempervirens* et *Tetraclinis articulata*). Les échantillons de feuilles qui seront soumis à l'extraction des huiles essentielles ont été prélevés de peuplements spontanés dans diverses stations dans la région steppique de la wilaya de Tiaret, et à des lieux éloignés de toute source de pollution. La période de collecte du matériel végétal dépend des organes utilisés. Dans l'ensemble de la zone d'étude, la collecte des échantillons de plantes (fleurs et fruits) est soumise à la phénologie des espèces qui les produisent. En ce qui concerne les feuilles, leur collecte ne subit pas les contraintes d'une certaine périodicité, étant donné que les quatre espèces sont sempervirentes. Les feuilles, sont ainsi exploitées tout au long de l'année.

Une fois récolté, le matériel végétal a été identifié, débarrassé des impuretés solides de type organique (rameaux, écorces, etc.) et minéral (sables, poussières, etc.) puis séché à l'abri de la lumière dans un endroit aéré pendant 20 jours ou plus. Les feuilles séchées ont été conservées dans des sacs en papier dans un endroit frais et sec, à l'abri de la lumière.

Les travaux de laboratoire, ont été conduits à la faculté des sciences de la nature et de la vie (Université de Tiaret) dans les laboratoires de physiologie végétale, microbiologie et biochimie. Ces travaux se sont étendus de décembre 2017 à juillet 2018. Le protocole détaillé est présenté sur la figure 24.

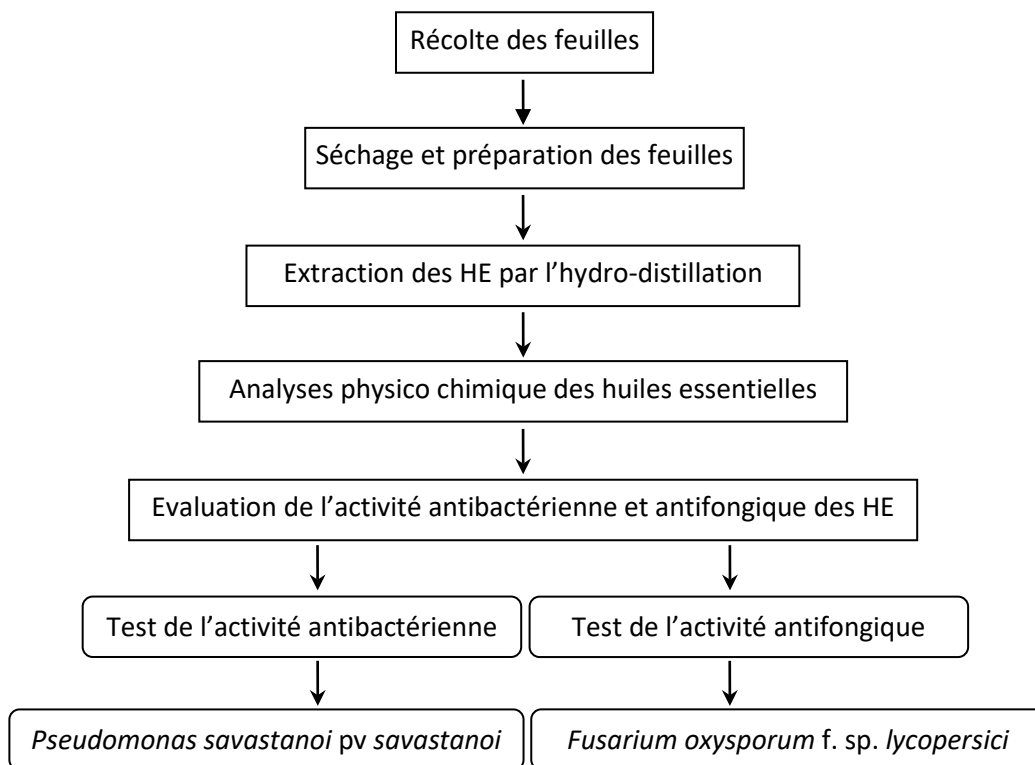


Figure 24 : Protocole expérimental.

2.6. Extraction des huiles essentielles

L'extraction des huiles essentielles a été effectuée par hydrodistillation à l'aide d'un appareil de type Clevenger. Le dispositif (figure 25) constituant souvent une référence en matière d'extraction solide-liquide n'est qu'une méthode d'extraction parmi tant d'autres, et ne peut en aucun cas donner accès à autre chose qu'une quantité de matière

extractible, sans présumer du contenu réel du liquide. C'est un appareil de laboratoire dont les résultats ne peuvent être extrapolés pour des essais pilotes. Lors de cette série d'essais, nous avons utilisé une batterie d'extracteurs, chaque extracteur comprend deux éléments essentiels :

Un ballon d'une capacité de 1 litre où baigne la matière végétale, qui est porté à ébullition au moyen d'une chauffe ballon. Ce ballon est surmonté d'un coude en verre relié à un réfrigérant qui sert à condenser la vapeur d'eau contenant l'huile essentielle extraite. Au cours de chaque essai, 50 g de matière première sèche a été traitée à 500 mL d'eau distillée, dès que la température avoisine 95 °C, une ébullition de l'eau contenue dans le ballon se produit et la vapeur entraîne avec elle l'huile essentielle. Ces vapeurs mixtes sont condensées dans le réfrigérant et récupérées dans un Erlenmeyer.

À la fin de l'opération, la décantation est réalisée dans une ampoule à décanter de 500 ml, dans laquelle, le mélange précédent, se sépare en deux phases non miscibles. L'huile essentielle récupérée est conservée à 4°C dans des tubes en verre, fermés hermétiquement, pour la préserver de l'air, de la lumière et des variations de température, qui sont des principaux agents de dégradation.

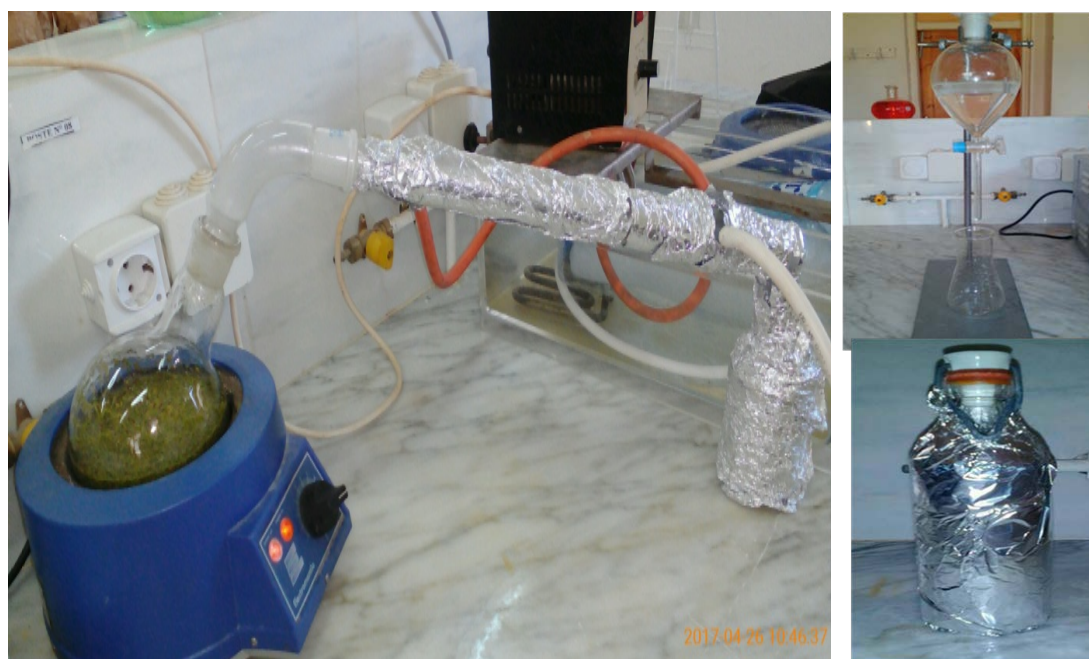


Figure 25 : Montage de l'hydrodistillation utilisé.

2.6.1. Calcul du rendement

Le rendement d'extraction exprimé en pourcentage est le rapport entre le poids de l'huile essentielle et le poids de la partie de la plante à traiter, il a été calculé par la formule de Carré, (1938) :

$$R_{HE} (\%) = \frac{P_{HE}}{P_F} \times 100$$

Avec : P_{HE} : Poids de l'huile en g ; P_F : Poids des feuilles sèches en g ; $R_{HE} (\%)$: Rendement de l'huile essentielle.

3. Analyses des propriétés physico-chimiques des HE

L'analyse physico-chimique des huiles essentielles, permet d'étudier la composition chimique, la quantification des composés d'intérêt et vérifier la qualité, les éventuelles impuretés et même l'authentification de leur origine (Xavier, et al., 2012). Quel que soit le secteur d'utilisation, l'analyse physico-chimique préalable des huiles essentielles reste une étape importante.

Dans notre étude, plusieurs propriétés physico-chimiques ont été déterminées selon un protocole précis et obéissent à des normes édictées par l'organisation internationale de normalisation (I.S.O) :

- Examens organoleptiques : aspect, viscosité, couleur, odeur.
- Examens physiques : densité, indice de réfraction, pouvoir rotatoire, miscibilité à l'éthanol à 80%.
- Enfin la composition chimique (identification qualitative et quantitative) de cette partie volatile a été estimée par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CPG/SM).

3.1. Mesures physiques

3.1.1. Densité

La densité relative à la température ordinaire (20 °C) d'une huile essentielle est le rapport de la masse d'un certain volume d'huile essentielle à la température ordinaire à la masse d'un égal volume d'eau distillée à cette température.

Mode opératoire

Cette grandeur sans dimension est mesurée à l'aide d'un *pycnomètre*. Elle est donnée par la formule suivante :

$$D = \frac{m_2 - m_0}{m_1 - m_0}$$

Avec m_2 : masse du pycnomètre avec l'huile essentielle, m_1 : masse du pycnomètre avec l'eau, m_0 : masse du pycnomètre vide (ISO, 2019).

3.1.2. Indice de réfraction

L'indice de réfraction reflète le changement de direction subi par un rayon lumineux passant d'un milieu optique à un autre (par exemple de l'air à l'huile essentielle), à 20°C. L'indice de réfraction est utilisé pour identifier une huile essentielle (critère de pureté), et pour vérifier la qualité de la distillation (distillation trop rapide, lente, à température trop élevée, basse...etc.)

Mode opératoire

Les indices de réfraction sont mesurés à l'aide d'un *réfractomètre* à la température ambiante puis ramenés à 20°C par la formule :

$$N_{20} = N_t + 0,00045 (T - 20 \text{ °C})$$

Avec :

N_{20} : indice à 20°C,

N_t : indice à la température ambiante ou de mesure

T : température ambiante ou de mesure

Il s'agit d'une grandeur sans unité, les produits étalons de qualité pour réfractométrie servant à ajuster le réfractomètre sont les suivants (les indices de réfraction à 20°C sont donnés dans la parenthèse) :

- eau distillée (1,333)
- benzoate de benzyle (1,5685)
- Bromo-1 naphthalène (1,6585) (ISO, 2019).

3.1.3. Pouvoir rotatoire

Le pouvoir rotatoire, caractéristique des molécules chirales, exprime la capacité qu'elles ont à dévier la lumière polarisée. Il s'agit de l'angle, exprimé en milliradians ou degrés d'angle, selon lequel tourne le plan de polarisation d'une radiation lumineuse lorsqu'elle traverse une solution contenant des molécules chirales. (ISO, 2019)

Mode opératoire

La mesure, réalisée avec un *polarimètre*. Pour les valeurs positives, la substance étudiée sera dite dextrogyre et lévogyre pour les valeurs négatives. Les huiles essentielles sont actives sur la lumière polarisée de manière très variable en fonction de la nature et de la concentration des différentes molécules chirales qu'elles contiennent.

3.1.4. Caractéristique organoleptique

L'examen organoleptique comprend toutes les activités relatives à la vérification des paramètres palpables à l'aide des organes de sens sans recourir aux appareils de mesure plus ou moins complexes. L'aspect, la couleur et l'odeur d'une huile essentielle ont été déterminés de façon à apprécier la qualité de celle-ci.

3.2. Analyses chromatographiques

3.2.1. Chromatographie en phase gazeuse

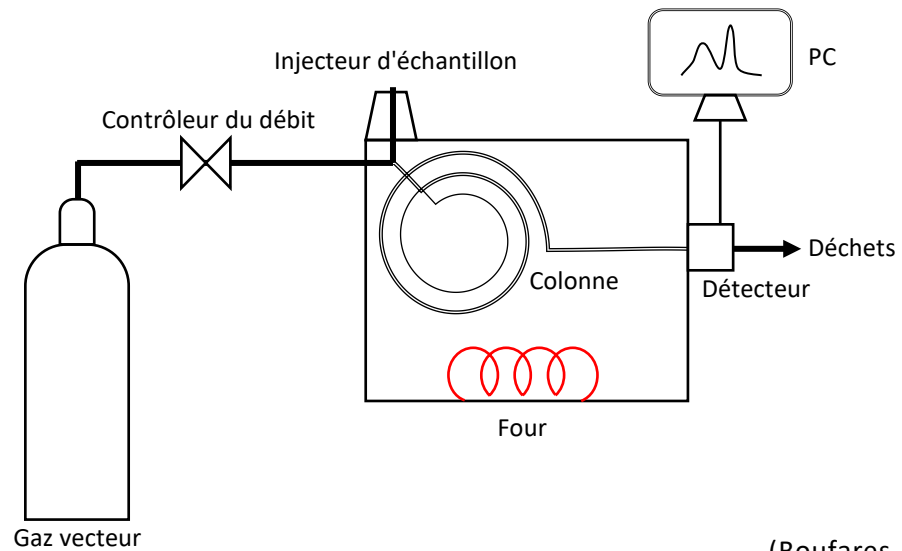
La chromatographie en phase gazeuse est la méthode la plus utilisée dans le domaine des huiles essentielles. C'est une méthode de séparation des composés gazeux ou susceptibles d'être vaporisés par chauffage sans subir une décomposition dont voici le principe :

La CPG-SM, permet d'obtenir, outre la séparation, des informations sur la structure des molécules séparées en comparant les données spectrales avec celles de produits de référence contenus dans des bibliothèques de spectres. Les données spectrales sont systématiquement associées à l'utilisation des indices de rétention, qui sont calculés à partir des temps de rétention d'une gamme étalon d'alcane ou plus rarement d'esters méthyliques linéaires, à température constante (indice de Kováts) ou en programmation de température (indice de rétention). Dans des cas plus complexes, des colonnes capillaires à haute résolution sont utilisées (Buronzo, 2012).

Ainsi le couplage CPG-SM permet de disposer d'un outil analytique très performant. La SM en mode impact électronique (SM-IE) est la technique la plus utilisée dans le domaine des huiles essentielles pour connaître la masse moléculaire et les informations structurales relatives à une molécule à partir de sa fragmentation. Dans la source d'ionisation, les molécules peuvent être bombardées à l'aide d'électrons générés par l'incandescence d'un filament de tungstène, conduisant ainsi à la formation des ions en phase gazeuse. Les ions sont ensuite dirigés vers la partie analytique de l'appareil dont il existe plusieurs types, mais les plus utilisés dans le cas des huiles essentielles sont le « quadripôle » et le « piège à ions » (Marouf, et al., 2015).

Pour réaliser nos spectres, nous avons utilisé la chromatographie en phase gazeuse un appareil de type Hewlett-Packard (6890) couplé à un spectromètre de masse (CPG/SM), les analyses ont été effectuées au laboratoire de chimie analytique, département de pharmacie, faculté de médecine, université d'Alger 1 et au centre de recherche scientifique et technique en analyses physico- chimiques (CRAPC), à Bou Ismaïl, wilaya de Tipaza. L'appareil est équipé d'une colonne capillaire HP-5MS (30 m × 0,25 mm), avec une épaisseur de film de 0,25 µm. La température de la colonne est programmée de 50 à 250 °C à raison de 4 °C/min. Le gaz vecteur est l'hélium dont le débit est fixé à 1,5 mL/min. Le mode d'injection est du mode split (rapport de fuite :

1/70), la fragmentation est effectuée par impact électronique à 70 eV. L'appareil est relié à un système informatique gérant une bibliothèque de spectre de masse NIST 98 et piloté par un logiciel « HP ChemStation » permettant de suivre l'évolution des analyses chromatographiques. Le schéma principal de la CPG est présenté sur la figure 26.



(Boufares, 2020)

Figure 26 : Schéma simplifié de différents modules du chromatographe en phase gazeuse.



Figure 27 : Photographie d'un chromatographe en phase gazeuse.

4. Méthodes microbiologiques

Méthodes d'étude du pouvoir antimicrobien

Afin de tester l'activité antimicrobienne des huiles essentielles, on a opté pour deux microorganismes phyto pathogènes à savoir *Pseudomonas savastanoi* pv *savastanoi* qui est une bactérie Gram négatif, agent de la tuberculose de l'olivier provoquant l'une des plus graves maladies bactériennes omniprésentes dans le bassin méditerranéen (Benjama, 1994), sans traitement efficace à l'heure actuelle et *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* qui est une souche fongique responsable de la pourriture et l'altération des cultures de tomate (Henni, et al., 1994), traité par des fongicides chimiques qui deviennent, à leur tour, très dangereux pour la santé humaine et l'environnement.

La bactérie a été prélevée à partir des tumeurs d'oliviers infectés, puis isolée et identifiée, au niveau du laboratoire de microbiologie, alors que la souche fongique est issue d'une collection conservée au sein du même laboratoire de la faculté des sciences de la nature et de la vie de l'université Ibn Khaldoun de Tiaret.

4.1. Activité antibactérienne

4.1.1. Préparation de l'inoculum

L'espèce cible (souche bactérienne choisie) a été revivifiée et repiquée dans la gélose nutritive, puis incubée à des températures optimales de développements (25 ± 2 C°) pendant 18 heures pour l'obtention d'une culture jeune. Par la suite, des suspensions troubles de cette souche seront réalisées en prélevant 3 à 5 colonies bien isolées et identiques. On les dépose dans 5 ml d'eau physiologique stérile puis on agite au vortex. Les concentrations bactériennes de l'inoculum sont évaluées par turbidité et sont exprimées par la mesure de la densité optique (DO à 600 nm) sur un spectrophotomètre. Une DO de 0.08 à 0.1 correspond à une concentration de 10^8 UFC/mL.

4.1.2. Méthode de contact indirect aromatoigramme

L'étude de l'activité antibactérienne des huiles essentielles a été réalisée *in vitro* selon la méthode aromatoigramme, (Remmal, et al., 1993) qui se base sur le pouvoir migratoire des huiles essentielles sur la surface d'un milieu gélosé solide à base de Mueller-Hinton. La suspension bactérienne préparée à partir d'une culture jeune (18h),

en milieu bouillon nutritif (BN), diluée dans de l'eau physiologique de manière à renfermer 10^8 germes/ml, est d'abordensemencée en surface sur milieu gélosé en boîte de Pétri de 9 cm de diamètre.

Puis, des disques en papier-filtre de 6 mm de diamètre sont imbibés d'huile essentielle pure à concentration de 20 μL de chaque espèce sont déposés, sur un tapis bactérien au tout début de sa croissance sur milieu gélosé.

Enfin, les boîtes de Pétri sont placées dans une étuve pour incubation à 25 ± 2 °C pendant 72 heures.

Après incubation, l'obtention d'un halo clair autour du disque, mesuré en millimètres disque inclus avec un pied à coulisse, indique l'inhibition du développement bactérien ou l'activité antibactérienne de l'huile essentielle (figure 28). Chaque test est réalisé trois fois au cours de trois expériences successives.

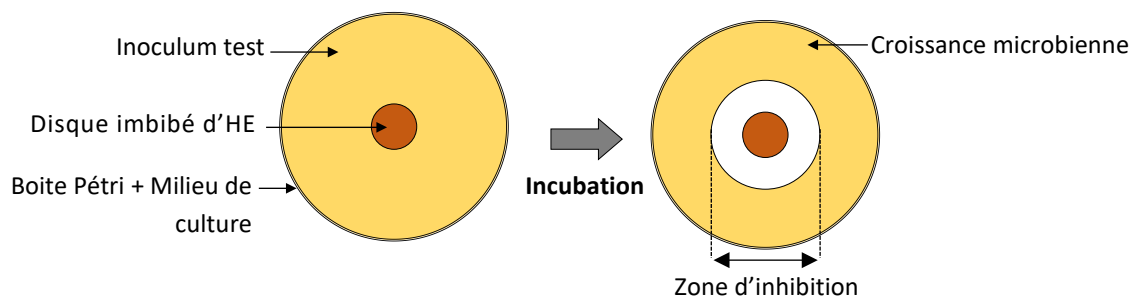


Figure 28 : Illustration de la méthode des aromagrammes sur boîte de Pétri.

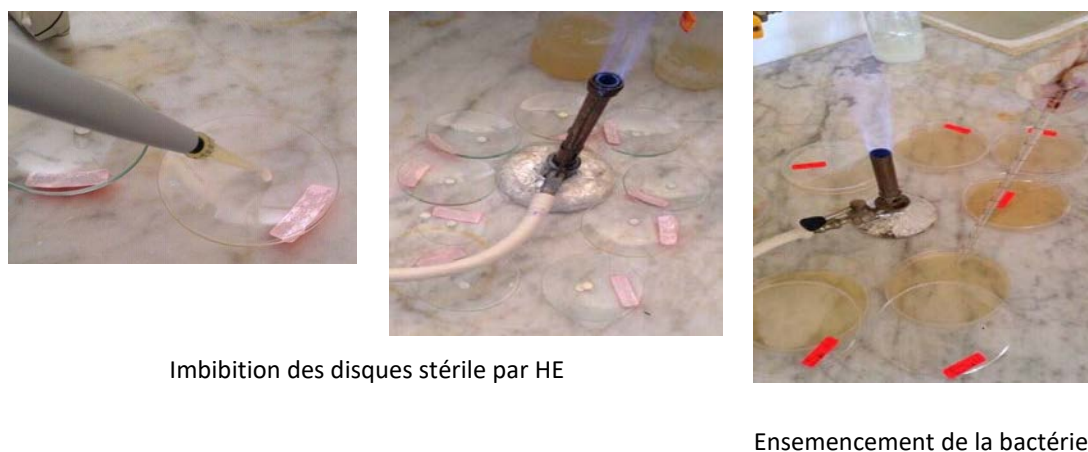


Figure 29 : Etapes de la méthode des aromagrammes sur boîte de Pétri.

4.1.3. Méthode de dilution en milieu liquide

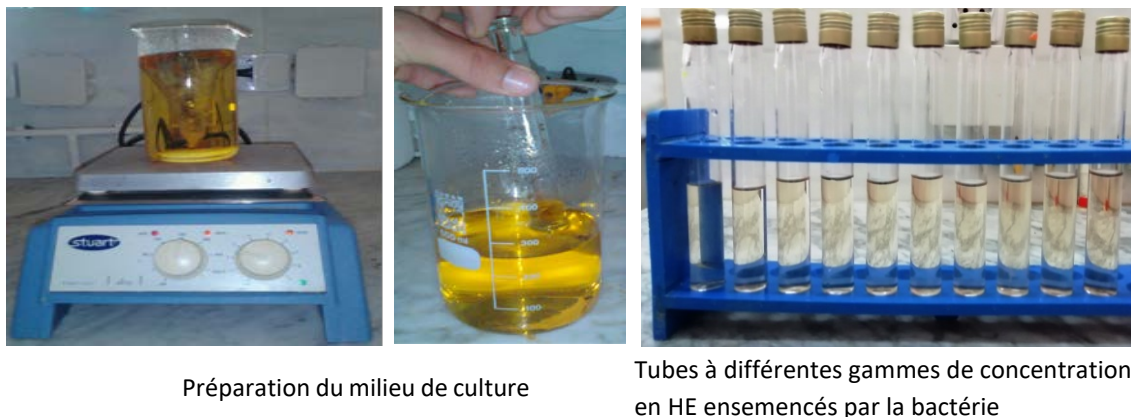
La détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) consiste à inoculer, une gamme de concentration décroissante en huile essentielle par la souche bactérienne dont le but est de déterminer la concentration la plus faible de l'huile essentielle qui inhibe la croissance de la bactérie testée *P. savastanoi* pv *savastanoi*. La solubilisation des huiles essentielles est réalisée dans du Tween 80 ou dans du sulfoxyde de diméthyle (DMSO) afin de favoriser le contact germe/émulsion. L'activité antibactérienne de ces solvants a été préalablement testée aux concentrations utilisées, ils sont sans effet sur la croissance bactérienne.

Pour ce faire, 400 μL de l'huile essentielle à tester sont placés dans un tube stérile contenant 4,6 mL de milieu MHB (Müeller-Hinton Broth), supplémenté en Tween 80 (0,01 %, v/v). Une dilution en cascade est effectuée dans du milieu MHB-Tween 80, de manière à obtenir une gamme de concentration comprise entre 40 mg/mL et 0,3 mg/mL (les concentrations finales de la gamme ainsi générée sont : 40 ; 20 ; 10 ; 5 ; 2,5 ; 1,25 ; 0,6 ; 0,3 mg/mL).

15 μL d'un inoculum bactérien, de densité équivalente au standard 0,5 de Mac Farland (10^8 germes/mL), sont déposés dans chacun des tubes de la gamme, lesquels sont ensuite placés à $25 \pm 2^\circ\text{C}$, sous agitation, pendant 48 heures. Un témoin de la croissance

bactérienne, pour lequel 15 μL de l'inoculum standardisé ont été déposés dans du milieu en présence du seul solvant ayant servi à la solubilisation (figure 30).

Après 48 heures d'incubation, la CMI de l'huile essentielle est déduite à partir du premier tube de la gamme dépourvue de croissance bactérienne, elle correspond à la plus faible concentration en huile essentielle capable d'inhiber la croissance bactérienne. La lecture peut être visuelle ou spectrophotométrique, car le degré d'inhibition est en rapport avec la turbidité du milieu.



Préparation du milieu de culture

Tubes à différentes gammes de concentration en HEensemencés par la bactérie

Figure 30 : Méthode de détermination de la CMI en milieu liquide.

4.1.3.1. Détermination de la concentration minimale bactéricide (CMB) en milieu solide

La Concentration minimale bactéricide (CMB) correspond à la plus faible concentration en huile essentielle capable de tuer plus de 99,9 % de l'inoculum bactérien initial (soit moins de 0,01 % de survivants). Elle définit l'effet bactéricide d'une huile essentielle.

La même gamme de concentration, réalisée par la technique de macrodilution en milieu liquide, est utilisée pour déterminer la CMI et la CMB de l'huile essentielle à tester (figure 31).

Des prélèvements sont effectués dans le tube témoin et dans chacun des tubes dépourvus de culot bactérien puis déposés en strie sur gélose MHA. Les boîtes ensemencées sont incubées 48 heures à 25 ± 2 °C.

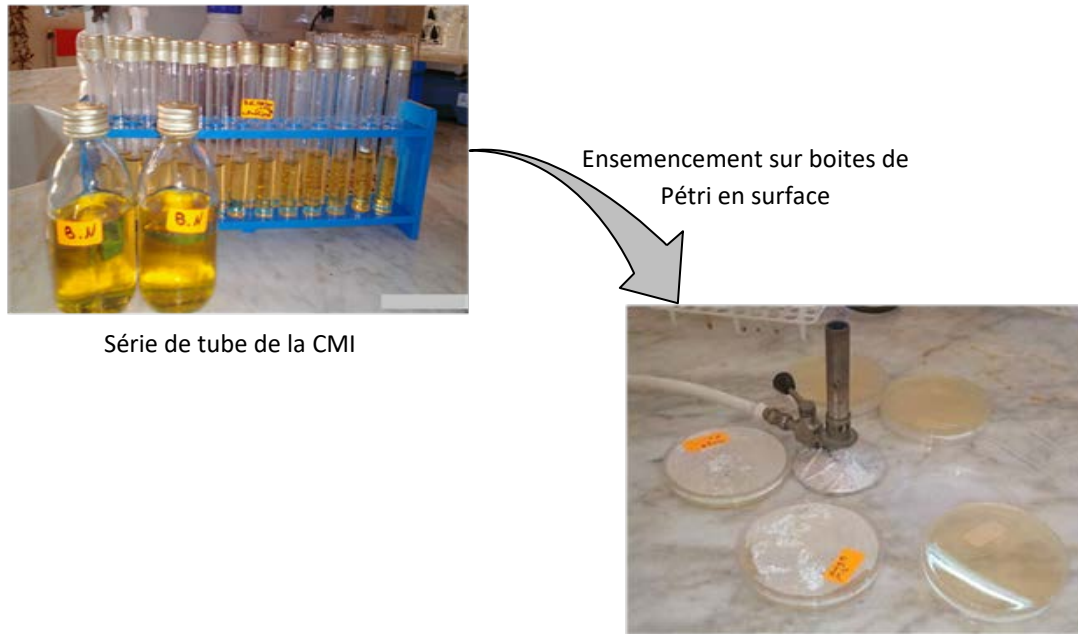


Figure 31 : Méthode de détermination de la CMB en milieu solide.

La concentration minimale bactéricide (CMB) testée a été déterminée comme étant la plus faible concentration à laquelle aucune croissance visible du micro-organisme n'avait eu lieu, elle est déduite à partir de la première boîte dépourvue de bactérie. Le témoin comporte la bactérie testée dans un milieu de gélose MHA avec le solvant utilisé.

4.2. Activité antifongique

L'activité antifongique des huiles essentielles a été évaluée *in vitro* par la méthode de dilution en milieu solide pour déterminer les taux d'inhibition. Différentes concentrations de 25, 50 et 100 μL en huile essentielle, émulsionnée dans le Tween 80 (5ml) sont préparées et incorporées, au milieu de culture à base de l'Agar de dextrose de pomme de terre (PDA). Puis, le mélange est coulé dans des boîtes de Pétri pour être ensemencés par le dépôt de fragments de 5 mm de diamètre au centre de la boîte de Pétri, prélevés à partir d'un tapis mycélien issu de culture de 7 jours. Enfin, l'incubation se fait à l'obscurité à 25 ± 2 °C. La croissance mycélienne des colonies est estimée après 7 jours d'incubation par la moyenne de deux diamètres perpendiculaires. Le témoin est réalisé dans les mêmes conditions, sans addition d'huile essentielle. Le taux

d'inhibition de la croissance mycélienne est calculé selon la formule de Leroux et Credet,(1978) :

$$Ti (\%) = \frac{D_0 - D_C}{D_0} \times 100$$

avec :

Ti : taux d'inhibition en % ;

D₀ : croissance diamétrale du témoin ;

D_C : croissance diamétrale du champignon traité par les HE.

5. Analyse statistique

L'analyse de la variance (ANOVA) a été utilisée pour déterminer les différences significatives entre les échantillons (logiciel Excel version 2016).

La différence entre les moyennes est considérée significative à un niveau $p < 0.05$.

Chapitre 02 :
***Résultats* et discussion**

Chapitre 02 : Résultats et discussion

1. Résultats de l'étude des huiles essentielles

1.1. Rendement des huiles essentielles

L'extraction des huiles essentielles à partir des feuilles sèches des quatre espèces, a permis d'obtenir différents rendements illustrés dans le tableau 03, la comparaison du rendement entre les différentes espèces, nous a montré clairement qu'il y a une différence très significative ($p < 0,05$) (Tableau 04).

Tableau 3 : Rendement des plantes utilisées en huiles essentielles.

Espèce	<i>J. phoenicea</i>	<i>J. oxycèdrus</i>	<i>C. sempervirens</i>	<i>T. articulata</i>
Rendement en HE (%)	0,76	0,40	0,91	0,60

Tableau 4 : Résultats de l'analyse de la variance pour le rendement des plantes utilisées.

Source des variations	Somme des carrés	Degré de liberté	Moyenne des carrés	F	Probabilité	Valeur critique pour F
Entre Groupes	0,572475	3	0,190825	1347	1,97302E-15	3,490294819
A l'intérieur des groupes	0,0017	12	0,00014167			
Total	0,574175	15				

Au vu des résultats consignés dans le tableau 03, on constate que les huiles essentielles sont obtenues avec des rendements très faibles ce qui en fait des substances précieuses et rares, et précieuses. On note aussi que *Cupressus sempervirens* affiche le meilleur rendement avec une moyenne de 0,91 %, suivi par *J. phoenicea* avec 0,76 %, ce qui concorde avec les résultats de 1% obtenus par Tapondjou, *et al.*, (2005) ainsi que 0,7 % obtenus par Barrero, *et al.*, (2006) respectivement pour *Cupressus sempervirens* et *Juniperus phoenicea*. Cependant, pour Benali Toumi, *et al.*, (2011), avec le même procédé d'extraction des feuilles de *Tetraclinis articulata*, leur résultat est supérieur avec respectivement 0,76% et 0,6%. En ce qui concerne *Juniperus oxycèdrus*, des

rendements légèrement inférieurs à nos résultats soit 0,3 % ont été obtenus par plusieurs auteurs (Ghanmi, et al., 2010; Alberto, et al., 2003).

Dans d'autres études, les auteurs expliquent que le rendement en huile essentielle d'une plante est très fluctuant, sur lequel intervient un grand nombre de paramètres, d'origine intrinsèque (génétique, stade phénologique), d'origine extrinsèque (sol, climat, latitude) ou d'ordre technologique, c'est-à-dire lié aux techniques d'exploitation du matériel végétal (Marouf, et al., 2015). Bekhechi, *et al.*, (2008) rapportent que la quantité d'huile essentielle produite par une plante peut également varier en fonction des stress que cette dernière a subi.

1.2. Analyses des propriétés physico-organoleptiques

Dans cette partie de travail, nous visons la caractérisation des propriétés physico-organoleptiques. De ce fait, après isolement, les huiles essentielles ont subi une batterie de tests. Le tableau 04 montre les rapprochements et les différences dans les valeurs physico-chimiques et les caractéristiques organoleptiques entre les différentes espèces.

Tableau 5 : Caractéristiques physiques et organoleptiques des huiles essentielles.

<i>Juniperus oxycedrus</i>
Caractéristiques physiques
Densité à 20°C : 0,918 ~ 0,963
Indice de réfraction à 20°C : 1,510 ~ 1,515
Pouvoir rotatoire à 20°C : - 35° à - 10°
Caractéristiques organoleptiques
Aspect : liquide mobile
Couleur : jaune pâle
Odeur : cédrée, boisée
<i>Juniperus phoenicea</i>
Caractéristiques physiques
Densité à 20°C : 0,851 ~ 0,874
Indice de réfraction à 20°C : 1,472 ~ 1,485
Pouvoir rotatoire à 20 °C : - 15° à + 0°
Caractéristiques organoleptiques
Aspect : liquide mobile
Couleur : incolore à jaune clair
Odeur : balsamique, douce.
<i>Cupressus sempervirens</i>
Caractéristiques physiques
Densité à 20°C : 0,860 ~ 0,886
Indice de réfraction à 20°C : 1,468 ~ 1,478
Pouvoir rotatoire à 20 °C : 0° à +30°
Caractéristiques organoleptiques
Aspect : liquide
Couleur : jaune pâle à jaune orangé
Odeur : fraîche, résineuse, agreste et boisée.
<i>Tetraclinis articulata</i>
Caractéristiques physiques
Densité à 20°C : 0,933 ~ 0,947
Indice de réfraction à 20°C : 1,455 ~ 1,460
Pouvoir rotatoire à 20 °C : - 15° à + 2°
Caractéristiques organoleptiques
Aspect : liquide limpide et mobile
Couleur : incolore à jaune pâle
Odeur : fraîche, intense et résineuse.

D'après les résultats consignés dans le tableau 04, nous pouvons souligner que les huiles extraites des quatre espèces végétales, sont d'aspect liquide à température ambiante, d'odeur aromatique assez marquée quand elles sont fraîches. La plupart ont une couleur jaune clair qui devient foncée au cours de leur vieillissement (oxydation). Leur densité est plus souvent inférieure à 1 (densité de l'eau) et varie en fonction de l'espèce. Quelques huiles essentielles ont même une densité très proche à l'eau, par exemple celle de Thuya (*Tetraclinis articulata*) avec 0,947.

Les différentes huiles possèdent un indice de réfraction avec des valeurs très proches les unes des autres et cela, quelle que soit l'espèce étudiée. Ces valeurs varient de 1.45 à 1.51 et sont toutes supérieures à l'indice de réfraction de l'eau qui est de 1.333 à 20°C. Par ailleurs ce même tableau montre que les huiles essentielles se caractérisent par un pouvoir rotatoire, dextrogyre ou lévogyre, le plus souvent optiquement actives. Elles sont volatiles et entraînaient par la vapeur d'eau, elles lui communiquent leur odeur. Elles sont solubles dans l'alcool, et la plupart de solvants organiques, mais très peu ou pas solubles dans l'eau.

Les caractères organoleptiques restent très sensibles à l'oxydation que subissent les huiles essentielles en vieillissant, provoquant ainsi des changements de leur aspect et couleur.

La comparaison des résultats de nos huiles avec celles rapportées par la bibliographie, montre qu'elles se trouvent dans les fourchettes de référence établies par les référentiels classiques (Pharmacopée Européenne, ISO, AFNOR)

Selon Fernandez, *et al.*, (2012), ces paramètres physiques organoleptiques sont influencés par l'origine intrinsèque (génétique) de l'espèce ainsi que par les changements des conditions de croissance des différents environnements (conditions édaphiques et climatiques). Ils rapportent aussi que, la détermination de ces grandeurs physiques est une étape nécessaire dans l'évaluation de la qualité des huiles essentielles, mais demeure insuffisante pour caractériser l'huile essentielle surtout avec la non-détermination des autres paramètres physico-chimiques (indice d'esters, indice de peroxyde, indice d'acide, résidu d'évaporation, point de solidification ...etc.). Il a été donc primordial pour nous de déterminer le profil chromatographique de nos essences aromatiques.

1.3. Analyse de la composition chimique des huiles essentielles

L'analyse de la composition chimique des huiles essentielles de différentes espèces, nous a permis d'identifier les composés rassemblés dans le tableau 05. D'après les résultats de la composition chimique des huiles essentielles des quatre espèces étudiées, nous avons relevé quelques observations qui peuvent être résumées comme suit : Il y a d'abord les différences qui existent dans la composition des huiles. Cette différence touche à la fois et à la qualité et à la quantité des constituants chimiques des huiles essentielles comme le confirme la composante des constituants majoritaires.

L'observation de la composition, de l'huile essentielle de *Juniperus phoenicea*, démontre que cette espèce se caractérise par sa forte teneur en alpha pinène (38,26 %), le second composé important correspond au germacrène B (7,11 %) figure 33. De ces analyses, il ressort que, les constituants majoritaires de l'huile essentielle de *J. oxycedrus* sont l'alpha pinène (34,15 %), le germacrène D (25,22 %) et la γ -cadinène (4,76%), pour les produits de moindre teneur, on cite le delta-3-carène (4,12%) figure 32. Par ailleurs, l'analyse de l'huile essentielle de *Cupressus sempervirens* montre que cette essence est surtout riche en monoterpènes, l'alpha pinène (43,07 %), est le constituant majoritaire (il présente un large pic dans le chromatogramme de l'espèce, figure 34).

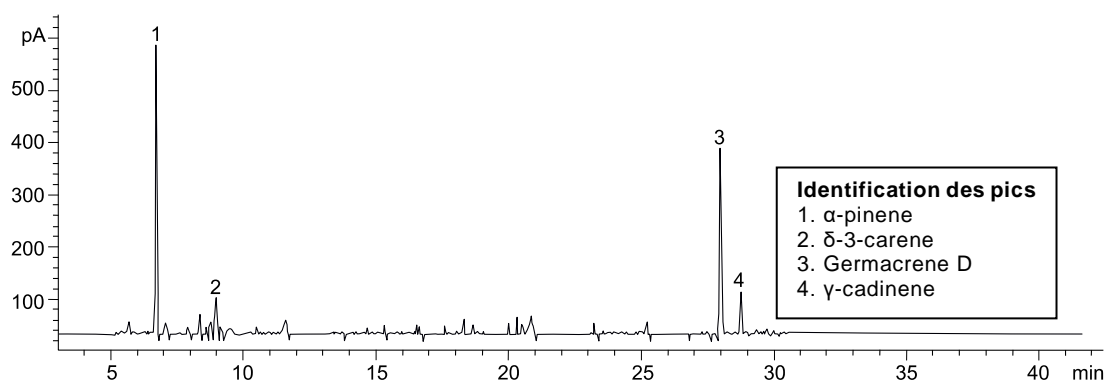


Figure 32 : Profils chromatographiques de l'huile essentielle de *Juniperus oxycedrus*.

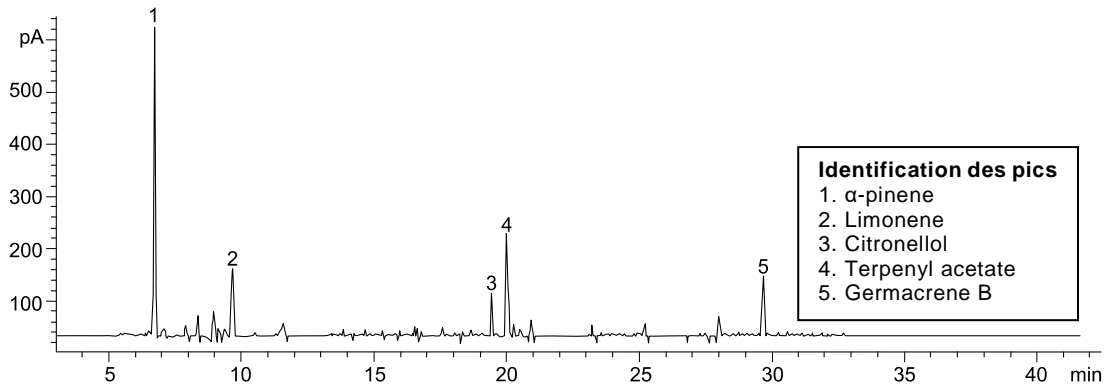


Figure 33 : Profils chromatographiques de l'huile essentielle de *Juniperus phoenicea*.

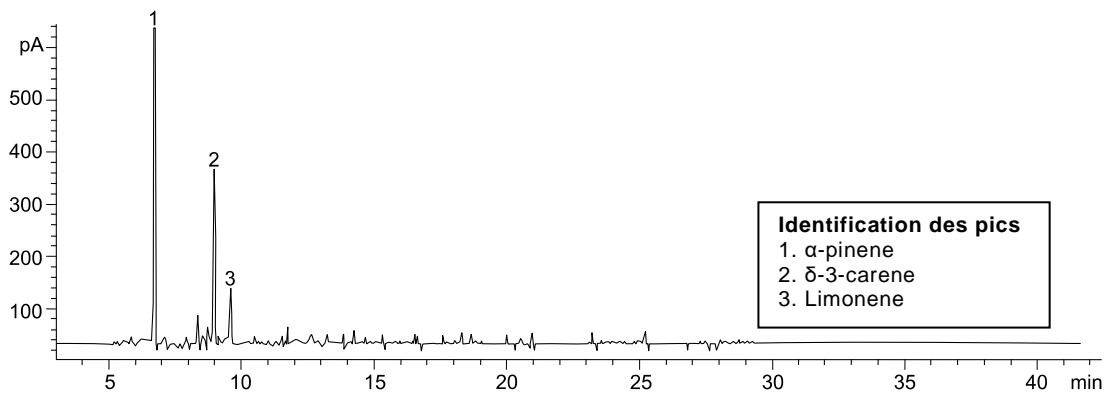


Figure 34 : Profils chromatographiques de l'huile essentielle de *Cupressus sempervirens*.

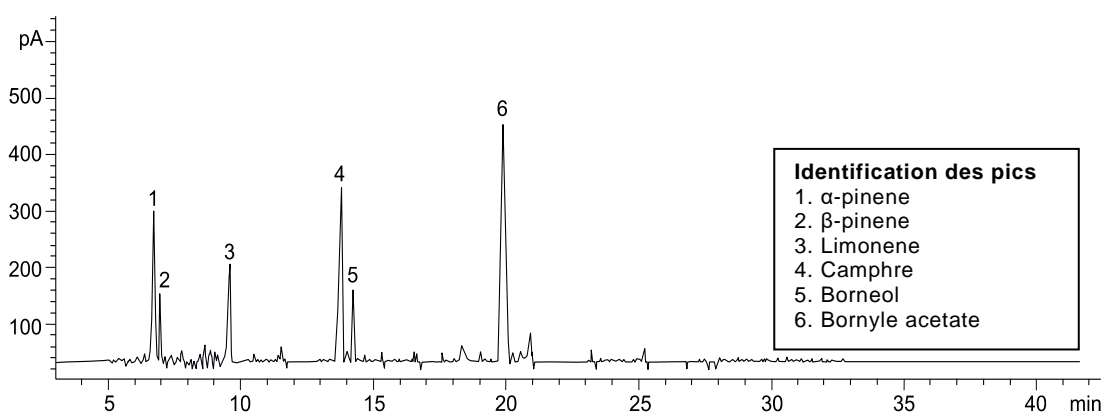


Figure 35 : Profils chromatographiques de l'huile essentielle de *Tetraclinis articulata*.

L'analyse chromatographique a mis en exergue, que l'alpha pinène comme composé majoritaire est commun pour les huiles essentielles de *Juniperus phoenicea*, *J. oxycedrus* et *Cupressus sempervirens*. D'autres composés, par contre, sont spécifiques à l'huile essentielle de *Tetraclinis articulata*, dont les composés majoritaires diffèrent légèrement des profils des autres essences. En effet, elle se caractérise par des teneurs élevées en esters dont l'acétate de bornyle (28,42 %) suivi par les monoterpènes (α -pinène 16,45%, limonène 12,57%) figure 35.

Ces résultats expliquent bien les fluctuations dans les valeurs des propriétés physico-chimiques, révèlent la présence d'un polymorphisme chimique constant, et la spécificité exprimée par chaque espèce végétale.

Tableau 6 : Composition chimique des HE des feuilles sèches de différentes espèces étudiées.

No.	Component	IK	<i>J. oxy</i>	<i>J. pho</i>	<i>C. sem</i>	<i>T. art</i>
01	Tricyclène	926	0.12	0.85	0.35	-
02	α -pinène	931	34.15	38.26	43.07	16.45
03	Camphène	949	0.85	0.27	0.45	4.87
04	α -fenchène	951	-	-	-	3.86
05	Sabinène	976	0.12	1.37	1.28	0.38
06	β -pinène	981	1.3	4.67	1.37	8.22
07	β -myrcène	991	-	1.87	-	2.28
08	Myrcène	997	1.86	2.14	1.88	0.13
09	α -phellandrène	1005	0.12	3.42	0.6	0.86
10	δ -3-carène	1011	4.12	2.25	18.04	0.1
11	α -terpinène	1018	0.27	0.52	1.45	0.28
12	p-cymène	1026	0.1	0.39	0.21	-
13	Limonène	1031	0.51	8	6.71	12.57
14	β -phellandrène	1036	0.19	1.05	-	-
15	γ -terpinène	1059	-	0.35	0.53	-
16	Terpinolène	1085	0.56	6.1	4.28	2.09
17	Linalol	1103	-	4.12	2.51	0.21
18	Myrcénol	1119	-	0.2	-	1.23
19	Trans-pinocarvéol	1140	-	-	-	1.35

20	Camphre	1143	0.21	0.47	-	18.6
21	Trans-pinocarvéol	1161	-	0.52	-	0.56
22	Bornéol	1165	-	-	1.32	8.41
23	Terpinèn-4-ol	1172	0.08	0.8	1.53	2.52
24	α -terpinéol	1189	0.04	1.61	0.51	3.11
25	Trans-carvéol	1217	-	0.31	-	0.28
26	Citronello	1228	-	6.8	-	-
27	Piperitone	1250	0.17	0.56	-	-
28	Acétate de bornyle	1285	0.12	-	1.52	28.42
29	Acétate d' α -terpényle	1350	-	9.4	3.1	-
30	α -copaène	1376	-	-	-	1.02
31	β -bourbonène	1386	0.11	1.17	-	3.68
32	β -elemène	1391	2.31	1.55	0.2	-
33	Junipène	1402	0.8	3.22	-	-
34	γ -elemène	1425	0.15	0.25	-	0.75
35	α -humulène	1455	2.38	-	0.3	0.31
36	Germacrène D	1478	25.22	2.84	2.46	0.78
37	γ -muurolène	1497	3.21	-	0.19	-
38	δ -cadinène	1524	2.85	3.77	0.45	-
39	γ -cadinène	1539	4.76	-	-	-
40	Germacrène B	1556	2.12	7.11	-	0.32
41	Oxyde de caryophyllène	1581	-	0.41	0.11	2.15
42	Cedrol	1607	-	-	4.42	-
Total			95.21	97.67	94.63	92.59

J. oxy: *Juniperus oxycedrus* - *J. pho* : *Juniperus phoenicea* - *C. sem* : *Cupressus sempervirens* - *T. art* : *Tetraclinis articulata*;

IK= indice de rétention de Kováts ; - : absence (none)

La figure 36 regroupe les structures de certains composés chimiques majoritaires identifiés par CG/SM, comme l'alfa pinène, le limonène, germacrène, et aussi l'acétate de bornyle dans les huiles essentielles de différentes espèces.

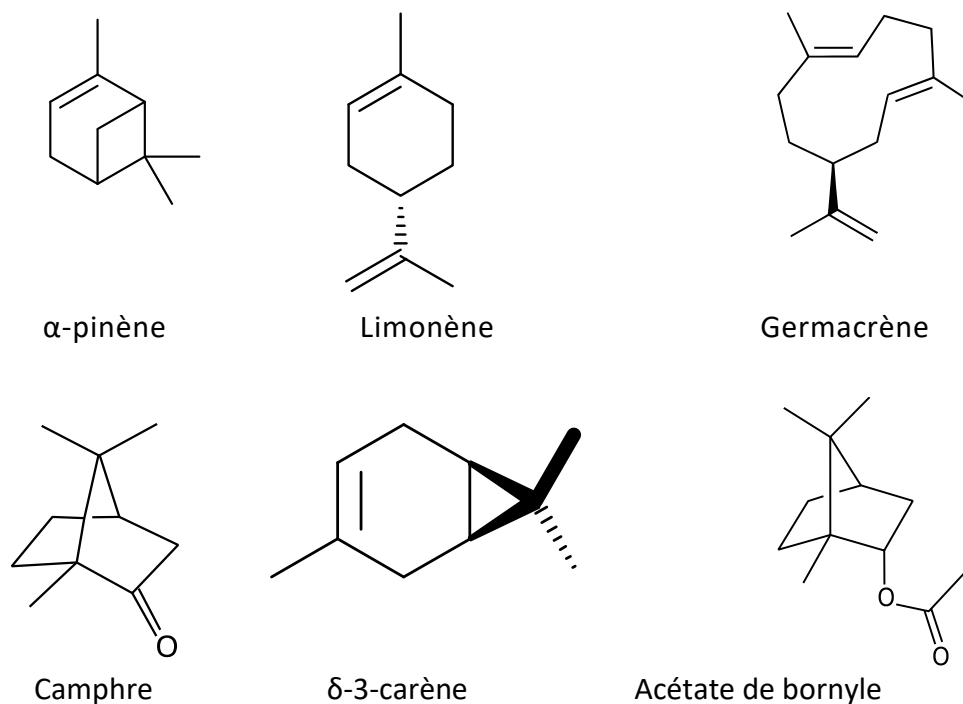


Figure 36 : Structures chimiques des composés majoritaires identifiés dans les HE de différentes espèces

À partir de ces résultats, une tendance semble se dessiner, à savoir que, c'est que les monoterpènes représentent la famille biochimique la plus répandue dans les essences extraites de *Juniperus phoenicea*, *Juniperus oxycedrus* et *Cupressus sempervirens* avec "l'alpha-pinène" comme constituant majoritaire, suivi à de moindres teneurs par les sesquiterpènes, les esters et la cétone.

Ces résultats concordent avec ceux de Milos, *et al.*, (2000) et de Tapondjou, *et al.*, (2005) qui confirment que les essences aromatiques des trois espèces présentent un taux élevé en monoterpènes (alpha-pinène) et confirment aussi la présence des sesquiterpènes en quantité moindre mais appréciable.

Par ailleurs, des études comparatives réalisées sur les trois espèces de différentes provenances par Mansouri, *et al.*, (2010) au Maroc, par Velasco-Negueruela, *et al.*, (2003) en Espagne et Bouzouita, *et al.*, (2008) en Tunisie, ont révélés la présence des mêmes composés identifiés, avec cependant, une hétérogénéité des composés majoritaires avec la prédominance de l'alpha-pinène (de 52,13 à 59,8%).

Les travaux menés par Alberto, *et al.*, (2003) ont montré que le procédé d'extraction peut modifier la composition et le rendement en huile essentielle, certains groupes

chimiques sont éliminés et d'autres sont concentrés. Ainsi, selon ces auteurs, les feuilles du genévrier (*Juniperus phoenicea*), fournissent par hydrodistillation une huile essentielle renfermant 33 à 49 % d'alpha pinène, mais aussi 5 à 9 % de terpinèn-4-ol, substance qui est absente dans le produit d'extraction par le benzène.

En ce qui concerne *Tetraclinis articulata*, des différences de composition ont été établies entre l'huile extraite de cette espèce, et celles des autres, en effet, les constituants majeurs identifiés dans l'huile de *Tetraclinis articulata*, diffèrent dans les autres huiles, en particulier, pour les monoterpènes (α -pinène 16,45%, limonène 12,57%) et les esters (acétate de bornyle 28,42%) qui sont en quantité relativement identique. Par ailleurs, d'autres auteurs ont ainsi révélé cette variabilité de la composition chimique avec prédominance de l'acétate de bornyle (30,6 %), (Bourkhiss, et al., 2007) et du camphre (31,60%) (Benali Toumi, et al., 2011).

Plusieurs études ont montré que la provenance de la matière végétale a une influence marquée sur la qualité et le rendement en huiles essentielles. En effet, des facteurs tels que les conditions de croissance (comme la lumière, la température, l'exposition aux vents, la disponibilité de l'eau et des éléments nutritifs), le stade de développement, la partie de la plante récoltée, la période de la journée où la plante est récoltée ainsi que le taux d'humidité des échantillons de plantes séchées interviennent dans la variabilité qualitative et quantitative des huiles essentielles extraites (Burt, 2004).

Fernandez et Chemat, (2012) mentionnent que la nature du sol (sols calcaires, argileux ...) a également une influence sur la qualité de l'huile essentielle et ils rapportent aussi que des plantes botaniquement identiques peuvent fournir des huiles essentielles de compositions plus ou moins différentes, on parle alors de chémotype qui est une référence précise qui indique le composant biochimique majoritaire ou caractéristique, présent dans l'huile essentielle.

2. Activité antibactérienne

Les huiles essentielles sont des concentrés de centaines de composés différents. Leurs propriétés étant étroitement liées à leur composition chimique, l'intérêt de cette partie de thèse est de connaître la liaison entre les activités biologiques et la composition chimique.

2.1. Criblage de l'activité antibactérienne (Aromatogramme)

La première phase de ce travail a consisté à évaluer l'activité antibactérienne de l'huile essentielle de chaque espèce sur la souche testée. Cette étape préliminaire est indispensable, dans la mesure où l'activité d'une huile essentielle est directement liée à sa composition chimique, qui peut varier d'un échantillon à l'autre et évoluer au cours du temps.

Pour ces mêmes raisons, des analyses chimiques, ont été entreprises en vue d'établir le lien entre la composition chimique, et l'activité antibactérienne des huiles essentielles utilisées dans cette étude.

Les résultats de l'activité antibactérienne, sont présentés dans la figure 37, les barres d'erreurs, représentent les écarts types à la moyenne pour chaque test.

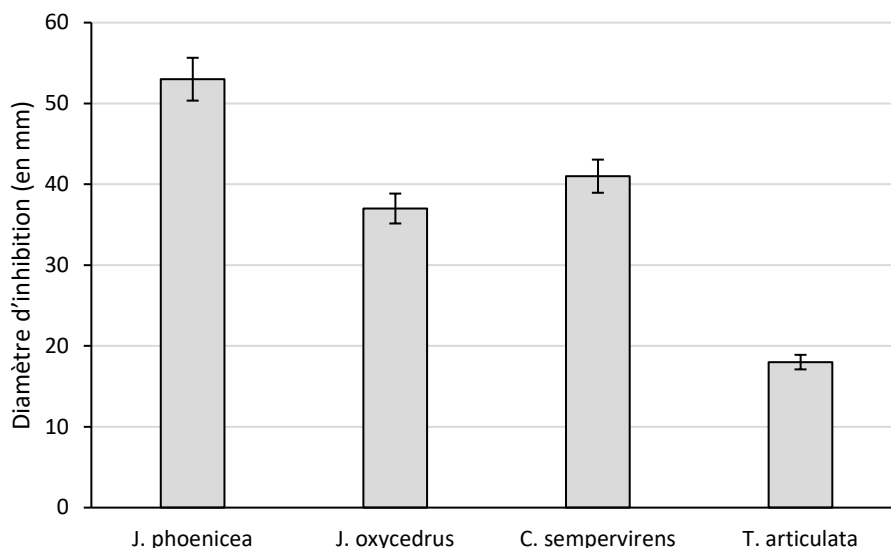


Figure 37 : Activité antibactérienne des HE évaluée par la méthode de diffusion par disque.

L'analyse des données statistiques montre, une différence significative est enregistrée entre les valeurs de l'activité antibactérienne, générée par les huiles essentielles des différentes espèces sur la souche bactérienne testée. (Annexe 02).

Tableau 7 : Résultats de l'analyse de la variance pour test de l'activité antibactérienne générée par les HES des différentes espèces.

Source des variations	Somme des carrés	Degré de liberté	Moyenne des carrés	F	Probabilité	Valeur critique pour F
Entre Groupes	2556,20188	3	852,067292	637,755029	1,7149E-13	3,49029482
A l'intérieur des groupes	16,0325	12	1,33604167			
Total	2572,23438	15				

Les figures ci-dessous montrent les zones d'inhibition observées pour chaque huile essentielle.

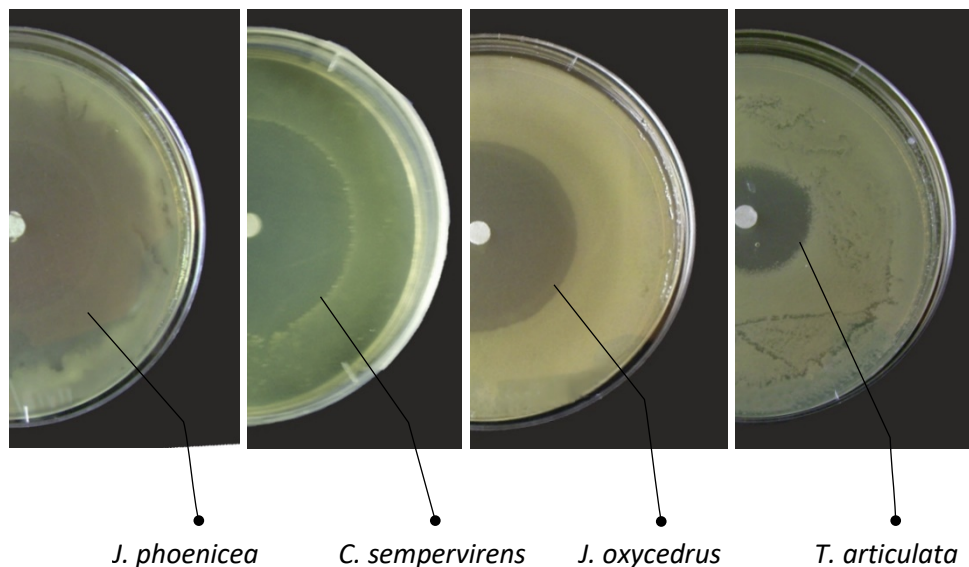


Figure 38 : Activités antibactériennes des HE des différentes espèces.

À la lecture des résultats obtenus lors de ce test antibactérien par aromagramme, il apparaît clairement que toutes les huiles essentielles exercent une activité antibactérienne. Cette activité est, par ailleurs, variable d'une huile essentielle à l'autre. La souche *P. savastanoi pv savastanoi* s'est avérée plus sensible à l'action inhibitrice de l'huile essentielle de *Juniperus phoenicea* avec un diamètres d'inhibition moyen de

53 mm, suivi par huile essentielle de *Cupressus sempervirens* et *Juniperus oxycedrus* avec des diamètres d'inhibition respectivement égaux à 41 mm et 37 mm et qui sont très nettement inférieurs à ceux produits par *Juniperus phoenicea*. Alors que pour *Tetraclinis articulata* l'activité antibactérienne est modérée avec un diamètre d'inhibition, généré de 18 mm pour la même concentration utilisée (20 µl).

D'après Rossi, et al., (2007) , les huiles essentielles sont considérées comme actives si elles produisent des diamètres d'inhibition supérieurs ou égaux à 15 mm. Avec des diamètres respectifs de 18 mm, 37 mm, 41 mm et de 53 mm, les huiles des quatre espèces démontrent une haute activité. Sur la base de cette activité, ces quatre huiles essentielles ont été sélectionnées en vue de caractériser leur mode d'action sur la souche testée.

2.1.1. Détermination des CMI et CMB

Le test qualitatif ayant donné des résultats positifs, l'étude s'est poursuivie par un deuxième test plus spécifique permettant d'évaluer quantitativement la concentration minimale inhibitrice (CMI) et la concentration minimale bactéricide (CMB) pour chaque huile essentielle. Ces tests ont été réalisés par la technique de microdilution en milieu liquide.

Les premiers résultats de ces tests ont montré que les huiles essentielles sont très actives et manifestent une activité antibactérienne en inhibant la croissance *in vitro* des germes bactériens selon une relation dose-réponse. Cela nous a permis de déterminer les différents paramètres antibactériens à savoir la concentration minimale inhibitrice (CMI), la concentration minimale bactéricide (CMB) et le rapport CMB/CMI.

Les valeurs des CMI, CMB et le rapport CMB/CMI sont reportées dans le tableau suivant :

Tableau 8 : Tests de détermination de la CMI et de la CMB des huiles essentielles.

HE	CMI (mg/mL)	CMB (mg/mL)	CMB/CMI	Pouvoir
<i>J. phoenicea</i>	1,25	1,25	1	Bactéricide
<i>C. sempervirens</i>	10	10	1	Bactéricide
<i>J. oxycedrus</i>	10	10	1	Bactéricide
<i>T. articulata</i>	40	40	1	Bactéricide

Les figures suivantes (39) regroupent les CMI en huile essentielle correspondant à chaque espèce testée. Sur l'ensemble des dilutions effectuées (8 pour chaque huile), ne sont présentés que les tubes où les CMI sont impliquées.

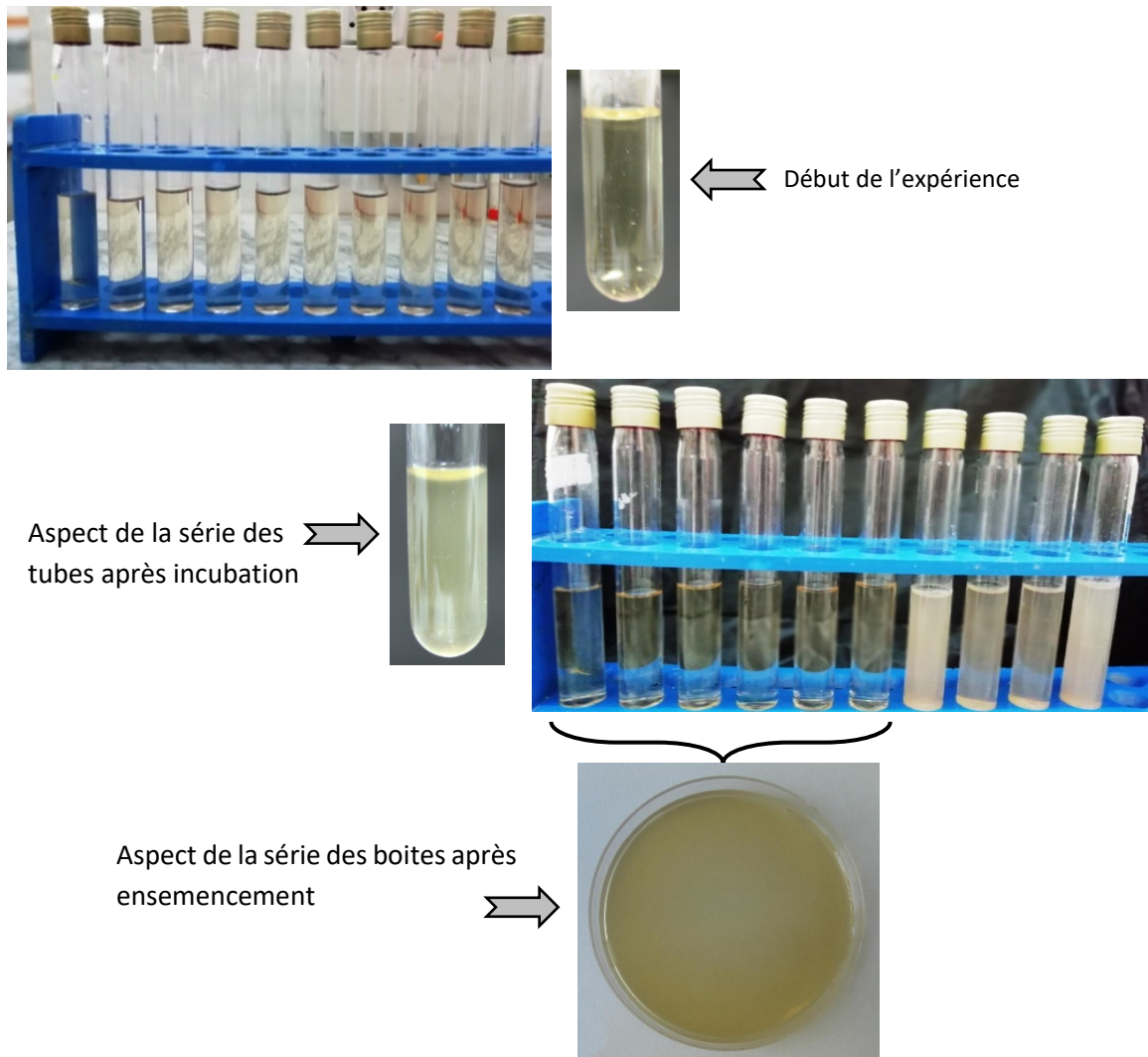


Figure 39 : Tests de détermination de la CMI, CMB et la nature de l'activité antibactérienne des huiles essentielles.

À l'issue de ce test, nous remarquons que les résultats de CMI des huiles essentielles sont en accord avec les résultats obtenus dans le test préliminaire par la méthode de l'aromatogramme, autrement dit les plus faibles valeurs des paramètres antibactériens ont été obtenues avec l'essence de *Juniperus phoenicea* avec une concentration minimale inhibitrice (CMI = 1,25 mg/mL), tandis que les fortes valeurs de CMI ont été obtenues avec l'huile essentielle de *Tetraclinis articulata* (CMI = 40 mg/mL.).

ces deux (2) valeurs, nous avons obtenus des valeurs intermédiaires avec les essences de *Cupressus sempervirens* et *Juniperus oxycedrus* qui ont montré une activité antibactérienne similaire et modérée (CMI = 10 mg/mL).

Il est à noter que l'efficacité d'une huile essentielle est inversement proportionnelle à la valeur de sa concentration minimale inhibitrice (CMI) vis-à-vis d'une souche donnée. Ainsi les résultats ont révélé que parmi les quatre huiles étudiées, l'huile essentielle de *Juniperus phoenicea* est celle qui possède le plus grand pouvoir antibactérien, elle garde sa position de leader comme l'huile la plus active, cela n'est pas étonnant, étant donné que des résultats similaires aux notre ont été rapportés par plusieurs auteurs (Barrero, et al., 2006).

Le manque d'études comparatives de CMI et de CMB enregistrées par les autres chercheurs avec les valeurs de CMI enregistrée par nos essences testées est due à l'absence de méthodes standards pour ces études. Comme le mentionne Burt (2004) et (Abi ayad, 2009), l'absence d'une standardisation dans la prise du volume d'inoculum dans la composition et le volume du milieu, dans le pH, dans la Température, influe considérablement sur les résultats obtenus et empêche toute comparaison rigoureuse.

D'une façon générale, toutes les huiles essentielles testées ont présentés un pouvoir antibactérien sur la souche étudiée. Quoique cet effet balance sur une échelle de sensibilité variante et dépendante de l'origine de l'huile. En effet, une analyse comparative de nos valeurs de la concentration minimale inhibitrice (CMI) à celles obtenues par Ghouti, *et al.*, (2018) avec des huiles essentielles de nombreuses essences ligneuses, montre que des bactéries du genre *Pseudomonas* sont plus sensibles au pouvoir antibactérien de l'huile essentielle de *Juniperus phoenicea*. De même, si on se réfère à l'étude de (Medini, et al., 2013; Aouni, et al., 2013) (Bouyahyaoui, et al., 2017), on remarque que des activités antimicrobiennes ont été décrites pour l'huile essentielle de *Tetraclinis articulata*, dont l'antibactérienne est toutefois moins importante par rapport à d'autres espèces de la même famille de cupressacées.

Nos résultats corroborent avec la plupart des études portant sur l'action des huiles essentielles des mêmes espèces de *Cupressaceae*, qui ont démontré une importante activité antibactérienne contre plusieurs souches testées en dépit de leur diversité morphologique (Gram négatif et Gram positif) (Bouzouita, et al., 2008; Marmonier, 1990; Amara, et al., 2017). Cependant, il n'existe pas de règle générale de sensibilité

par rapport au Gram, car beaucoup de controverses existent dans les divers travaux publiés (Burt, 2004). La plupart des études portant sur l'action des huiles essentielles ont observé qu'elles sont généralement plus actives contre les bactéries à Gram positif (Oussalah, et al., 2007).

Divers paramètres contribuent à expliquer cette différence d'efficacité entre les différentes espèces, elle est due essentiellement à la composition chimique de l'huile, et en particulier aux constituants majoritaires tel que : germacrène, alpha pinène connus pour leur forte activité antibactérienne (Barrero, et al., 2006).

Des composés du genre alpha-pinène, limonène, germacrène, camphre et acétate de bornyle ont tous été cités par de nombreux auteurs comme étant des molécules à grand pouvoir antimicrobien (Burt, 2004). Beaucoup de molécules parmi celles qu'on vient de citer figurent dans la composition chimique de nos huiles essentielles.

2.1.2. Caractérisation du mode d'action des huiles essentielles

Afin de mesurer leur potentiel d'inhibition, on a procédé à des tests de détermination de la concentration minimale bactéricide (CMB) pour les quatre espèces de cupressacées sur *P. savastanoi* pv *savastanoi*, dans des conditions de culture standardisées (de milieu et d'inoculum).

Les résultats (tableau 06) ont montré que dans la majorité des cas, les valeurs des concentrations minimales inhibitrices (CMI) sont identiques aux valeurs des concentrations minimales bactéricides (CMB), en conséquence les rapports CMB/CMI des huiles essentielles des quatre espèces testées dans cette étude sont égaux et égalent à 1 (tableau 06). Selon Marmonier, (1990), lorsque le rapport d'activité CMB/CMI d'une substance antimicrobienne est inférieur ou égal à quatre, cette dernière est considérée comme substance bactéricide et si le rapport CMB/CMI est supérieur à quatre, alors elle est dite bactériostatique. Les huiles essentielles des quatre espèces semblent donc exercer une action bactéricide contre *P. savastanoi* pv *savastanoi*.

Nos observations concordent avec les résultats obtenus par Bouzouita *et al*, (2008) sur l'activité antimicrobienne des huiles essentielles de différentes espèces de cupressacées sur des bactéries à Gram positifs et à Gram négatifs.

Elles concordent aussi avec d'autres travaux sur la sensibilité des bactéries du genre *Pseudomonas* à différentes essences de cupressacées, isolés des feuilles de *Juniperus*

oxycedrus ssp. macrocarpa et *Juniperus oxycedrus ssp. oxycedrus*, qui a déjà été mise en évidence par Wanner, et al., (2010).

Divers paramètres contribuent à expliquer cette différence d'efficacité entre les différentes espèces, la composition chimique des huiles essentielles qui à son tour peut être influencée par de multiples facteurs, intrinsèques et extrinsèques. Il faut rappeler que l'activité d'une substance végétale ainsi que son mode d'action dépend de plusieurs facteurs, dont la nature et la proportion de ses constituants qui entrent dans sa composition (Amara, et al., 2017).

La composition chimique des huiles essentielles, utilisée dans notre étude, est dominée par la présence de molécules mono terpénique. Ces familles phytochimiques dont les composés majoritaires très diversifiés à savoir l'alpha-pinène, le limonène, le germacrène, le camphre et l'acétate de bornyle sont reconnus pour leur pouvoir antibactérien élevé et sont indiqués selon la littérature comme étant responsables d'activité bactériostatique à faible concentration et bactéricide à plus forte concentration (Aouni, et al., 2013).

Cette activité antimicrobienne est difficile à corrélérer à un composé particulier en raison de leur complexité et de leur variabilité, mais il a souvent été rapporté que les composés majoritaires sont souvent responsables de l'activité antibactérienne observée (Inouye, 2003).

Les plantes ont développé plusieurs stratégies pour contrôler les infections bactériennes. La synthèse d'un grand nombre de molécules faiblement actives, plutôt que de puissants antibiotiques, en fait partie. Elle semble d'ailleurs utilisée pour diminuer la pression sélective, qui favorise le développement des résistances. Toutefois, l'activité de ces antibactériens peut être potentialisée lorsqu'ils agissent en synergie avec d'autres molécules (Guinoiseau, 2010).

3. Activité antifongique

3.1. Criblage de l'activité antifongique des HE

La deuxième phase de ce travail a consisté à évaluer l'activité antifongique de l'huile essentielle de chaque espèce par la méthode de dilution en milieu solide pour déterminer les taux d'inhibition des différentes concentrations (25, 50 et 100 μ l) en huile essentielle.

L'observation de la souche fongique traitée par les huiles essentielles, révèle qu'elles exercent des effets dépressifs variables sur la croissance radiale du champignon. Ces effets dépendent de l'espèce utilisée pour l'extraction, et de la concentration d'huile essentielle où l'effet dépressif sur la croissance radiale mycélienne augmente progressivement au fur et à mesure que la concentration de l'huile augmente.

Ainsi, l'application de la première concentration de 25 μ l des différentes essences testées sur les milieux, s'accompagne d'une diminution de la croissance mycélienne par rapport au témoin sans huile essentielle. Signalant que le taux d'inhibition est proportionnel à la concentration d'huile essentielle additionnée au milieu, à la plus forte concentration (100 μ l) l'inhibition de la croissance du mycélium a été très efficace pour les deux espèces *Juniperus phoenicea* et *Juniperus oxycedrus* avec un taux d'inhibition supérieur à 60 %, suivie par *Cupressus sempervirens* avec un taux avoisinant les 51 %. Par contre, *Tetraclinis articulata* a montré l'activité antifongique la plus faible avec 43,3 %, et cette tendance reste valable pour l'ensemble des concentrations utilisées.

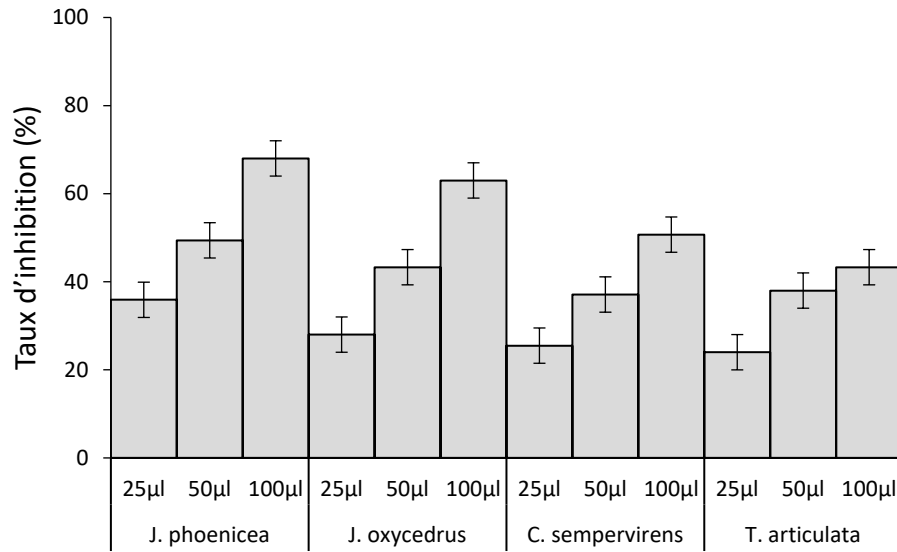


Figure 40 : Activités antifongiques des HE des différentes espèces en fonction de la concentration appliquée

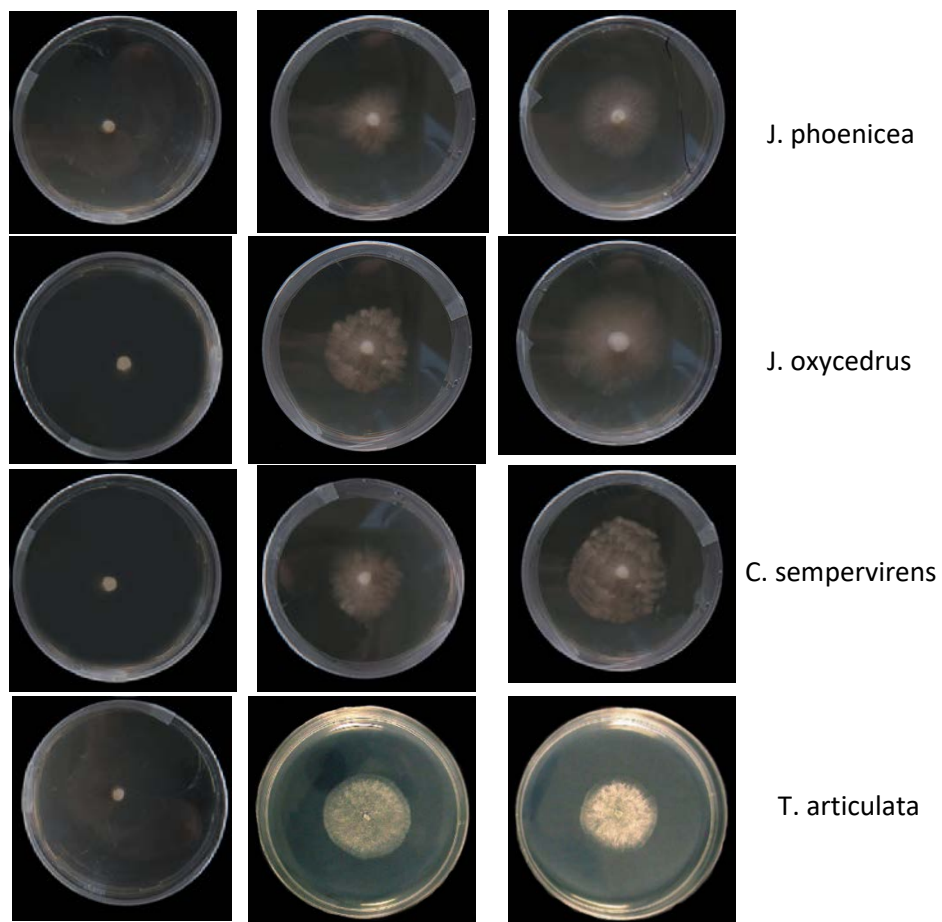


Figure 41 : Photos des zones d'inhibitions des HE sur *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*.

La figure 41, montre que la croissance du *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* a été inhiber par l'ensemble des essences testées (taux d'inhibition compris entre 24% et 68%), ceci est en totale adéquation avec la majorité des travaux antérieurs portant sur l'activité antifongique des cupressacées (Kasmi, et al., 2017).

Nos résultats sont en accord avec ceux de nombreux auteurs dont les travaux sont similaires au notre. En effet, l'activité antifongique de quelque essence de cupressacées contre les fusarioses les plus importantes en termes d'altération des cultures (*F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*, *F. oxysporum* f. sp. *melonis*, *F. oxysporum* f. sp. *lentis*) a fait l'objet de plusieurs études, les travaux menés par (Bouyahyaoui, et al., 2017) et (Guynot, et al., 2005), ont montré que ces essences détruisent une large gamme de champignons.

Beaucoup de travaux ont souligné l'efficacité antifongique des phénols terpéniques et plus particulièrement celle du l'alpha-pinène et le germacrène, (Amara, et al., 2017). Ces deux molécules possèdent un très large spectre d'activité antimicrobien et ils sont naturellement présents dans les essences que nous avons testées.

4. Discussion

Notre objectif principal étant la valorisation des substances végétales extraites de quatre espèces de cupressacées et pour cela, nous nous sommes intéressés à deux aspects de recherche à savoir : l'identification de la composition chimique des huiles essentielles extraites de feuilles ; et l'évaluation des activités biologiques (antibactérienne et antifongique) de ces huiles essentielles sur deux microorganismes phyto pathogènes.

L'analyse des huiles essentielles produites par les quatre espèces étudiées a permis de mettre en évidence, une très grande variabilité chimique, ces essences se caractérisent par la présence des monoterpènes qui représentent la famille biochimique la plus répandue, suivie à de moindres teneurs par les sesquiterpènes, les esters et la cétone.

La comparaison des résultats des deux tests (antibactérienne et antifongique) nous a permis de déduire qu'il existe des différences dans le classement basé sur les valeurs des activités antimicrobiennes entre les espèces étudiées.

L'évaluation de l'activité antibactérienne des huiles essentielles par le test aromatochrome a donné des résultats intéressants. Pour préciser le caractère bactériostatique ou bactéricide des quatre huiles essentielles sélectionnées, des tests de détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) et de la concentration minimale bactéricide (CMB) ont été réalisés. Ainsi, nos résultats ont montré que l'ensemble des essences ont été actives à divers degrés et ont manifesté une activité antibactérienne en inhibant la croissance *in vitro* des germes bactériens selon une relation dose-réponse.

Cela nous a permis de déterminer les différents paramètres antibactériens à savoir la concentration minimale inhibitrice (CMI), la concentration minimale bactéricide (CMB) et le rapport CMB/CMI. À l'issue de l'analyse de ce rapport, nous avons constaté que les huiles essentielles testées dans cette étude sont bactéricides.

En ce qui concerne l'activité antifongique, les résultats des analyses ont montré que l'ensemble des huiles essentielles sont actives vis-à-vis la souche fongique *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*. Cependant, elles n'ont pas manifesté la même efficacité, les plus actives étaient celles de *Juniperus phoenicea* et *Juniperus oxycedrus*. Par

contre les moins efficaces étaient celles du *Cupressus sempervirens* et *Tetraclinis articulata*.

De nombreux chercheurs (Inouye, et al., 2007; Oussalah, et al., 2007) ont montré que les huiles essentielles possèdent un très grand potentiel envers les bactéries et les champignons, mais ce spectre antimicrobien s'étend également vers les virus, les mycoplasmes, les protozoaires, et les insectes.

L'activité antimicrobienne de ces huiles essentielles est due principalement à leur profil chimique, les espèces les plus riches en composés monoterpéniques (α -pinène, limonène, δ -3-carène, β -pinène, terpinolène) sont les mêmes espèces qui ont une efficacité d'inhibition la plus marquée, ce qui suggère que ces effets sont certainement liés à la présence de ces composés. L'activité antimicrobienne mise en évidence dans notre étude pourrait être attribuée à ces composés, non seulement ont été concentré dans nos essences, mais également possèdent selon la littérature une forte activité antimicrobienne (Bakkali, et al., 2008).

D'après Bekhechi et al., (2008), la sensibilité des micro-organismes aux extraits végétaux peut varier en fonction de divers paramètres tels que la composition chimique et la concentration relative de chacun des constituants de l'huile essentielle. De même, Fernandez et Chemat, (2012) ont cité que de nombreuses huiles essentielles et leurs composés majoritaires ont été définis comme antimicrobiens. Cette activité est, par ailleurs, variable d'une huile essentielle à l'autre et d'une souche à l'autre. Elles peuvent être biocides contre certaines souches, biostatiques envers d'autres, ou n'avoir aucun effet. La comparaison de l'efficacité de différentes huiles n'est pas évidente en raison de différents paramètres externes incontrôlables. (Morris, et al., 1979)

Les études sur les mécanismes d'action des huiles essentielles et leur sélectivité sont peu nombreuses et les résultats ne sont encore que des hypothèses (Hammer, et al., 2003; Bakkali, et al., 2008). De plus, la complexité de leur composition chimique laisse supposer que ce mode d'action est assez complexe et difficile à cerner du point de vue moléculaire. Selon ces auteurs, cette sélectivité est le résultat de la composition variée des fractions actives des huiles.

Les raisons de cette variabilité peuvent être principalement dues à la différence des facteurs écologiques et à la croissance des plantes, au génotype, au climat, aux sources géographiques, aux saisons de récolte, à l'organe étudié de la plante, à la procédure de

séchage, au mode d'extraction et à la technique d'évaluation de l'activité biologique. Tout cela influe sur la composition chimique et la concentration relative de chacun des constituants de l'huile essentielle et, par conséquent, sur son activité biologique.

Par ailleurs, les interactions entre les produits chimiques composants de l'huile essentielle sont à considérer. La synergie et l'antagonisme entre les composants influencent les activités, ce qui suggère que les composants mineurs peuvent présenter un effet bioactif significatif (Xavier, et al., 2012).

Ce constat nous permet de conclure que ces différentes propriétés sont liées à la composition chimique des huiles essentielles qui reste assez complexe, aux groupes fonctionnels des composés majoritaires (alcools, phénols, composés terpéniques et cétoniques) et à leurs effets synergiques. Néanmoins, ces effets synergiques peuvent aussi concerner les composés minoritaires et par conséquent, la valeur d'une huile essentielle dépend de l'intégralité de ses constituants.

Conclusion

CONCLUSION

Les cultures sont menacées en permanence par des facteurs altéragènes susceptibles de déprécier la valeur des productions agricoles en quantité et en qualité. Face à ces facteurs altéragènes, les végétaux ont dû lutter pendant des millions d'années pour survivre. En effet elles ont diversifié leurs stratégies de résistance et en l'occurrence elles ont développé des stratégies d'adaptation en synthétisant de nombreuses molécules servant à les défendre contre d'éventuels agresseurs.

Les substances naturelles d'origine végétale, en général, et les huiles essentielles, en particulier, constituent un atout considérable grâce à la découverte progressive de nouvelles applications dans divers domaines, qui aujourd'hui utilise majoritairement des substances issues de la chimie de synthèse, notamment les produits phytopharmaceutiques destinés à la protection des cultures. Il est donc nécessaire d'articuler différentes disciplines pour modifier entièrement l'arsenal phytosanitaire et lui permettre de mieux répondre aux défis de la société, tout en veillant, à la bonne santé des plantes qu'à la qualité de leur environnement.

C'est dans cette optique que nous avons opté pour la valorisation des substances naturelles bioactive, en l'occurrence, les huiles essentielles en vue de leur application dans la protection des cultures qui est un nouveau procédé en pleine mutation et qui suscite de plus en plus l'intérêt des chercheurs. À cet effet et pour bien cibler les molécules responsables des propriétés antimicrobiennes (pouvoirs antifongique et antibactérien), les huiles essentielles de quatre espèces végétales qui sont le Thuya de Berberie (*Tétracelinis articulata*), le Cyprès commun (*Cupressus sempervirens*), le Genévrier rouge (*Juniperus phoenicea*) et le Genévrier cade (*Juniperus oxycèdrus*), ont été soumises à des analyses chromatographiques ainsi qu'à l'étude de leurs propriétés biologiques *in vitro*.

Les résultats de l'extraction des huiles essentielles par hydrodistillation, nous ont permis de constater une nette différence de rendement entre les quatre espèces. En effet, *Cupressus sempervirens* affiche le meilleur rendement avec 0,91 %, par rapport à *Juniperus phoenicea* avec 0,76 %, *Tétracelinis articulata* avec 0,6 % et enfin *Juniperus oxycèdrus* avec 0,4 %.

L'étude de la composition chimique, des espèces ayant fait l'objet de cette étude, confirme bien la spécificité exprimée par chaque espèce botanique, les essences

produites par *Juniperus phoenicea*, *Juniperus oxycedrus* et *Cupressus sempervirens* sont largement dominées par les monoterpènes avec l'alpha-pinène comme constituant majoritaire, à des taux supérieurs à 34% alors que *Tétraclinis articulata* renferme des quantités relativement identiques de monoterpènes (alpha-pinène 16,45%, limonène 12,57%) et d'esters (acétate de bornyle 28,42%). Ces huiles essentielles renferment d'autres composés, mais en quantités moindres. Cette variabilité est le fruit de l'influence d'une multitude de facteurs s'appliquant au végétal tout au long de son développement. Ces facteurs de variation s'étendent jusqu'à l'extraction et le stockage de l'huile essentielle.

Par ailleurs, les tests de l'activité antibactérienne contre *P. savastanoi pv savastanoi*, ont révélé que les quatre huiles essentielles testées présentent une activité antibactérienne *in vitro* significative. Une supériorité est remarquée chez l'huile essentielle extraite de *Juniperus phoenicea* par rapport à celles des autres espèces, où la plus faible valeur de la concentration minimale inhibitrice CMI a été obtenue avec l'huile essentielle de cette espèce (1.25 mg/ml). S'agissant du rapport CMB/CMI des huiles essentielles des quatre espèces testées dans cette étude, les résultats enregistrés indiquent que le rapport d'activité CMB/CMI est égal à 1 pour chaque huile essentielle, cette valeur nous permet d'affirmer que toutes les huiles essentielles testées sont bactéricides.

Les résultats des expérimentations menées sur la souche fongique *F. oxysporum f. sp. lycopersici*, révèlent que l'application des essences testées à différentes concentrations, s'accompagne d'une diminution de la croissance mycélienne. Les plus efficaces des essences restent celles de *Juniperus phoenicea* et *Juniperus oxycedrus*. Par contre les moins efficaces sont celles du *Cupressus sempervirens* et *Tétraclinis articulata*.

Ce grand pouvoir bioactif observé est attribué principalement à leurs teneurs élevées en monoterpènes (alpha-pinène, limonène, germacrène), des molécules susceptibles d'être exploitées et valorisées en vue de leur utilisation dans les stratégies de lutte biologique.

Les différents travaux, réalisés au cours de cette thèse, ont permis de mettre en avant les propriétés antibactériennes et antifongiques des huiles essentielles des quatre espèces à l'égard de deux microorganismes phytopathogènes. Ces conclusions

permettent de suggérer la possibilité d'utiliser les huiles essentielles de ces plantes comme alternative intéressante aux composés de synthèse, dans le domaine de la protection des cultures. Néanmoins, bien que d'origine naturelle, il reste que des études sur leur éventuelle toxicité doivent être entreprises pour éviter de retomber dans les mêmes problèmes engendrés par les pesticides de synthèse.

Enfin, l'ensemble de ces résultats prometteurs nous incite à protéger ces biotopes uniques ou les interrelations et l'équilibre sont précieux et la conservation de ce patrimoine est, en partie, si ce n'est le propre de l'homme, du moins sa responsabilité.

Ce travail préliminaire, ne constitue qu'une première étape dans la valorisation de ces extraits, des études complémentaires avec une plus grande rigueur et minutie à aborder ce domaine seront nécessaires. Comme complément à la présente étude et comme perspectives, les points suivants nous semblent assez pertinents :

- ◆ Pousser les recherches par la résonance magnétique nucléaire du carbone-13 (RMN ^{13}C), une technique pratiquée sur des quantités très faibles de produits et dont le but est d'apporter des informations extrêmement précieuses sur le squelette carboné de la molécule et permettant d'identifier des molécules originales et qui auraient été autrefois probablement ignorées. Les quantités de plantes à récolter sont par conséquent moins importantes, permettant de protéger les habitats et d'augmenter le nombre d'espèces de l'échantillon.
- ◆ Prévoir des études plus approfondies *in vivo* sur les activités antimicrobiennes et insecticides serait nécessaires dans les années à venir pour mieux comprendre le mécanisme d'action des molécules bioactives de ces plantes, leur dose thérapeutique ainsi que leur toxicité. Cela permettrait de développer des produits biologiques efficaces pour protéger les cultures contre les agents pathogènes tout en limitant l'utilisation des pesticides, ce qui s'intègre parfaitement dans une démarche respectueuse et préservative de l'environnement.

Listes des Annexes

Annexe 01 : Composition des milieux de culture utilisés pour l'étude de l'activité antifongique sur *Fusarium oxysporum f.sp.radicis-lycopersici*

Milieux	Principaux constituants		Intérêts
Milieu PDA (Pomme de terre, Dextrose, Agar)	Pomme de terre	200 g	Culture et numération des levures et moisissures
	Dextrose	20 g	
	Agar	15 g	
	Eau distillée	1000 mL	

Annexe 02 : Composition théorique (en g/l d'eau distillée) du milieu Mueller-Hinton selon la formule décrite par organisation mondiale de la santé O.M.S

Milieux	Principaux constituants		Intérêts
Mueller-Hinton	Peptones	3,0	Culture et réalisation de l'antibiogramme
	Hydrolysate de caséine	17,5	
	Agar	15	
	Ca ²⁺	20 - 25 mg/L	
	Mg ²⁺	10 - 12,5 mg/L	
	pH final	7,4 ± 0,2	
	Suppléments : + 5% sang de mouton (pour le milieu MHB) ou 5% sang de cheval (pour le milieu MHF)		
	β-NAD (pour le milieu MHF)	20 mg/L	

Annexe 03 : le Bouillon Nutritif est un milieu nutritif liquide largement utilisé pour la culture des micro-organismes peu exigeants. (Guiraud, 1998)

Milieux	Principaux constituants		Intérêts
Bouillon Nutritif	Extrait de viande	1 g	La culture des micro-organismes peu exigeants
	Peptone	5 g	
	Chlorure de sodium	5 g	
	Eau distillée	1000ml	
	pH	6,8 ± 0,2	

La composition de la gélose nutritive : il s'agit du milieu précédent plus 15g d'agar.

Annexe 04 : Eaux physiologique (Guiraud, 1998).

Composant	Quantité
Eau distillée	1000 mL
Chlorure de sodium	9 g
pH	7.2

Références bibliographiques

1. Abi ayad, F. Z. (2009). Analyse de l'huile essentielle du thuya de Berbérie de la région de Tlemcen et étude de son pouvoir antimicrobien. Mémoire de magister, Université de Tlemcen, Département de Biologie Moléculaire et Cellulaire. p124
2. Agrios, G. (2005). Plant Pathology (éd. 5). (Elsevier, Éd.). p539
3. Aidoud, A. (1989). Contribution à l'étude des écosystèmes pâturés. Thèse de doctorat, Université des sciences et de la technologie Houari-Boumediène, Alger.
4. Ait Youssef, M. (2006). Plantes médicinales de Kabylie. (I. PRESS, Éd.). p348
5. Alberto, A., Andrea, B., et Maria T, R. (2003). Chemical Composition of the Essential Oils of Juniperus from Ripe and Unripe Berries and Leaves and Their Antimicrobial Activity. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 51(10), 3073-3078.
6. Amara, N., et Boughérara, Y. (2017). Activité Antimicrobienne de l'Huile Essentielle du Cyprès Vert (*Cupressus sempervirens* L.). Algerian Journal of Natural Products, 5(2), 455-462.
7. Anchisi, M., Gennari, M., et Matta, A. (1985). Retardation of Fusarium wilt symptoms in tomato by pre- and post-inoculation treatments of the roots and aerial parts of the host in hot water. (Elsevier, Éd.) Physiological Plant Pathology, 26(2), 175-183. doi:10.1016/0048-4059(85)90018-9
8. André, T. (1979). Les moyens de défense des plantes contre les microorganismes parasites. (T. et Francis, Éd.) Bulletin de la Société Botanique de France. Actualités Botaniques, 126(4), 103-110. doi:10.1080/01811789.1979.10826421
9. Aouni, M., Pelen, F., et Soulimani, R. (2013). Étude de l'activité antimicrobienne d'un mélange de 41 huiles essentielles et domaines d'application. Phytothérapie, 11(4), 225-236. doi:10.1007/s10298-013-0790-x
10. Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D., et Idaomar, M. (2008). Biological effects of essential oils – A review. Food and Chemical Toxicology, 46(2), 446-475. doi:10.1016/J.FCT.2007.09.106
11. Barrero, A., Herrador, M., et Arteaga, P. (2006). Chemical Composition of the Essential Oil from the Leaves of *Juniperus phoenicea* L. from North Africa. Journal of Essential Oil Research, 18(2), 168-169.
12. Benali Toumi, F., Benyahia, M., et Hamel, L. (2011). Étude comparative de la composition chimique des huiles essentielles de *Tetraclinis articulata* (Vahl) Masters originaire d'Algérie. Acta Botanica Gallica, 158(1), 93-100.

13. Benhamou, N., Charest, P. M., et Jarvis, R. (1989). Biology and Host-Parasite Relations of *Fusarium Oxysporum* F. Sp. *Radicis-Lycopersici*. (Springer, Éd.) *Vascular Wilt Diseases of Plants*, 28, 95-105. doi:10.1007/978-3-642-73166-2_5
14. Benjama, A. (1994). Étude de la sensibilité variétale de l'olivier au Maroc vis-à-vis de *Pseudomonas syringae* pv *savastanoi*, agent de la tuberculose. (Cirad, Éd.) *Cahiers Agricultures*, 3(6), 405-408.
15. Benkhetou, A., Zedek, M., et Boudaoud, A. (2016). Étude des agroécosystèmes en milieu aride dans la région de Tiaret, Algérie. (U. I. Khaldoun, Éd.) *Écologie-Environnement*(12), 7-11.
16. Berardo, C., Bulai, I., et Venturino, E. (2018). Modeling the Endophytic Fungus *Epicoccum nigrum* Action to Fight the “Olive Knot” Disease Caused by *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* (Psv) Bacteria in *Olea europaea* L. Trees. Dans C. Berardo, I. Bulai, et E. Venturino, *Trends in Biomathematics: Modeling, Optimization and Computational Problems* (pp. 189-207). Cham: Springer International Publishing. doi:10.1007/978-3-319-91092-5_13
17. Blancard, D., Laterrot, H., Marchoux, G., et Candresse, T. (2009). Les maladies de la tomate: Identifier, connaître, maîtriser. (Quae, Éd.). p750
18. Booth, C. (1975). The Present Status of *Fusarium* Taxonomy. *Annual Review of Phytopathology*, 13, 83-93. doi:10.1146/annurev.py.13.090175.000503
19. Bouaichi, A. (2019). Potential effect of antagonistic bacteria in the management of olive knot disease caused by *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*. *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences*, 8(4), 1035. doi:10.15414/jmbfs.2019.8.4.1035-1040
20. Boudy, P. L., et Guinier, P. (1952). Guide du forestier en Afrique du nord (Vol. IV). (L. M. rustique, Éd.) Paris. p505
21. Boufares, K., Hassani, A., et Alem, A. S. (2019). Essential oil composition and antimicrobial activities of some Cupressaceae species from Algeria against two phytopathogenic microorganisms. (Elsevier, Éd.) *Journal of Crop Protection*, 8(2), 223-234.
22. Boulssen, B. Z., et Bouraoui, N. (2016). Etude sur la tuberculose de l'olivier ; isolement et identification présumptifs de quelques isolats bactériens à partir des tumeurs. Mémoire de Master, Université des Frères Mentouri, Microbiologie, Constantine. p50.

23. Bourkhiss, B., Ouhssine, M., et Hnach, M. (2007). Composition chimique et bioactivité de l'huile essentielle des rameaux de *Tetraclinis articulata*. Bulletin de la Société de pharmacie de Bordeaux(146), 75-84.
24. Bourkhiss, M., Hnach, M., Bourkhiss, B., Ouhssine, M., et Chaouch, A. (2011). Composition chimique et propriétés antimicrobiennes de l'huile essentielle extraite des feuilles de *Tetraclinis articulata* (Vahl) du Maroc. Afrique Science: Revue Internationale des Sciences et Technologie, 3(2), 232-242. doi:10.4314/afsci.v3i2.61267
25. Bouyahyaoui, A. (2017). Etude des huiles essentielles des cupressacées de la région de l'Atlas algérien. Thèse de doctorat, Université Abdelhamid Ibn Badis, Département de Biologie, Mostaganem. p67-78.
26. Bouzillé, J.-B. (2014). Connaissance de la biodiversité végétale, démarches et outils technologiques (éd. 1e). Paris, France: Lavoisier. p304.
27. Bouzouita, N., Kachouri, F., et Ben Halima, M. (2008). Composition chimique et activités antioxydante, antimicrobienne et insecticide de l'huile essentielle de *Juniperus phoenicea*. Journal de la Société Chimique de Tunisie(10), 119-125.
28. Bruneton, J. (2016). Pharmacognosie Phytochimie - Plantes médicinales (éd. 5e). Paris, France: Lavoisier. p504.
29. Buronzo, A. (2012). Grand guide des huiles essentielles. (H. Pratique, Éd.) Italie: Hachette Pratique. p256.
30. Burt, S. (2004). Essential oils their antibacterial properties and potential applications in foods. International Journal of Food Microbiology, 94(3), 223-253. doi:https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2004.03.022
31. Catier, O., et Roux, D. (2007). Botanique, Pharmacognosie, Phytothérapie. Paris: Les Editions Porphyre. p144.
32. Charrié, J.-C., Chastel, B., Cieur, C., et Combe, P. (2017). Plantes médicinales Phytothérapie clinique intégrative et médecine endobiogénique. Paris, France: Lavoisier. p704.
33. Croteau, R., Kutchan, T. M., et Lewis, N. (2000). Biochemistry and molecular biology of plants. American Society of Plant Physiologists, 1250-1318.
34. Daniel, R., Martine, H., et Patrick, C. (2018). Biologie - Le cours - Licence, Capes, Prépas (éd. 4e). (Dunod, Éd.). p768.

35. Deschepper, R. (2017). Variabilité de la composition des huiles essentielles et intérêt de la notion de chémotype en aromathérapie. Thèse de doctorat, Université d'Aix-Marseille, Marseille. p148.
36. Descoins, G. (1991). Les étapes prévisibles de l'évolution des techniques de la protection des plantes. Dans INRA (Éd.), Phytosanitaires, Protection des plantes Biopesticides (pp. 107-110). Paris: Éditions Points.
37. Deshayes, A. (1991). Les transferts des capacités phytosanitaires aux plantes elles-mêmes. Dans INRA (Éd.), Phytosanitaires, Protection des plantes Biopesticides (pp. 113-117). Paris: Éditions Points.
38. El Modafar, C. (1994). Aspects histologiques et biochimiques des interactions hôte-parasites (*Platanus* spp., *Ceratocystis fimbriata* f.sp. *platani*). Réactions associées à la défense de l'hôte. Université de Montpellier 2, Sciences et Techniques, Montpellier. p258.
39. El Mouridi, M. (2011). Caractérisation mécanique de la loupe de thuya (*Tetraclinis Articulata* (Vahl) Masters) en vue de sa valorisation. Thèse de doctorat, Univ. Mohammed V, Rabat. P121.
40. Fernandez, X., et Chemat, F. (2012). La chimie des huiles essentielles tradition et innovation. (VUIBERT, Éd.). p288.
41. Festy, D. (2008). Ma Bible des huiles essentielles. (Leduc.s, Éd.). p552.
42. Fortino, S.-S., et Maria, G. M.-N. (2012). Essential oils from aromatic herbs as antimicrobial agents. *Current Opinion in Biotechnology*, 23(2), 136-141. doi:<https://doi.org/10.1016/j.copbio.2011.08.005>
43. Fuchs, J. G. (1993). Paramètres influençant la lutte biologique contre la fusariose vasculaire de la tomate et la pourriture noire des racines de concombre. École polytechnique fédérale Zurich. Zurich: ETH-Zürich. doi:10.3929/ethz-a-000928608
44. Ghanmi, M., Abdellah, F., et Abderrahman, A. (2010). Valorisation des huiles essentielles de *Juniperus thurifera* et de *Juniperus oxycedrus* du Maroc. *Phytothérapie*, 8(3), 166–170.
45. Guignard, J.-L. (2004). Biochimie végétale (éd. 2e). (Dunod, Éd.) Paris, France. P274.
46. Guinoiseau, E. (2010). Molécules antibactériennes issues d'huiles essentielles : séparation, identification et mode d'action. Université de corse-pasquale paoli, Sciences et techniques. p114.
47. Guynot, M., Marín, S., SetÚ, L., et Sanchis, V. (2005). Screening for Antifungal Activity of Some Essential Oils Against Common Spoilage Fungi of Bakery Products.

Food Science and Technology International, 11(1), 25-32.
doi:<https://doi.org/10.1177/1082013205050901>

48. Hadeid, M., Bendjelid, A., Fontaine, J., et Ormaux, S. (2015). Spatial steppe land dynamics: The example of the Upper Western Plains (Algeria). *Cahiers de géographie du Québec*, 59(168), 469–496. doi:10.7202/1037259ar
49. Hadjadj, K. (2016). Étude de la productivité du thuya de Berbérie (*Tetraclinis articulata* Vahl Mast.) dans l'ouest algérien dans la perspective de développement durable. Thèse de doctorat, Université Abou Bekr Belkaid, Foresterie, Tlemcen. P185.
50. Hammer, K., Carson, C., et Riley, T. (2003, 10 1). Antifungal activity of the components of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil. *Journal of Applied Microbiology*, 95(4), 853-860. doi:10.1046/j.1365-2672.2003.02059.x
51. Heitz, F., et Escriva, C. (2017). Aromathérapie pour les ruminants. (F. Agricole, Éd.). p243.
52. Henni, J., Boisson, C., et Geiger, J. P. (1994). Variabilité du pouvoir pathogène chez *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. *Phytopathologia Mediterranea*, 33, 10-16.
53. Inouye, S. (2003). Laboratory evaluation of gaseous essential oils. *International Journal of Aromatherapy*, 13(4), 173-184. doi:10.1016/S0962-4562(03)00082-1
54. Inouye, S., et Abe, S. (2007). Nouvelle approche de l'aromathérapie anti-infectieuse. *Phytothérapie*, 5(1), 2-4. doi:10.1007/s10298-007-0200-3
55. ISO, O. (2019). Catalogue de normes ISO/TC 54. Consulté le 2019, sur Huiles essentielles: <https://www.iso.org/fr/committee/48956/x/catalogue/>
56. Jarvis, W. R., et Shoemaker, R. A. (1978). Taxonomic Status of *Fusarium oxysporum* Causing Foot and Root Rot of Tomato. *Phytopathology*, 68(12), 1679-1680. doi:10.1094/Phyto-68-1679
57. Jean-François, M.-G., Roger, P., Isabelle, B.-C., Frédéric, G., et Marc, J. (2017). *Biologie végétale : croissance et développement* (éd. 3e). (Dunod, Éd.) Paris, France. P272.
58. Jones, J. B., Zitter, T. A., Momol, T., et Miller, S. A. (2014). *Compendium of Tomato Diseases and Pests* (éd. 2e). (A. P. Society, Éd.) Amer Phytopathological Society. P176.
59. Kalili, K., et de Villiers, A. (2011, 4). Recent developments in the HPLC separation of phenolic compounds. *Journal of Separation Science*, 34(8), 854-876. doi:10.1002/jssc.201000811
60. Kaloustian, J., et Hadji-Minaglou, F. (2012). *La connaissance des huiles essentielles : qualilogie et aromathérapie* (éd. 1ere). (Springer-Verlag, Éd.) Paris, France. P210.

61. Kasmi, M., Aourach, M., et El Boukari, M. (2017). Efficacité des extraits aqueux des plantes aromatiques et médicinales contre la pourriture grise de la tomate au Maroc. *Comptes Rendus Biologies*(340), 386–393.
62. Ken, K.-r., Thompson, J., et Linhart, Y. (2009). Beyond six scents: defining a seventh *Thymus vulgaris* chemotype new to southern France by ethanol extraction. (J. W. Sons, Éd.) *Flavour and Fragrance Journal*, 24(3), 117-122. doi:10.1002/ffj.1921
63. Krief, S. (2003). Métabolites secondaires des plantes et comportement animal. Thèse de Doctorat, Muséum national d'histoire naturelle, Paris. P343.
64. Laib, I. (2012). Nature et Technologie Etude des activités antioxydante et antifongique de l'huile essentielle des fleurs sèches de *Lavandula officinalis* : application aux moisissures des légumes secs. *Nature et Technologie*(7), 44-52.
65. Le Houérou, H.-N. (1995). Bioclimatologie et biogéographie des steppes arides du Nord de l'Afrique (Vol. 10). Montpellier, France: CIHEAM. P396.
66. Letreuch, B. (1991). Les reboisements en Algérie et leurs perspectives d'avenir (éd. 2e). (O. d. Universitaires, Éd.) Alger. P 641.
67. López, P., Sánchez, C., Batlle, R., et Nerín, C. (2005). Solid-and vapor-phase antimicrobial activities of six essential oils: susceptibility of selected foodborne bacterial and fungal strains. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(17), 6939–6946. doi:10.1021/jf050709v
68. Lucchesi, M. E. (2006). Extraction Sans Solvant Assistée par Micro-ondes Conception et Application à l'extraction des huiles essentielles. Université de la Réunion, Chimie. Réunion: tec & doc. P132.
69. Maatoug, M. (2003). Effet des facteurs stationnels sur les propriétés physiques, mécaniques et papetières du bois de *Thuya* de Maghreb (Algérie occidentale). Thèse de doctorat, Université de Djilali Liabbes, Biologie, Sidi Belabbes. P160.
70. Macheix, J.-J., Fleuriet, A., et Jay-Allemand, C. (2005). Les composés phénoliques des végétaux : un exemple de métabolites secondaires d'importance économique (éd. 1e). Lausanne, Suisse: Presses Polytechniques et universitaires romandes. P192.
71. Madigan, M., et Martinko, J. (2000). Brock, biologie des micro-organismes (éd. 11e). Paris, France: Pearson. P192.
72. Mailhebiau, P. (2017). Guide pratique d'aromathérapie familiale. Consulté le Janvier 17, 2017, sur <https://aromanet.com/telechargez-guide/>
73. Marmonier, A. A. (1990). Introduction aux techniques d'étude des antibiotiques. Bactériologie Médicale, technique usuelles. Paris: Doin Paris. P236.

74. Marouf, A., et Tremblin, G. (2015). Abrégé de biochimie appliquée. (E. Sciences, Éd.). P578.
75. Medini, H., Manongiu, B., Aicha, N., Chekir-Ghedira, L., Harzalla-Skhiri, F., et Khouja, M. (2013). Chemical and Antibacterial Polymorphism of *Juniperus oxycedrus* ssp. *oxycedrus* and *Juniperus oxycedrus* ssp. *macrocarpa* (Cupressaceae) Leaf Essential Oils from Tunisia. *Journal of Chemistry*, 2013, 1-8.
76. Menzies, J. G., et Jarvis, W. R. (1994). The infestation of tomato seed by *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis-lycopersici*. *Plant Pathology*, 43(2), 378-386. doi:10.1111/j.1365-3059.1994.tb02699.x
77. Mitchell, A., et Wilkinson, J. (2006). Arbres de France et d'Europe occidentale. (Flammarion, Éd.). P271.
78. Morot-Gaudry, J.-F., Prat, R., et Bohn-Courseau, I. (2017). Biologie végétale : Croissance et développement (éd. 3e). (Dunod, Éd.).
79. Morris, J., Khettry, A., et Seitz, E. (1979, 5). Antimicrobial activity of aroma chemicals and essential oils. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 56(5), 595-603. doi:10.1007/BF02660245
80. Onawunmi, G. (1989). Evaluation of the antimicrobial activity of citral. *Letters in Applied Microbiology*, 9(3), 105-108. doi:https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.1989.tb00301.x
81. Oussalah, M., Caillet, S., Saucier, L., et Lacroix, M. (2007). Inhibitory effects of selected plant essential oils on the growth of four pathogenic bacteria: *E. coli* O157:H7, *Salmonella Typhimurium*, *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes*. *Food Control*, 18(5), 414-420. doi:https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2005.11.009
82. Philogène, B., Regnault-Roger, C., et Vincent, C. (2008). Biopesticides d'origine végétale. Paris: Lavoisier. P13.
83. Quézel, P., et Médail, F. (2004). Ecologie et biogéographie des forêts du bassin méditerranéen. (E. Masson, Éd.). P572.
84. Quézel, P., et Santa, S. (1962). Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales (Vol. I). Paris, France: CNRS. P565.
85. Quiret, M. (2008). Les plantes, championnes de l'autodéfense. (L. ECHOS, Éd.) Consulté le 3 12, 2019, sur LES ECHOS: https://www.lesechos.fr/01/10/2008/LesEchos/20269-062-ECH_les-plantes--championnes-de-l-autodefense.htm

- 86.** Ramos, C., Matas, I., Bardaji, L., Aragón, I., et Murillo, J. (2012). *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*: some like it knot. *Molecular Plant Pathology*, 13(9), 998-1009. doi:10.1111/j.1364-3703.2012.00816.x.
- 87.** Raquel, G.-F., et Jesus V, J.-N. (2011). Contribution of Proteomics to the Study of Plant Pathogenic Fungi. *American Chemical Society*, 11(1), 13-16. doi:10.1021/pr200873p
- 88.** Remmal, A., Bouchikhi, T., Rhayour, K., Ettayebi, M., et Tantaoui-Elaraki, A. (1993, 3 1). Improved Method for the Determination of Antimicrobial Activity of Essential Oils in Agar Medium. *Journal of Essential Oil Research*, 5(2), 179-184.
- 89.** Richard, D., Chevalet, P., Fournel, S., et Giraud, N. (2018). *Biologie le cours* (éd. 4e). Dunod. P768.
- 90.** Rodríguez-Palenzuela, P., Matas, I., et Murillo, J. (2010). Annotation and overview of the *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* NCPPB 3335 draft genome reveals the virulence gene complement of a tumour-inducing pathogen of woody hosts. *Environmental Microbiology*, 12(6), 1604-1620. doi:10.1111/J.1462-2920.2010.02207.X
- 91.** Raven, P. Evert, R. et Eichhorn, S. (2015). *Biologie végétale. éd Boeck De., - 3e : p. 862. - ISBN-10 : 2804181561.*
- 92.** Rossi, P.-G., Berti, L., Panighi, J., et Luciani, A. (2007). Antibacterial action of essential oils from Corsica. *Journal of Essential Oil Research*, 19(2), 176-182. doi:10.1080/10412905.2007.9699254
- 93.** Sahraoui, N., Hellal, A., Boutekedjiret, C., et Bessière, J.-M. (2007). Antimicrobial activities of essential oils of some Algerian aromatic plants. *International Journal of Essential Oil Therapeutics*, 1, 83-90.
- 94.** Sauvion, N., Calatayud, P.-A., Thiéry, D., et Marion-Poll, F. (2013). *Interactions insectes-plantes* (éd. 1ère). (Q. GIE, Éd.). P750.
- 95.** Si mohammed, A. (2012). Étude de la compatibilité végétative chez des populations de *fusarium oxysporum* isolées dans l'ouest algérien. Mémoire de magister, Université d'Oran, Biologie, Oran. P106.
- 96.** Surico, G., Lacobellis, N. S., et Sisto, A. (1985). Studies on the role of indole-3-acetic acid and cytokinins in the formation of knots on olive and oleander plants by *Pseudomonas syringae* pv. *savastanoi*. *Physiological Plant Pathology*, 26(3), 309-320. doi:10.1016/0048-4059(85)90006-2

- 97.** Svoboda, K. P., Svoboda, T. G., et Syred, P. M. (2000). Secretory structures of aromatic and medicinal plants. (M. Publications, Ed.)
- 98.** Tourte, Y., Bordonneau, M., et Henry, M. (2005). Le monde des végétaux organisation physiologie et génomique Cours et QCM. (Dunod, Éd.) Paris, France. P384.
- 99.** Vidakovic, M., et Graficki, Z. H. (1993). Conifers morphology and variation (éd. CAB International, Vol. 12). (T. Physiology, Éd.) doi:10.1093/treephys/12.4.319a
- 100.** Xavier, F., et Farid, C. (2012). La chimie des huiles essentielles Tradition et innovation. (Vuibert, Éd.) Paris, France: Vuibert. P284.
- 101.** Young, S., Takikawa, D., et Vauterin, G. (2004). Names of Plant Pathogenic Bacteria. Consulté le 05 25, 2017, sur isppweb: https://www.isppweb.org/Transfer_Files/Names%20of%20Plant%20Pathogenic%20Bacteria%202005.pdf
- 102.** Yves, T., Catherine, T., Max, H., et Michel, B. (2005). Le monde des végétaux - Organisation, physiologie et génomique Cours et QCM. (Dunod, Éd.) Paris, France. P384.