



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

وزارة التعليم العالي و البحث العلمي
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE

جامعة باجي مختار - عنابة
UNIVERSITE BADJI MOKHTAR - ANNABA

FACULTE DES SCIENCES
DEPARTEMENT DE BIOLOGIE

THESE EN VUE DE L'OBTENTION D'UN DIPLOME DE DOCTORAT

Spécialité : Toxicologie Fondamentale Et Appliquée

Intitulé

Etude De L'effet Biopesticide Des Extraits Naturels De Deux Plantes
De La Famille Des Myrtacées : *Eucalyptus globulus*, *Eucalyptus
camaldulensis*.

Presentée par:

M^{me} MEKSEM Nabila épouse OUMEDDOUR

Membres de Jury:

Mr DJEBAR Med Reda	Pr. Président	Université d'Annaba
Mme BORDJIBA Ouahiba	Pr. Directrice de thèse	Université d'Annaba
Mme BEDDIAR Arifa	Pr. Examinatrice	Université d'Annaba
Mr GHEID Abdelhak	Pr. Examineur	Université de Souk Ahras
Mr DJAHRA Ali Boutelis	Dr. Examineur (MCA)	Université d'EL Oued

Année universitaire: 2017/1018

REMERCIEMENTS

Il me sera très difficile de remercier tout le monde car c'est grâce à l'aide de nombreuses personnes que j'ai pu mener cette thèse à son terme.

Je voudrais tout d'abord remercier grandement ma directrice de thèse, Professeur, BORDJIBA Ouahiba, pour toute son aide. Je suis ravie d'avoir travaillé en sa compagnie car outre son appui scientifique, elle a toujours été là pour me soutenir et me conseiller au cours de l'élaboration de cette thèse.

Aussi grande que puisse être ma gratitude, soyez assurée qu'elle ne sera jamais à la hauteur de tous les efforts que vous avez déployés. Merci madame.

Toute ma gratitude et reconnaissance s'adresse au Pr. DJEBAR Med Réda, Directeur du laboratoire de Toxicologie fondamentale et appliquée, pour avoir d'une part, bien voulu nous faire l'honneur de présider ce jury, et d'autre part pour son soutien, sa disponibilité, ses qualités scientifiques dont j'ai pu profiter depuis la licence.

Madame La professeure BEDDJAR Arifa, m'a fait l'honneur d'être rapporteur de ma thèse, elle a pris le temps de m'écouter et de discuter avec moi avec patience et sourire.

Je tiens également à remercier Mr DJAHRA Ali Boutelis Maître de conférence A à l'Université D'El Oued, pour avoir pris sur son temps et accepter d'examiner ce travail et participer à ce jury.

Mes plus vifs remerciements à Mr GHED Abdelhak Professeur à l'Université de Souk Ahras, pour sa disponibilité et pour faire partie de ce jury, je lui exprime toute ma gratitude d'avoir accepté d'examiner ce travail.

Je souhaite remercier l'ensemble de mes enseignants, durant mon parcours universitaire, tout particulièrement, Madame la Professeur BERRERBAH Houria, ainsi que le docteur SBARJAI Hanna, le Professeur KHEBBEB Med El Hedi et professeur MEKSEM AMARA Leila.

Je ne saurais oublier de remercier également ma tatie , Mme ARJBI Nadia- (Professeur à l'université Badji Mokhtar d'Annaba), je ne saurais oublier tous les conseils et les orientations qu'elle a pu me transmettre durant toutes ces années de travail.

Un grand merci à monsieur FAHAR Ali (Professeur à l'université Badji Mokhtar Annaba), pour tous ses encouragements et conseils.

Je remercie spécialement Professeur SOLJANI Nourredine, vos conseils et remarques m'ont toujours été précieux profitables.

Professeur, OUAJID Mohamed Laid et Dr HABBACHI Wafa ainsi que la Doctorante BEKHAKECHE Manel. Merci pour toute votre aide scientifique.

Je tiens à remercier la conservation des forêts de la wilaya de Annaba, particulièrement Mr FERKI Farouk pour son aide précieuse lors des récoltes des feuilles d'Eucalyptus.

Je remercie également le Docteur Hamza Amel, pour sa gentillesse, son soutien et ses encouragements.

Un remerciement particulier à mes parents, Vous qui avez fait de moi ce que je suis aujourd'hui, qui avez toujours cru en moi et su me redonner confiance lors que la motivation n'était plus au rendez-vous.

À papa, toi qui a toujours été fier de moi, tout les mots du monde ne peuvent suffir à exprimer ma gratitude.

À maman, le pilier de ma vie, c'est grâce à toi que je suis arrivée jusque là, j'ai tout appris avec toi. Les mots m'échappent et quoique je puisse dire, ne sera en mesure d'exprimer ma reconnaissance.

À mon époux Fethi, quelques lignes ne suffiraient pas, pour le remercier. Son soutien, sa disponibilité et ses encouragements, m'ont donné la force et le courage de terminer cette thèse.

MERCI d'avoir cru en moi.

Quant à toi , petite sœur « Yousria » tu as dépensé de nombreux moments, pour me garder NEJLA et pour m'aider je te suis très reconnaissante.

Je t'aime.

Neila ma fille , tu as été une note de gaieté, dans ma vie et un encouragement dans l'aboutissement de cette thèse.

Je remercie toutes les personnes formidables que j'ai rencontrées par le biais de ce travail de recherche. Merci pour votre support et vos encouragements. Je pense particulièrement à toutes les techniciennes du département de biologie, en particulier à FAREH Wafa, BOUKHALFA Sihem, JAHRAOUI Chahira, NAJRI Wafa, CHAKOURI Nadia, MEJIAZ Anissa, BENOSMANE Madina, CHJHEB Linda, CHIBI Asma, Choumeissa, Dalila et Basma.

Je remercie mes amies : ADOUANE Meriem, MERAD Isma, FERFAR Meriem, BENSADJ Marwa, BERRANEM Ahlem, KERKOUR Neila, DRIDI Amina et MEHNACUI Ilhem, merci d'avoir été là pour moi.

Je ne s'aurais oublier de remercier toutes les personnes que j'ai pu côtoyer au laboratoire de Biologie végétale et environnement et le laboratoire de Physiologie végétale : KASSAJNE Amina, KSENTJINI Hana, BRAKNI Rafika, FEJNAJ Imene, BOUDHIAJ Imene, CHERAJJIA Selma, CHORFA Hassina, DAJRI Ahlem, MERAQJANI Souad, AJMEUR najette, BENKHERARA Salah, BELAZE Abdelhakim, SLEMANI Rachid, HAMEL Farek.

Enfin , outre ma petite et ma grande famille et belle famille qui ont toujours été d'un grand soutien au cours de ces années de thèse , Mille merci .

Merci du fond du cœur

DEDICACES

A Papa et maman

A Fethi

A tonton Bachir, tata Fatiha, Jazia, Sofiene et Alia Ryam

A mes oncles khali Ali et Khali Redjem

A mes sœurs et frère, beaux frères et belle sœur.

A toutes mes tantes maternelles et paternelles

A tous mes neveux et nièces

A tous mes cousins et cousines

A Sabrina, Maya, Kenzi et particulièrement Jasmine

A tous mes amis

RESUME

L'objectif de ce travail visait à déterminer le pouvoir biopesticide de l'extrait foliaire hydro-méthanolique d'*Eucalyptus globulus* et *Eucalyptus camaldulensis* par des études in vitro et in vivo ex situ à travers plusieurs approches méthodologiques. Un inventaire d'agents pathogènes réalisé à partir des sols et des cultures infectées a permis de sélectionner les souches les plus performantes, en vue de les soumettre à l'effet des extraits et de tester leur croissance sous des conditions différentes. L'effet biopesticide (activité antifongique et antibactérienne) ainsi que la détermination des CMI et des CMB/CMF des extraits sont étudiées par des méthodes in vitro d'inhibition sur milieu solide et liquide. Les cinétiques de croissance des différentes souches testées et leur réponse vis à vis des extraits naturels ont été déterminées par la technique de la culture en mode batch sous des conditions anaérobiques en milieu discontinu non renouvelé en tenant compte de trois paramètres de croissance (turbidité, acidité, biomasse microbienne).

De tous les résultats obtenus, il ressort que l'extrait brut foliaire hydro-méthanolique testé in vitro a réduit la croissance des agents pathogènes avec des taux d'inhibition non négligeables de l'ordre de 99% pour *Serratia plymuthica* et 86,34% pour la majorité des champignons. Cet effet réductif est confirmé par la biomasse évaluée en mode discontinu sur culture batch. Les cinétiques obtenues des différents paramètres analysés ont montré une inhibition importante de la plupart des souches et une biomasse microbienne modeste en présence des extraits des deux espèces d'Eucalyptus (*E.globulus* et *E.camaldulensis*) par comparaison à celles enregistrées en présence du pesticide chimique conventionnel, le Vidan 25 EC. L'effet antifongique et antibactérien des extraits naturels évalué in vitro sur *Capsicum annum* inoculé ex situ par les agents pathogènes nous a permis de noter des nécroses au niveau de l'exocarpe et du mésocarpe dont l'étendue des lésions est souvent moins importante que celle du pesticide chimique. Les essais in vivo viennent confirmer de nouveau l'effet biopesticide de nos substances naturelles d'Eucalyptus apprécié à partir des tests in vitro.

La toxicité de ces extraits naturels d'Eucalyptus doués d'un fort pouvoir antibactérien et antifongique sur des organismes non cibles a été d'abord vérifiée à travers un test réalisé sur une espèce céréalière *Triticum durum*. Les extraits dilués semblent exercer une toxicité non négligeable sur le pouvoir germinatif et les potentialités (% de germination, NMR, LMR, IG) des graines de *Triticum durum*. En outre cette toxicité semble diminuer avec le temps puisque les graines ayant germé en présence des extraits ont montré une élévation des racines assez similaires aux autres substances. Parallèlement, le pouvoir germinatif est plus prononcé chez les graines traitées à base du pesticide chimique (Vidan 25 EC).

Cette toxicité sur les organismes non cibles a été poursuivie et démontrée sur un organisme animal *Loboptera decipiens* responsable de la dégradation de la litière forestière. Les taux de mortalité des blattes enregistrés après 48h affirment la non toxicité de ces extraits naturels comparativement au pesticide chimique de synthèse.

Mots clés: Biopesticides, effet antifongique, effet antibactérien, *Eucalyptus globulus*, *Eucalyptus camaldulensis*, agent pathogène des cultures, toxicité, organismes non cibles.

ABSTRACT

The objective of this work was to determine the biopesticide potency of the hydro-methanolic leaf extract of *Eucalyptus globulus* and *Eucalyptus camaldulensis* by in vitro and in vivo ex situ studies through several methodological approaches. An inventory of pathogens made from infected soils and cultures has made it possible to select the best-performing strains, with a view to subjecting them to the effect of the extracts and to testing their growth under different conditions. The biopesticide effect (antifungal and antimicrobial activity) as well as the determination of MICs and CMB / CMF extracts are studied by in vitro methods of inhibition on solid and liquid medium. The kinetics of growth of the various strains tested and their response to natural extracts were determined by the culture technique in batch mode under anaerobic conditions in a non-renewed discontinuous medium taking into account three growth parameters (turbidity, acidity). microbial biomass).

From all the results obtained, it appears that the hydrolase-methanol raw leaf extract tested in vitro reduced the growth of the pathogens with significant inhibition rates of the order of 99% for *Serratia plymuthica* and 86.34% for the majority of mushrooms. This reductive effect is confirmed by the biomass evaluated in batch mode on batch culture. The kinetics obtained from the different parameters analyzed showed a significant inhibition of most of the strains and a modest microbial biomass in the presence of the extracts of the two species of Eucalyptus (*E.globulus* and *E.camaldulensis*) compared to those recorded in the presence of the pesticide. conventional chemical, the Vidan25 EC. the antifungal and antibacterial effect of natural extracts evaluated in vitro on *Capsicum annum* inoculated ex situ by the pathogens allowed us to note necrosis in the exocarp and mesocarp, the extent of lesions is often less important than that chemical pesticide. The in vivo tests confirm the biopesticide effect of our natural Eucalyptus substances, which has been evaluated from in vitro tests.

The toxicity of these natural extracts of Eucalyptus endowed with a strong antibacterial and antifungal power on non-target organisms was first verified through a test carried out on a cereal species *Triticum durum*. The diluted extracts appear to exert a significant toxicity on the germination capacity and the potentialities (% germination, ANR, ARL, GI) of the seeds of *Triticum durum*. In addition, this toxicity seems to decrease with time since the seeds having germinated in the presence of the extracts showed a root elongation quite similar to the other substances. At the same time, germination is more pronounced in seeds treated with the chemical pesticide (Vidan 25 EC).

This toxicity to non-target organisms has been continued and demonstrated on an animal organism *Lobopteradeciens* responsible for the degradation of forest litter. The mortality rates of cockroaches recorded after 48 hours affirm the nontoxicity of these natural extracts compared to synthetic chemical pesticides.

Keywords: Biopesticides, antifungal effect, antibacterial effect, *Eucalyptus globulus*, *Eucalyptus camaldulensis*, pathogen, toxicity, non-target organisms.

ملخص:

الهدف من هذا العمل هو تحديد مدى قوة المستخلص الورقي الأيدروميتانولي كمبيد حيوي للنوع النباتي *Eucalyptus globulus* و *Eucalyptus camaldulensis* وذلك بواسطة اجراء دراسات مخبرية *in vitro* وكذلك تطبيقية *in vivo ex situ* باستعمال طرق ومناهج علمية مختلفة ومن خلال جرد لمختلف العوامل الممرضة لمجموعة من الأتربة وزراعات مصابة ، تم اختيار وتحديد السلالات الجرثومية الأكثر صلابة وفعالية من اجل اخضاعها لتأثير المستخلصات النباتية وكذا اختبار مدى نموها في ضل ظروف مختلفة. كما تم ايضا دراسة النشاط الحيوي (نشاط مضاد للبكتيريا والفطريات) وكذا تحديد كل من CMI و CMB/CMF للمستخلصات النباتية بطرق تثبيط مخبرية *in vitro* وفي أوساط نمو صلبة وسائلة. تم أيضا تحديد حركية النمو لكل السلالات والأنواع الجرثومية المختبرة وكذا مدى استجاباتها تجاه المستخلصات الطبيعية بتقنية الزرع *batch* تحت ظروف لاهوائية وفي وسط غير مستمر وغير متجدد مع الأخذ بعين الاعتبار ثلاث عوامل ومعايير نمو مختلفة (التعكر، الحموضة وكذا الكتلة الحيوية الجرثومية).

من خلال مجمل النتائج المتحصل عليها، يبدو أن المستخلص النباتي الورقي تمكن من تقليل نمو الجراثيم الممرضة مع تسجيل معدل تثبيط معتبر يعادل 99% بالنسبة ل *Serratia plymuthica* و 86.34% فيما يخص غالبية الفطريات. تم تأكيد هذا التأثير الاختزالي بواسطة الكتلة الحيوية التي تم تقييمها في وضع الدفعات في مزرعة *batch*.

وأظهرت مختلف الحركيات المتحصل عليها لمختلف المعايير المدروسة تثبيطا معتبرا لغالبية السلالات أو الأنواع الجرثومية وكتلة حيوية متواضعة في وجود المستخلصات النباتية لكل من *E. globulus* و *E. camaldulensis* مقارنة مع تلك المسجلة في وجود المبيد الكيميائي التقليدي، Vidan 25EC. بالمقابل سمح التأثير المضاد الفطري والبكتيري المدروس مخبريا *in vitro* للمستخلصات النباتية الطبيعية تجاه *Capsicum annum* المنقول خارج الموقع *ex situ* عن طريق الجراثيم بملاحظة وتسجيل ثقب وتخريبات على مستوى *Mésocarpe* و *Exocarpe* علما أن مدى هذه الجروح في غالب الأحيان أقل حجما مقارنة مع ما يتسبب فيه المبيد الكيميائي. التجارب في الواقع *in vivo* تؤكد بدورها مدى تأثير المبيدات الحيوية ذات الأصول الطبيعية للكالييتوس المتحصل عليها من خلال الاختبارات المخبرية *in vitro*.

تما لتحقق من سمية هذه المستخلصات الطبيعية للكالييتوس ذات القوة ضد البكتيرية والفطرية على كائنات غير مستهدفة من خلال اختبار تم إجراؤه على النوع النباتي *Triticum durum*. كما يبدو أن المستخلصات المخففة بإمكانها أنمارسمية كبيرة على القدرة الإنتاشية وكذا بعض الإمكانيات (النسبة المئوية للإنتاش، م ع ج ، م ط ج ، م إ) لبذور *Triticum durum*. بالإضافة إلى ذلك، يبدو أن هذه السمية تتناقص مع مرور الوقت لأن البذور التي نبتت في وجود المستخلصات أظهرت استطالة جذرية تشبه إلى حد بعيد المواد الأخرى. في الوقت نفسه، تكون القدرة الإنتاشية أكثر وضوحاً لدى البذور المعالجة بالمبيدات الكيميائية (Vidan 25 EC).

استمرت هذه السمية للكائنات غير المستهدفة وتم تأكيدها وإثباتها على كائن حيواني *Loboptera decipiens* المسؤول عن تحطيم وتفكيك فضلات وبقايا الغابات. تؤكد معدلا توفيات الصراصير المسجلة بعد 48 ساعة عدم سمية هذه المستخلصات الطبيعية مقارنة بالمبيدات الكيميائية الاصطناعية.

الكلمات الدالة: المبيدات الحيوية، تأثير مضاد للفطريات، تأثير مضاد للبكتيريا، *Eucalyptus globulus*، *Eucalyptus camaldulensis* ، عامل ممرض للمحاصيل، السمية، كائنات غير مستهدفة.

LISTE DES FIGURES

N°	Titre	Page
01	<i>Eucalyptus globulus</i> (Photo personnelle).	22
02	<i>Eucalyptus camaldulensis</i> (Photo personnelle).	23
03	Carte de localisation du site de prélèvement d' <i>Eucalyptus globulus</i> et <i>Eucalyptus camaldulensis</i> (www.google.com/maps)	27
04	Structure chimique de triadimenol (https://encrypted.google.com/)	29
05	Méthode d'isolement des agents microbiens	33
06	Détermination de la CMI par la méthode de dilution en milieu liquide	45
07	Phases de la méthodologie utilisée pour l'évaluation pouvoir inhibiteur des extraits naturels sur la croissance des souches phytopathogènes	47
08	Protocole expérimental de l'effet ex situ des extraits des deux espèces d'Eucalyptus sur <i>Capsicum annum</i> inoculé par les différentes souches microbiennes	49
09	Teneur en polyphénols totaux des deux espèces d'Eucalyptus	53
10	Microflore totales au niveau des deux sols	56
11	Répartition de la microflore dans les deux sols	56
12	Répartition de la microflore de surface et intracellulaire	57
13	Diamètre d'inhibition de <i>Aspergillus niger</i> en présence des extraits des deux espèces d'Eucalyptus	61
14	Diamètre d'inhibition de <i>Fusarium culmorum</i> en présence des extraits des deux espèces d'Eucalyptus	62
15	Diamètre d'inhibition de <i>Mucor plumbeus</i> en présence des extraits des deux espèces d'Eucalyptus	63
16	Diamètre d'inhibition de <i>Botrytis cinera</i> en présence des extraits des deux espèces d'Eucalyptus	64
17	Diamètre d'inhibition de <i>Penicillium notatum</i> en présence des extraits des deux espèces d'Eucalyptus	65
18	Effet des différentes substances testées sur la croissance d' <i>Alternaria alternata</i>	65
19	Effet des différentes substances testées sur la croissance d' <i>Aspergillus niger</i>	66

20	Effet des différentes substances testées sur la croissance <i>Fusarium culmorum</i>	67
21	Diamètre d'inhibition de <i>Mucor plumbeus</i> en présence des extraits des deux espèces d'Eucalyptus	67
22	Effet des différentes substances testées sur la croissance de <i>Botrytis cinera</i>	68
23	Effet des différentes substances testées sur la croissance de <i>Penicillium notatum</i>	69
24	Diamètre d'inhibition de <i>Pasteurella pneumotropica</i> en présence des extraits des deux espèces d'Eucalyptus	70
25	Diamètre d'inhibition de <i>Burkholderia cepacia</i> en présence des extraits des deux espèces d'Eucalyptus	71
26	Diamètre d'inhibition de <i>Serratia plymuthyca</i> en présence des extraits des deux espèces d'Eucalyptus	72
27	Diamètre d'inhibition de <i>Cedecea lapagei</i> en présence des extraits des deux espèces d'Eucalyptus	73
28	Diamètre d'inhibition de <i>Chryseobacterium meningosepticome</i> en présence des extraits des deux espèces d'Eucalyptus	74
29	Effet des différentes substances testées sur la croissance de <i>Pasteurlla pneumotropica</i>	75
30	Effet des différentes substances testées sur la croissance de <i>Burkholderia cepacia</i>	75
31	Effet des différentes substances testées sur la croissance de <i>Serratia plymuthyca</i>	76
32	Effet des différentes substances testées sur la croissance de <i>Cedecea lapagei</i>	77
33	Effet des différentes substances testées sur la croissance de <i>Chryseobacterium meningosepticum</i>	77
34	Variation des D.O de <i>Penicillium notatum</i> en présence du pesticide et des extraits des deux espèces d'Eucalyptus	81
35	Variation des D.O d' <i>Alternata alternata</i> en présence du pesticide et des extraits des deux espèces d'Eucalyptus	81
36	Variation des D.O de <i>Botrytis cinerea</i> en présence du pesticide et des extraits des deux espèces d'Eucalyptus	82
37	Variation des D.O d' <i>Aspergillus niger</i> en présence du pesticide et des extraits des deux espèces d'Eucalyptus	82

38	Variation des D.O de <i>Fusarium culmorum</i> en présence du pesticide et des extraits des deux espèces d'Eucalyptus	83
39	Variation des D.O de <i>Mucor plumbeus</i> en présence du pesticide et des extraits des deux espèces d'Eucalyptus	83
40	Variation des D.O <i>Burkholderia cepacia</i> en présence du pesticide et des extraits des deux espèces d'Eucalyptus	85
41	Variation des D.O de <i>Cedecea lapagei</i> en présence du pesticide et des extraits des deux espèces d'Eucalyptus	85
42	Variation des D.O de <i>Serratia plymuthyca</i> en présence du pesticide et des extraits des deux espèces d'Eucalyptus	86
43	Variation des D.O de <i>Pasteurella pneumotropica</i> en présence du pesticide et des extraits des deux espèces d'Eucalyptus	86
44	Variation des D.O de <i>Chryseobacterium meningosepticum</i> en présence du pesticide et des extraits des deux espèces d'Eucalyptus	87
45	Cinétique du pH de <i>Penicillium notatum</i>	88
46	Cinétique du pH d' <i>Alternaria alternata</i>	88
47	Cinétique du pH de <i>Botrytis cinera</i>	89
48	Cinétique du pH d' <i>Aspergillus niger</i>	89
49	Cinétique du pH de <i>Fusarium culmorum</i>	90
50	Cinétique du pH de <i>Mucor plumbeus</i>	90
51	Cinétique du pH de <i>Burholderia cepacia</i>	91
52	Cinétique du pH de <i>Cedecea lapagei</i>	92
53	Cinétique du pH de <i>Serratia plymuthyca</i>	92
54	Cinétique du pH de <i>Chryseobacterium meningosepticum</i>	93
55	Cinétique du pH de <i>Pasteurella pneumotropica</i>	93
56	Biomasse fongique soumise à l'effet des extraits des deux espèces d'Eucalyptus et du Vidan 25 EC	94
57	Biomasse bactérienne soumise à l'effet des extraits des deux espèces d'Eucalyptus et du Vidan 25 EC	95
58	Etendue des nécroses sur <i>Capsicum annum</i> inoculé ex situ par <i>Alternaria alternata</i> et traité par les différentes substances	96
59	Etendue des nécroses sur <i>Capsicum annum</i> inoculé ex situ par <i>Aspergillus niger</i> et traité par les différentes substances	97

60	Etendue des nécroses sur <i>Capsicum annum</i> inoculé ex situ par <i>Fusarium culmorum</i> et traité par les différentes substances	97
61	Etendue des nécroses sur <i>Capsicum annum</i> inoculé ex situ par <i>Mucor plumbeus</i> et traité par les différentes substances	98
62	Etendue des nécroses sur <i>Capsicum annum</i> inoculé ex situ par <i>Botrytis cinera</i> et traité par les différentes substances	99
63	Etendue des nécroses sur <i>Capsicum annum</i> inoculé ex situ par <i>Penicillium notatum</i> et traité par les différentes substances	99
64	Etendue des nécroses sur <i>Capsicum annum</i> inoculé ex situ par <i>Cedecea lapagei</i> et traité par les différentes substances	100
65	Etendue des nécroses sur <i>Capsicum annum</i> inoculé ex situ par <i>Burkholderia cepacia</i> et traité par les différentes substances	101
66	Etendue des nécroses sur <i>Capsicum annum</i> inoculé ex situ par <i>Serratia plymuthyca</i> et traité par les différentes substances	101
67	Etendue des nécroses sur <i>Capsicum annum</i> inoculé ex situ par <i>Pasteurella pneumotropica</i> et traité par les différentes substances	102
68	Etendue des nécroses sur <i>Capsicum annum</i> inoculé ex situ par <i>Chryseobacterium meningosepticum</i> et traité par les différentes substances	103
69	Effet des extraits polyphénoliques d' <i>Eucalyptus globulus</i> et <i>Eucalyptus camaldulensis</i> sur le pourcentage de germination de <i>Triticum durum</i>	104
70	Effet des extraits polyphénoliques d' <i>Eucalyptus globulus</i> et <i>Eucalyptus camaldulensis</i> sur le nombre moyen racinaire de <i>Triticum durum</i>	105
71	Effet des extraits polyphénoliques d' <i>Eucalyptus globulus</i> et <i>Eucalyptus camaldulensis</i> sur la longueur moyenne racinaire de <i>Triticum durum</i>	106
72	Effet des extraits polyphénoliques d' <i>Eucalyptus globulus</i> et <i>Eucalyptus camaldulensis</i> sur l'indice de germination de <i>Triticum durum</i>	107
73	Cinétique de mortalité de <i>Loboptera decipiens</i>	109

LISTE DES TABLEAUX

N°	Titre	page
01	Tableau de lecture des tests du système API 20 E	38
02	Tableau de lecture des tests du système API 20 NE	40
03	criblage phytochimique des extraits	52
04	Teneur en polyphénols totaux des deux espèces d'Eucalyptus	53
05	Résultats de l'identification par CCM	54
06	Microflore totales bactérienne	59
07	Microflore totale fongique	60
08	Concentrations minimales inhibitrices et bactéricides (CMI, CMB) des souches bactériennes	79
09	Concentrations minimales inhibitrices et fongicide (CMI, CMF) des souches fongiques	79

LISTE DES ABREVIATIONS

API 20 E : analytical Profile Index 20 Enterobacteries

API 20 NE : analytical Profile Index 20 Non Enterobacteries

BMH : Bouillon Mueller Hinton

CCM : Chromatographie sur couche mince

CMB : Concentration Minimale Bactéricide ou Bactériostatique

CMF : Concentration Minimale Fongicide ou Fongistatique

CMI : Concentration Minimale Inhibitrice

Cup : Cupule

DMSO : Diméthylsulfoxyde

E : Eucalyptus

EAG/gMS : Equivalent Acide Gallique par gramme de Matière Sèche

EC : Concentré émulsionnable

FNRS : Fonds National de Recherche Scientifique

GS : GALZY et SOLNIMSKI

GV : Vaculovirus Responsables des Polyédroses Granuloses

IG : Indice de Germination

LMR : Longueur Moyenne des Racines

MDDEP : Ministère du Développement durable, de l'Environnement et des Parcs du Québec

MEA : Malt Extract Agar

MH : Mueller Hinton

NDPPD : N diméthyl-paraphénylène-diamine

NMR : Nombre Moyen des Racines

NPV : Vaculovirus Responsables des Polyédroses Nucléaires

PDA : Potato Dextrose Agar

PG : Pourcentage de Germination

PGPR : Plant Growth Promoting Rhizobacteria

PGRP : Plant Growth Promoting Rhizobacteria

PIP : Plant Incorporated-Protectants

Ppam : Institut Technique Des Filières Plantes Aromatiques, Médicinales Et A Parfum

PRPB : Programme de Réduction des Pesticides et Biocides

QTE : Quantité

SM : Solution mère

US.EPA : United States, Environmental Protection Agency

USFDA : US Food and Drug Administration

V/V : Volume par Volume

YE : Yeast Extract

Remerciements

Dédicaces

Résumé

Abstract

ملخص

Liste des figures

Liste des tableaux

Liste des abréviations

Table des matières

Introduction	1
Synthèse bibliographique.....	7
1. Les biopesticides.....	7
1.1. Biopesticides d'origine microbienne.....	7
- Les biopesticides à base de souches bactériennes.....	8
- Les biopesticides à base de virus.....	9
- Les biopesticides à base de souches fongiques.....	10
1.2. Biopesticides animaux.....	11
1.3. Biopesticides végétaux.....	12
- Effets sur les agents pathogènes.....	14
- Effets sur les insectes, les adventices.....	15
1.4. Les avantages des biopesticides.....	15
1.5. Les inconvénients des biopesticides.....	17
2. L'Eucalyptus.....	18

2.1. Description de l'ordre Myrtale.....	19
2.2. Description de la famille des Myrtacées.....	19
2.3. Description du genre <i>Eucalyptus</i>	20
2.4. Description des espèces végétales d' <i>Eucalyptus globulus</i> et d' <i>Eucalyptus camaldulensis</i>	21
2.5. Les différentes biomolécules contenus dans le genre <i>Eucalyptus</i>	24
2.5.1. Les polyphénols.....	24
2.5.2. Les tanins.....	25
2.5.3. Les flavonoïdes.....	25
2.5.4. Les coumarines.....	25
2.5.5. Les terpènes et les terpénoïdes.....	26
2.5.6. Les huiles essentielles.....	26
2.5.7. Les saponines.....	26
Matériel et méthodes.....	27
1. Présentation du matériel végétal.....	27
1.1. <i>Eucalyptus globulus</i> et <i>Eucalyptus camaldulensis</i>	27
1.2. Pesticides naturels : extraits des deux espèces d' <i>Eucalyptus</i>	28
2. Présentation du pesticide chimique de synthèse.....	28
3. Présentation du matériel microbologique.....	29
4. Etude phytochimique des extraits d' <i>Eucalyptus</i>	30
4.1. Préparation des extraits bruts hydro-méthanoliques.....	30
4.2. Mise en évidence des composés du métabolisme secondaire.....	30
4.3. Quantification des composés polyphénoliques totaux	30

4.4. Identification des extraits des deux espèces d'Eucalyptus par chromatographie sur couche mince (CCM).....	31
5. Isolement, purification et identification des agents pathogènes responsables de maladies bactériennes et fongiques des cultures	32
5.1. Isolement à partir du sol.....	32
5.2. Isolement à partir de la plante.....	33
5.3. Ensemencement.....	34
5.4. Purification et conservation.....	34
5.5. Identification des souches microbiennes purifiées.....	35
5.5.1. Les bactéries.....	35
- Examen macroscopique.....	35
- Examen microscopique.....	35
- Test Oxydase.....	36
- Test Catalase.....	36
- Systèmes d'identifications à l'aide de galeries API 20 E.....	37
- Systèmes d'identifications à l'aide de galeries API 20 NE.....	39
5.5.2. Les champignons.....	41
- Examen macroscopique.....	41
- Examen microscopique.....	41
6. Etude in vitro de l'effet biopesticide des extraits des deux espèces d'Eucalyptus.....	42
- Préparation de l'inoculum bactérien.....	42
- Préparation des dilutions.....	42
- Préparation de la gamme de concentration des extraits	42

6.1. Evaluation de l'effet antimicrobien (antifongique et antibactérien).....	42
- Selon la technique de la diffusion sur milieu solide.....	42
- Selon la technique de l'incorporation de l'extrait dans le milieu de culture liquide.....	43
6.2. Evaluation de l'effet bactériostatique/bactéricide et fongistatique/fongicide.....	43
6.3. Cinétique de la croissance microbienne sous l'effet des extraits par la méthode de la culture discontinue en mode batch.....	45
7. Etude in vivo des extraits des deux espèces d'Eucalyptus sur <i>Capsicum annum</i> inoculé ex situ par les différentes souches microbiennes.....	48
8. Etude de la toxicité des extraits des deux espèces d'Eucalyptus sur les organismes non cibles.....	50
8.1. Evaluation de l'effet toxique des extraits sur <i>Triticum durum</i>	50
- Pourcentage de germination.....	50
- Nombre moyen des racines.....	51
- Longueur moyenne des racines.....	51
- Indice de germination.....	51
8.2. Evaluation de l'effet toxique des extraits d'eucalyptus sur <i>Loboptera decipiens</i> ...	51
Résultats.....	53
1. Etude phytochimique des extraits d'Eucalyptus.....	53
1.1. Mise en évidence des composés du métabolisme secondaire	53
1.2. Quantification des composés polyphénolique totaux.....	53
1.3. Identification des extraits des deux espèces d'Eucalyptus par chromatographie sur couche mince (CCM).....	54

2. Isolement, purification et identification des agents pathogènes responsables de maladies bactériennes et fongiques des cultures.....	56
2.1. Isolement à partir du sol.....	56
2.2. Isolement à partir de la plante.....	58
2.3. Identification des souches microbiennes isolées.....	59
3. Etude in vitro de l'effet biopesticide des extraits des deux espèces d'Eucalyptus.....	62
3.1. Evaluation de l'effet antifongique.....	62
- Selon la technique de la diffusion sur milieu solide.....	62
- Selon la technique de l'incorporation de l'extrait dans le milieu de culture	
Liquide.....	66
3.2. Evaluation de l'effet antibactérien	70
- Selon la technique de la diffusion sur milieu solide.....	70
- Selon la technique de l'incorporation de l'extrait dans le milieu de culture	
liquide.....	74
3.3. Evaluation de l'effet bactériostatique/bactéricide et fongistatique/fongicide.....	78
3.4. Cinétique de la croissance microbienne sous l'effet des extraits par la méthode de la culture discontinue en mode batch.....	80
- Evaluation de la cinétique de la turbidimétrie (D.O).....	80
- Cinétique de l'acidité (pH).....	87
- Détermination de la biomasse microbienne fongique et bactérienne.....	93
4. Etude in vivo des extraits des deux espèces d'Eucalyptus sur <i>Capsicum annum</i> inoculé ex situ par les différentes souches microbiennes.....	95

5. Etude de la toxicité des extraits des deux espèces d'Eucalyptus sur les organismes non cibles.....	103
5.1. Evaluation de l'effet toxique des extraits sur <i>Triticum durum</i>	103
- Pourcentage de germination.....	103
- Nombre moyen des racines.....	104
- Longueur moyenne des racine.....	105
- Indice de germination.....	106
5.2. Evaluation de l'effet toxique des extraits d'eucalyptus sur <i>Loboptera decipiens</i> ...107	
Discussion.....	109
Conclusion et perspectives.....	118
Références bibliographiques.....	121
Annexes.....	135

INTRODUCTION

INTRODUCTION

Parmi les substances chimiques les plus utilisées dans notre environnement actuel, ce sont sans aucun doute les pesticides et les produits apparentés. L'utilisation de ces produits phytopharmaceutiques contribue à prendre les mesures préventives contre les ennemis des cultures et à récolter des produits sains. On comprend toute l'utilité des produits phytopharmaceutiques lorsque ceux-ci ne sont plus disponibles. En Europe, selon le ministère de l'environnement et de développement durable français, la perte potentielle de récolte sur blé en absence de protection a été estimée en moyenne à 45% (Turner *et al.*, 2006).

Le développement de ces produits chimiques a constitué durant la moitié du 20^{ème} siècle, une révolution technologique dans le domaine de la protection des cultures (Moser et Obrycki, 2009 ; Kristoff *et al.*, 2010 ; Shah et Iqbal 2010 ; Eriksson et Wiktelius, 2011 ; Stevens *et al.*, 2011). Mais les succès qu'ils rencontrèrent immédiatement dans le contrôle des espèces nuisibles aux cultures ainsi qu'à la santé humaine et animale, ont conduit à leur utilisation intensive et souvent sans discernement.

Cependant, à mesure que la science progresse, on saisit mieux l'importance d'atténuer l'exposition des végétaux, des animaux et des humains aux produits chimiques dangereux. De nombreux pesticides synthétiques classiques sont devenus préoccupants, même si l'on présume qu'ils ont atteint le degré «d'innocuité». L'utilisation répétée et continue de pesticides à base du même ingrédient actif, appartenant à la même famille et au même groupe chimique, favorise considérablement le développement de populations résistantes d'organismes nuisibles entraînant par le fait même, un besoin additionnel en pesticides (Ahmad *et al.*, 2008).

Cet emploi progressif des pesticides conventionnels implique des impacts néfastes sur la santé humaine et sur l'environnement. En effet, les pesticides peuvent se disperser dans les différents compartiments de l'environnement et devenir, dans certaine condition, des polluants du sol, de l'air, de l'eau ou des aliments (Köhler et Triebkorn, 2013). Des études ont montré la présence des résidus de pesticides dans les écosystèmes fréquemment en phase aqueuse (dans les eaux de rivières (Irace-Guirand *et al.*, 2004 ; Zhang *et al.*, 2004), dans les eaux usées (Katsoyiannis *et al.*, 2004), dans les eaux souterraines (Worrall *et al.*, 2004) et dans les eaux de pluie (Haraguchi et al., 1995), ils sont aussi présent dans l'air (Coupe *et al.*, 2000), sur les

particules de l'atmosphère (Scheyer *et al.*, 2005) et dans les aliment (Rastrelli *et al.*, 2002). Une problématique de pollution potentielle a été, alors, soulevée et prend de plus en plus d'ampleur particulièrement concernant la santé humaine.

Pour cela, depuis quelques années, dans les pays développés européens, on assiste à l'émergence d'un mouvement associatif qui remet en cause l'utilisation des pesticides de synthèse, pour les remplacer par des substances biologiques et dégradables.

La base de ce mouvement est fondée sur les risques sanitaires et environnementaux de mieux en mieux connus que représentent ces substances, et sur la disponibilité d'autres alternatives qui permettrait de diminuer considérablement l'utilisation de ces produits (Chomienne *et al.*, 2017). Dans ce contexte, de nombreuses initiatives sont déployées depuis quelques années pour développer des méthodes alternatives à l'utilisation de ces pesticides. Ces méthodes qui ont trait à l'emploi de ce que l'on appelle communément les biopesticides. Ce sont des préparations à base de bactéries, de virus, de protozoaires, de champignons ou de végétaux, qui sont biodégradables, à activité contre des ravageurs spécifiques, et sans effets secondaires sur l'environnement (Rahbani, 2015). Ces derniers, pourraient prendre la relève du «tout chimique», afin de promouvoir la lutte biologique alternative en vue d'une agriculture durable.

Cet intérêt suscité à l'égard des biopesticides, réside dans la réalisation pure et simple qu'un nombre croissant de parasites, deviennent immunisés contre certains pesticides synthétiques courants. Par leur effet létal beaucoup plus sélectif comparé aux produits chimiques synthétiques, la popularité des agents de lutte biologique est en phase exponentielle (Moser et Obrycki, 2009 ; Kristoff *et al.*, 2010 ; Shah et Iqbal 2010 ; Eriksson et Wiktelius, 2011; Stevens *et al.*, 2011). Par voie de conséquence, le marché global des biopesticides ne représentait en l'an 2000 que 1,5 % du total des pesticides alors qu'actuellement, ce marché a atteint 3,46 %. Le monde de la recherche n'est pas resté les bras croisés face à cette évolution; des équipes se sont spécialisées dans la mise au point de pesticides fabriqués à partir d'êtres vivants ou de produits dérivés d'organismes vivants, espérant qu'ils se dégradent vite et bien ! Après leur mission de destruction de l'agent pathogène. Et ça marche, Quoiqu'encore modeste depuis 2008. Le marché des biopesticides en Europe de l'Ouest et en Amérique du Nord progresse en moyenne de 5 à 8 % chaque année.

Fabriqués à partir d'organismes vivants ou de produits dérivés de ceux-ci, les biopesticides sont de plus en plus appelés à compléter, voire à remplacer, les pesticides de synthèse. Certes, ceux-ci ne disparaîtront évidemment pas du jour au lendemain de l'arsenal des cultivateurs. Ils risquent néanmoins de laisser progressivement la place à des produits plus naturels, capables de venir à bout des agents pathogènes - insectes, nématodes, champignons, bactéries... qui, classiquement, font les cheveux blancs des agriculteurs, tout en évitant les effets pervers bien connus. Rémanence dans les sols et les nappes phréatiques, résistance des parasites (forçant à augmenter les doses ou à utiliser sans cesse de nouvelles molécules), problèmes de santé pour les utilisateurs (voire pour les consommateurs finaux) : telles sont les factures écologiques et sanitaires que la société est de moins en moins prête à payer.

Parmi les succès engrangés à ce stade figure l'exploitation des propriétés de certaines souches bactériennes proliférant dans la rhizosphère des plantes, c'est-à-dire la partie du sol directement en contact avec la racine. C'est grâce à ces souches, notamment *Bacillus subtilis* et *Bacillus amyloliquefaciens* (Lord, 2005; Brar *et al.*, 2006 ; Bravo *et al.*, 2011 ; Jisha *et al.*, 2013), qu'on peut déjà trouver dans le commerce des biopesticides capables de réduire l'incidence des pathogènes, soit en les inhibant directement, soit en renforçant le système immunitaire des plantes (via la production d'« éliciteurs »).

Cependant, l'efficacité de ces bacilles est tout sauf constante. Elle peut varier en fonction de facteurs aussi nombreux que la température, l'hygrométrie, la composition du sol et, bien sûr, la nature des plantes à protéger. « *Bacillus* étant un organisme vivant, il subit l'influence de nombreux facteurs environnementaux dont on ne connaît pas nécessairement l'impact » explique Marc Ongena, chercheur qualifié FNRS et spécialiste des biopesticides à Gembloux Agro-Bio Tech (Petit, 2014). Ce n'est pas que cette bactérie meurt, mais toutes les observations empiriques montrent qu'elle perd de son efficacité dans certaines circonstances. Les mécanismes d'action expliquant cette perte d'efficacité peuvent, certes, être mis en évidence par des études physiologiques, mais celles-ci sont longues et complexes ».

Par ailleurs, de nouvelles molécules naturelles ont pu être isolées, et cela à partir de bactéries du genre *Pseudomonas*. « Bien que pour celles-ci nous n'avons pas encore pu atteindre le stade des expérimentations au champ, leur potentiel immunisant ou antagoniste s'avère d'ores et déjà très prometteur », rajoute Marc Ongena. Enfin, les recherches de Ongena *et al.*, (2008) ont permis de mettre au point un bioréacteur expérimental travaillant en cycle continu

et non, classiquement, d'une façon intermittente soit un mode de production tout aussi prometteur dans une perspective industrielle.

L'un des outils permettant la réduction des pesticides à usage agricole et promu aussi bien par le plan Écophyto 2018 que par le PRPB est l'utilisation de produits phytosanitaires d'origine biologique (Deravel *et al.*, 2014).

En France, des mesures sont prises pour encadrer l'utilisation des produits phytosanitaires. Ainsi, le plan « Écophyto 2018 » débattu lors du Grenelle Environnement de 2007, vise à réduire de 50 % la quantité de produits phytosanitaire d'origine chimique d'ici 2018 (<http://agriculture.gouv.fr/ecophyto>).

En Belgique, un Programme de Réduction des Pesticides et Biocides (PRPB) a été établi en 2005. Ce programme couvrait la période allant de 2005 à 2010 et visait à diminuer, pour l'année 2012, de 25 % l'impact des pesticides agricoles sur l'environnement et de 50 % l'impact environnemental des autres pesticides et biocides (Deravel *et al.*, 2014).

Au Canada, le projet PARDE du Ministère du Développement durable, de l'Environnement et des Parcs du Québec (MDDEP) réalisé par l'université de Laval en 2006 qui a pour objectif général de réaliser les étapes requises de recherche et développement devant mener à la mise en marché des biopesticides les plus prometteurs pour les systèmes agricoles du Québec. Plusieurs biopesticides ont été produits à base d'extraits de plante, de bactéries du genre *Bacillus* (Pérez-Garcia *et al.*, 2011), de champignons du genre *Trichoderma* spp (Dodd *et al.*, 2003), d'actinomycètes (*Saccharopolyspora spinosa*).

Dans les pays en voie de développement, l'utilisation des molécules chimiques de synthèse conventionnelles est encore d'une manière intensive et à grande échelle sans le moindre souci pour l'environnement et la santé humaine. En Algérie, la situation est plus accablante puisque le pesticide de synthèse est de plus en plus utilisé sans aucun contrôle ni suivi et en particulier dans les poles agricoles émergents du sud ' Adrar, Hassi R'mel, Tindouf, El Oued spécialisés dans la cultures des produits maraichers (Bouziani, 2007). En outre, avec l'économie de marché actuelle, plusieurs entreprises se sont spécialisées dans l'importation d'insecticides, fongicides et divers produits apparentés. Ainsi, environ 480 produits phytosanitaires sont homologués en Algérie, dont une quarantaine de variétés sont largement utilisées par les agriculteurs. 30 000 tonnes sont «épandues» chaque année (Merhi, 2008).

Les conséquences sanitaires de l'exposition à ces milliers de composants chimiques, par le biais de l'eau et de l'alimentation, sont massives et inquiétantes» (Ramade, 2011). Des études ne cessent de montrer les liens entre pesticides et cancer. Or, dans notre pays, le cancer tue 40.000 personnes, chaque année. Dans ce lot macabre, des milliers d'innocents trouvent la mort pour avoir consommé des produits contenant des pesticides. Des milliers d'autres personnes sont affectées de graves pathologies ». Certains témoignages des agriculteurs sont accablants : « souvent, des traitements sont effectués le soir et les légumes et fruits sont récoltés et emmenés vers le marché le lendemain ».

Pour palier le manque d'analyses en Algérie, une vingtaine de projets de laboratoires seront lancés, cette année. D'autres laboratoires en activité sont appelés à se doter en équipements nécessaires aux analyses permettant de déterminer la teneur des aliments en pesticides. La lutte devrait s'acharner d'autant plus que l'usage des engrais et pesticides n'est pas prêt de s'estamper. Aussi, les scientifiques réclament du ministère de l'Agriculture un plan qui viserait à réduire l'usage des pesticides où une nouvelle législation en la matière serait nécessaire (Kheddam-Benadjal, 2012). Ce travail consiste à entreprendre des recherches dont l'objectif principal étant de lutter contre les organismes fléaux : agents microbiens pathogènes et ravageurs des cultures maraîchères et céréalières (Blé, tomate, pomme de terre, etc.) par des méthodes biologiques. Le but visé est celui de l'utilisation des substances naturelles à partir d'extraits végétaux (biopesticides). Ces produits biopesticides sont dénués ou du moins faiblement toxiques pour l'homme et l'environnement.

C'est donc dans ce contexte que s'insère notre travail qui consiste en l'évaluation de l'effet biopesticide de deux espèces végétales forestières très répandues en Algérie pour leur rôle en sylvo-pastoralisme et réputé pour son utilisation en phytothérapie : *Eucalyptus globulus* et *Eucalyptus camaldulensis*.

Pour ce faire, nous nous sommes posés les questions suivantes pour l'élaboration de notre travail :

- Est-ce que ces deux espèces, pourraient stocker un chémotype riche et constituer un réservoir de métabolites secondaires contenus dans les organes végétatifs de ces plantes.

- Si oui, est-ce que ces produits naturels, pourraient avoir un effet bactéricide ou du moins bactériostatique, pour les agents phytopathogènes nuisibles des cultures (bactéries/champignons).
- Est-ce qu'ils sont dénués de toxicité envers les organismes non cibles et enfin est-ce qu'on peut les considérer comme biopesticides et envisager leur emploi dans la lutte biologique comme alternatives aux produits de synthèse conventionnels (pesticides chimiques)

C'est ce que nous nous efforcerons de confirmer à travers cette étude dans le cadre de la réalisation de cette thèse.

Notre travail est structuré comme suit :

- Une étude phytochimique comprenant l'extraction des polyphénols, la mise en évidence des composés du métabolisme secondaire quantification des composés phénoliques, identification des extraits polyphénoliques par chromatographie sur couche mince (CCM).
- Une Sélection des agents pathogènes fongiques et bactériens responsables des différentes maladies de cultures
- Une étude de l'effet biopesticide (activités antifongique et antibactérienne) des extraits bruts foliaires des deux espèces d'Eucalyptus étudiées
- Une étude de la toxicité des extraits d'Eucalyptus sur des organismes non cibles.

Et présenté sous sa forme : introduction, synthèse bibliographique, matériel et méthodes, résultats et discussion, conclusion générale et perspectives, références bibliographiques

***SYNTHESE
BIBLIOGRAPHIQUE***

SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE

1. Les biopesticides

Le concept de « biopesticide » n'est pas nouveau. Dès le 7^e siècle av. J.-C., des fermiers chinois utilisaient des plantes comme *Illicium lanceolatum* pour protéger leurs cultures contre les insectes (Leng *et al.*, 2011). Ces bioinsecticides peuvent se définir au sens large comme des pesticides d'origine biologique, c'est-à-dire, organismes vivants ou substances d'origine naturelle synthétisée par ces derniers, et plus généralement tout produit de protection des plantes qui n'est pas issu de la chimie. Sous ce vocable, les biopesticides comprennent les agents de contrôle des insectes (auxiliaires) comme les arthropodes entomophages (ex. trichogrammes), les champignons hyphomycètes pathogènes pour les lépidoptères ou coléoptères (ex. *Beauvaria*), les vaculovirus responsables des polyédroses nucléaires (NPV) ou des granuloses (GV) chez les lépidoptères, les bactéries (*Bacillus*)... etc, les insecticides d'origine végétale et les molécules de synthèse biologique (phéromones, molécules allélochimiques). Par contre la majorité des entomologistes exclut systématiquement ces derniers.

De nos jours, plusieurs biopesticides sont commercialisés. Une définition adéquate regroupant les diverses origines de ces produits et retraçant leur histoire s'impose. Ainsi, même s'il n'existe aucune définition officielle, dans le domaine de l'agriculture, les biopesticides pourraient être définis de la manière suivante : « Organismes vivants ou produits issus de ces organismes ayant la particularité de limiter ou de supprimer les ennemis des cultures. » (Thakore, 2006).

Les produits considérés comme des biopesticides par les agences de réglementation européennes et mondiales sont d'origines diverses. Ils peuvent être classés en trois grandes catégories, selon leur nature : les biopesticides microbiens, les biopesticides végétaux et les biopesticides animaux (Chandler *et al.*, 2011 ; Leng *et al.*, 2011).

1.1. Biopesticides d'origine microbienne

Cette catégorie comprend les bactéries, champignons, oomycètes, virus et protozoaires. L'efficacité d'un nombre important d'entre eux repose sur des substances actives dérivées des

micro-organismes. Ce sont, en principe, ces substances actives qui agissent contre le bio-agresseur plutôt que le micro-organisme lui-même.

❖ Les biopesticides à base de souches bactériennes

Les biopesticides, à base de bactéries représentent la majorité des biopesticides microbiens (Shoresh *et al.*, 2010). Le genre *Bacillus* est le genre bactérien le plus étudié dans la recherche scientifique et le plus utilisé en agriculture. En effet, le US Food and Drug Administration (USFDA) a confirmé que toutes les espèces qu'englobe le groupe *Bacillus subtilis* sont non pathogènes à l'homme. En plus, le genre *Bacillus* possède la possibilité de se sporuler dans des conditions défavorables ce qui facilite sa production industrielle et sa formulation en un produit stable (Harwood et Wipat, 1996 ; Lolloo *et al.*, 2010). Par ailleurs, le genre *Bacillus* a la capacité d'échapper au phénomène de résistance des ravageurs car il développe plusieurs mécanismes de biocontrôle, de biofertilisation et de phytostimulation comme la plupart des PGPRs (plant growth promoting rhizobacteria), pour augmenter le rendement des cultures agricoles.

Les biopesticides à base de *Bacillus thuringiensis* sont les plus commercialisés. Ils ont une action insecticide. *Bacillus thuringiensis* est une bactérie à Gram⁻ qui produit, durant sa phase stationnaire de croissance, des protéines cristallines appelées delta-endotoxines ou pro-toxines Cry. Ces protéines sont libérées dans l'environnement après la lyse des parois bactériennes lors de la phase de sporulation et sont actives, une fois ingérées par les ravageurs, contre les lépidoptères, les diptères et les larves de coléoptères (Rosas-Garcia, 2009).

Des espèces bactériennes du genre *Bacillus* utilisant des mécanismes d'action autres que celui employé par *B. thuringiensis* peuvent également protéger les plantes. Il y a, parmi ces espèces, des souches de *Bacillus licheniformis*, *Bacillus amyloliquefaciens* ou *Bacillus subtilis*. *Bacillus amyloliquefaciens* et *B. subtilis* sont capables de coloniser les racines des plantes et de produire des molécules de nature lipopeptidique qui sont les surfactines, les iturines et les fengycines. Ces dernières peuvent soit activer les défenses des plantes, soit avoir un effet antibactérien ou antifongique direct (Pérez-Garcia *et al.*, 2011).

Des bactéries appartenant à d'autres genres que le genre *Bacillus* ont également été développées en tant que biopesticides. Ainsi, la souche *Pseudomonas chlororaphis* MA342 est utilisée dans la prévention et le traitement de certains champignons des graines de céréales

comme *Drechslera teres*, agent de l'helminthosporiose de l'orge (Tombolini *et al.*, 1999). *Pseudomonas chlororaphis* MA342 protège également le blé et le seigle contre la fusariose et la septoriose. Plusieurs modes d'action sont proposés pour justifier son efficacité. Cette bactérie pourrait agir contre les champignons phytopathogènes par antibiose directe, par concurrence spatiale et nutritive ou en activant les défenses des plantes (Boulon, 2010).

❖ Les biopesticide à base de virus

Les Baculoviridae sont des virus à double brins d'ADN circulaire, ayant un génome compris entre 100 et 180 kb, protégés par une paroi protéique (Chen *et al.*, 2002). Ils infectent les arthropodes insectes ou larves. Ils représentent un faible risque sanitaire car aucun virus similaire n'a, à l'heure actuelle, été répertorié dans l'infection des vertébrés ou des plantes. Cette propriété les rend particulièrement intéressants pour une utilisation en qualité de bio-insecticide, d'autant plus qu'ils peuvent tuer leur hôte en quelques jours. Ces virus sont classés en fonction de la morphologie particulière de leur corps d'inclusion. Ainsi, on retrouve les *Granulovirus*, comme *Cydia pomonella granulosis*, inclus dans des granules de forme ovale ou ovoïde et les nucleopolyhedrovirus, comme *Helicoverpa zea* (HzSNPV) et *Spodoptera exigua nucleopolyhedrosis* qui sont inclus dans des polyèdres de forme arrondie, cubique ou hexagonale (Chen *et al.*, 2002). Les nucleopolyhedrovirus infectent les larves de lépidoptères selon un mode atypique. En effet, deux formes virales, génétiquement identiques mais structurellement différentes, sont nécessaires pour avoir un cycle complet d'infection. La forme dite « virion inclus » infecte les cellules de l'intestin moyen après ingestion par l'hôte. Une forme dite « virion bourgeonnant » transmet l'infection de cellule en cellule. Les corps d'inclusions sont composés de protéines cristallines qui protègent les virions des dégradations pouvant être causées par l'environnement, mais sont dissoutes par le pH alcalin de l'estomac des larves. Une fois les protéines cristallines dissoutes, les virions sont libérés. L'infection primaire qui débute dans l'intestin moyen produit les formes bourgeonnantes qui progressent de la membrane basale jusqu'aux tissus de l'hôte. Lors de cette progression, des formes virions bourgeonnants et virions inclus sont produites. La propagation dure environ 4 jours. Les tissus meurent et se liquéfient. Cette liquéfaction, caractéristique des maladies provoquées par une infection aux nucleopolyhedrovirus, libère des millions de formes incluses qui infectent les nouveaux hôtes (Washburn *et al.*, 2003).

❖ Les biopesticides à base de souches fongiques

Outre les bactéries et les virus, certains champignons présentent des activités contre les bio-agresseurs et sont exploités en tant que biopesticides. *Coniothyrium minitans* est connu pour parasiter les champignons du genre *Sclerotinia* spp. Ce genre fongique se retrouve dans le sol et est à l'origine de la maladie appelée pourriture blanche qui peut affecter de nombreuses cultures dont la carotte, le haricot, le colza ou le tournesol. *Coniothyrium minitans* est connu pour pénétrer dans les scléroties de *Sclerotinia sclerotiorum* soit par des craquelures situées à l'extérieur de cette forme de conservation du champignon, soit en s'introduisant par l'écorce extérieure en suivant une voie intercellulaire. Il poursuit ensuite son chemin en intracellulaire en pénétrant le cortex et la médullaire. Le parcours intracellulaire de *C. minitans* est possible car il produit des enzymes de dégradation des parois telles que les chitinases ou les β -1,3 glucanases. En plus de ces enzymes extracellulaires, diverses molécules pouvant intervenir dans les mécanismes d'action contre *Sclerotinia* spp. ont été identifiées dans des cultures de *C. minitans*. Parmi ces molécules, il y a des 3(2H)-benzofuranones, des chromanes, des métabolites antifongiques ainsi que la macrosphelide A connue pour inhiber l'adhésion des cellules de mammifères et qui, à de faibles concentrations, inhibe la croissance de *Sclerotinia sclerotiorum* et de *Sclerotinia cepivorum* (McQuilken *et al.*, 2003).

Plusieurs souches du champignon filamenteux du genre *Trichoderma* spp. sont utilisées pour la protection biologique des plantes. Elles ont généralement une activité antifongique contre plusieurs pathogènes du sol ou contre des pathogènes foliaires (Dodd *et al.*, 2003). *Trichoderma atroviride* est notamment utilisée pour la protection biologique de la vigne (Longa *et al.*, 2009). L'activité de bio-contrôle de cette souche est attribuée à plusieurs mécanismes d'action qui agissent en synergie. Parmi ces mécanismes d'action, il y a la compétition pour les nutriments, l'antibiose, ou la production d'enzymes spécifiques de dégradation des parois cellulaires comme les chitinases ou protéases (Brunner *et al.*, 2005).

En provoquant des pertes totales de cultures estimées à près de 10 %, les nématodes du genre *Meloidogyne* spp. sont les plus destructeurs au monde (Anastasiadis *et al.*, 2008). Les nématicides chimiques les plus efficaces contre eux ont été progressivement retirés du marché à cause de leur impact sur l'environnement (Anastasiadis *et al.*, 2008). Le champignon *Paecilomyces lilacinus* est l'un des produits alternatifs les plus étudiés dans la lutte biologique

contre ces nématodes. Il a la capacité d'infester plusieurs phases de développement du parasite. Il est particulièrement connu pour avoir des propriétés ovicides. *Paecilomyces lilacinus* pénètre dans les oeufs de nématodes en sécrétant des chitinases et protéases (Dong *et al.*, 2007). Il peut également infester les nodules racinaires où se trouvent ces oeufs. Les hyphes fongiques déjà formées peuvent s'introduire dans les nématodes adultes *via* leurs orifices naturels. Dans tous les cas d'infestation, *Paecilomyces lilacinus* se nourrit des tissus des nématodes pour pouvoir se développer (www.prophyta.de/fr/protection-des-plantes/anti-nematicide/mode-operatoire/).

1.2. Biopesticides animaux

Ces biopesticides sont des animaux comme les prédateurs ou les parasites, ou des molécules dérivées d'animaux, souvent d'invertébrés comme les venins d'araignées, de scorpions, des hormones d'insectes, des phéromones (Goettel *et al.*, 2001 ; Saidenberg *et al.*, 2009 ; Aquiloni *et al.*, 2010).

La coccinelle est l'insecte auxiliaire le plus connu. La coccinelle *Rodolia cardinalis* prélevée en Australie est couramment utilisée comme prédateur de la cochenille *Icerya purchasi*. Même si elle a été introduite dès le 19^e siècle en Californie pour enrayer la destruction des agrumes, les îles Galápagos n'ont autorisé son introduction qu'en 2002 (Calderón Alvarez *et al.*, 2012). Les effets des biopesticides d'origine animale et plus particulièrement des insectes auxiliaires sur la faune locale sont minutieusement étudiés avant leur utilisation.

Comme les coccinelles, les acariens utilisent la prédation pour se nourrir de certains insectes ravageurs des plantes. C'est l'activité parasitique des nématodes comme *Phasmarhabditis hermaphrodita* qui est utilisée pour la lutte contre les limaces et les gastéropodes en général. Les nématodes juvéniles de troisième stade de *P. hermaphrodita* vont initier l'infection en pénétrant par les cavités des coquilles sous le manteau de leur hôte. Après cette pénétration, les nématodes juvéniles vont transmettre leurs bactéries associées qui vont se multiplier et libérer des endotoxines qui provoqueront la mort des gastéropodes entre 4 et 7 jours. Les nématodes juvéniles vont acquérir leur forme hermaphrodite dans cette cavité et s'y reproduire. Ils continueront à se développer jusqu'à ce que tout le corps du gastéropode soit consommé et que la prochaine génération de nématodes trouve de nouveaux hôtes à parasiter (Grewal *et al.*, 2003).

Les biopesticides d'origine animale qui sont des signaux chimiques produits par un organisme et qui changent le comportement d'individus de la même espèce ou d'espèces différentes sont également répertoriés sous l'appellation « semio-chimiques ». Les semio-chimiques ne sont pas à proprement parler des « pesticides ». En effet, ils ne vont pas provoquer la mort des bio-agresseurs, mais plutôt créer une confusion chez ces derniers. Cette confusion les empêchera de se propager dans la zone traitée. Les phéromones d'insectes sont de bons exemples de molécules semio-chimiques utilisées comme alternative à l'utilisation des insecticides. Il s'agit de petites molécules naturellement produites par les insectes et qui sont détectées au niveau des antennes de leurs congénères. Ces molécules peuvent être éphémères ou persistantes, mais dans tous les cas véhiculent un message. Elles peuvent marquer un territoire, prévenir de la disponibilité de nourriture ou être un signal pour l'accouplement. Les phéromones d'insectes sont largement utilisées aussi bien pour limiter les insectes ravageurs *via* des techniques de piégeage ou de confusion sexuelle que pour surveiller leur nombre.

1.3. Biopesticides végétaux

Les biopesticides végétaux constituent l'objectif principal de recherche de cette thèse, ils représentent une des alternatives à la dépendance aux pesticides chimiques. Même si, employés seuls, ils sont généralement moins efficaces à court terme que leurs homologues chimiques, ils présentent de nombreux avantages écologiques qui ne peuvent pas être ignorés. Utilisés dans une stratégie de lutte intégrée en combinaison avec les pesticides chimiques, ils permettent de limiter la quantité d'intrants ainsi que l'apparition de nuisibles résistants.

L'institut technique des filières plantes aromatiques, médicinales et à parfum (Ppam) estime qu'avec la disparition de certaines substances actives de synthèse ces dernières années et le durcissement de la réglementation incite à développer l'utilisation des méthodes alternatives à la lutte chimique. Dans ce contexte, l'utilisation des extraits végétaux en protection des cultures est une solution qui regagne de l'intérêt.

Le biopesticide d'origine végétale le plus utilisé est l'huile de neem, un insecticide extrait des graines d'*Azadirachta indica* (Schmutterer, 1990). Plusieurs molécules dont l'azadirachtine, la nimbidine, la nimbidine, la solanine, le décétylazadirachtinol et le méliantriol ont été identifiées comme biologiquement actives dans l'huile extraite des graines de neem. L'azadirachtine, un mélange de sept isomères de tétranortritarpinoïde, est le principal ingrédient

actif de cette huile et a la propriété de perturber la morphogénèse et le développement embryonnaire des insectes (Srivastava *et al.*, 2007 ; Correia *et al.*, 2013).

D'autres extraits de plantes ont des activités insecticides; ainsi, *Tanacetum (Chrysanthemum cinerariaefolium)*, plus communément appelé pyrèthre, est une plante herbacée vivace cultivée pour ses fleurs dont une poudre insecticide est extraite. Ses principes actifs, appelés pyréthrinés, attaquent le système nerveux de tous les insectes. Cependant, ces molécules naturelles sont rapidement dégradées par la lumière. Il y a sur le marché des pyréthrinoïdes de synthèse qui sont beaucoup plus stables que leurs homologues naturels. *Quassia amara* est un arbre d'Amérique dont est extraite la quassine, un insecticide qui a montré une faible toxicité pour l'Homme, les animaux domestiques et les insectes utiles.

Certaines huiles végétales, qui n'ont pas d'activité antiparasitaire intrinsèque, peuvent être retrouvées sur le marché en tant que biopesticide. Dans ce cas, ce sont leurs propriétés physiques qui sont exploitées. Ainsi, l'huile de colza est l'ingrédient principal de quelques produits comme le VegOil® car, aspergée sur les feuilles et les ravageurs, elle forme un film huileux qui asphyxie ces derniers.

Les plantes à pesticides intégrés (*Plant Incorporated-Protectants*, PIPs) sont des organismes modifiés par génie génétique, capables de produire et d'utiliser des substances pesticides afin de se protéger contre des insectes, des virus ou des champignons. Les PIPs les plus connues sont des plants de pommes de terre, maïs et coton ayant la particularité de produire la protéine Cry de *B. thuringiensis*. Pour l'agence américaine de protection de l'environnement (*United States, Environmental Protection Agency, US.EPA*), les PIPs sont une catégorie de biopesticides. Les premières PIPs ont été cultivées aux États-Unis d'Amérique en 1995/1996. Les surfaces agricoles mondiales cultivées en PIPs sont passées de 11,4 millions d'hectares en 2000 à plus de 80 millions en 2005 (Shelton *et al.*, 2002 ; Bates *et al.*, 2005). Certains pays de l'Union européenne émettent des réticences quant à leur utilisation. En effet, pour des raisons qualifiées d'éthique, morale et des réserves sur leur sûreté biologique, seuls 5 des 27 pays membres de l'Union européenne ont adopté leur utilisation (Kumar *et al.*, 2008). Ainsi, le maïs Bt (*Bacillus thuringiensis*) est couramment cultivé en Espagne, Portugal, Roumanie, Pologne et Slovaquie, alors que la lignée de maïs Bt MON810 est formellement interdite dans certains pays comme la France, l'Autriche, l'Allemagne, la Grèce, le Luxembourg et la Hongrie (Meissle *et al.*, 2011).

Bien qu'étant des produits naturels et classés parmi les produits de biocontrôle, les extraits végétaux sont soumis à la même réglementation que les substances actives conventionnelles pour pouvoir être utilisés en protection des cultures : autorisation européenne pour la substance active puis française pour le produit en tant que tel. Depuis 2014, trois substances de base ont été approuvées dont une seule concerne un extrait de plante, la prêle. Contrairement aux produits phytosanitaires classiques, la difficulté est de formuler un produit de qualité constante et uniforme, avec une teneur stable en substances actives. Pour les mêmes raisons, l'identification du mode d'action se révèle compliquée.

Jusqu'en 2011, il n'existait qu'une seule catégorie pour l'autorisation des extraits végétaux : substance active classique. Les deux nouvelles catégories (substances à faible risque et substances de base) devraient permettre de faciliter l'opération. .

De nombreux travaux sont en cours pour permettre l'utilisation d'extraits végétaux en protection des plantes. En octobre 2013, un brevet a été déposé par des chercheurs et universités espagnols portant sur le procédé de production organique d'un biopesticide. Cette méthode de production contrôlée assure une standardisation chimique et biologique des extraits obtenus. Les nouvelles réglementations européennes et françaises et les recherches en cours devraient contribuer au développement et à l'utilisation d'un plus grand nombre d'extraits végétaux en protection des cultures dans les années à venir.

Les plantes produisent des substances actives ayant des propriétés insecticides, aseptiques ou encore régulatrices de la croissance des plantes et des insectes. Le plus souvent, ces substances actives sont des métabolites secondaires qui, à l'origine, protègent les végétaux contre les ravageurs.

Effets sur les agents pathogènes

Les extraits végétaux, actifs contre les agents pathogènes des cultures, appartiennent aux mêmes familles que ceux ayant une activité herbicide et insecticide. La société Marrone Bio innovations a par exemple développé une solution à base de renouée du Japon (substance active de la famille des anthraquinones) : le Regalia. Ce produit agirait comme stimulateur des défenses naturelles efficace contre les rouilles, oïdium, botrytis, mildiou, maladies des taches foliaires et bactéries.

Effets sur les insectes, les adventices...

Plusieurs sont connus pour contrôler ou limiter les attaques d'insectes en agissant sur leur physiologie. Certains sont des molécules ayant une action sur les hormones juvéniles ou de mues des insectes perturbant ainsi leur développement. Les toxines végétales ont également un effet nocif. Plusieurs familles appartiennent à cette catégorie : les terpénoïdes (limonoïdes, cardénolides et pyrèthrine), les alcaloïdes à l'action neurotoxique, mais également les composés phénoliques caractérisés par une action anti-appétante et un effet sur la croissance.

L'allélopathie semble une piste intéressante dans la lutte contre les adventices. Ce phénomène se traduit par l'émission de substances nocives par les racines, généralement des métabolites secondaires, empêchant la pousse d'autres espèces à proximité. Parmi les substances chimiques connues pour provoquer ce type d'interaction, l'iteipmai cite la leptospermone de la famille des tricétones (eucalyptus) utilisée comme modèle par Syngenta pour développer des molécules de formule chimique proche (sulcotrione et mésotrione). La juglone, une quinone toxique pour les plantes herbacées et ligneuses, se trouve dans le noyer. Certains dérivés phénoliques, glucosinolates (brassicacées et capucine) et thiosulfonates (alliées) présentent aussi une activité herbicide.

1.4. Les avantages des biopesticides

Les biopesticides offrent de nombreux avantages qui sont comme suit.

- Restreindre ou éliminer l'utilisation d'insecticides chimiques
- Moins toxique que les pesticides chimiques
- Favoriser lors d'une utilisation en serre (culture sericole de haute valeur économique)
- Diminuer les risques de développer de la résistance
- Favoriser par le nombre restreint d'insecticides homologués en serre
- Plus grande spécificité d'action
- Améliorer la qualité de vie des travailleurs agricoles

- Prévoir aucun délai avant la récolte
- Offrir aux consommateurs des produits sains
- Avoir une meilleure presse auprès des consommateurs
- Dégradation rapide des biopesticides, diminuant les risques de pollution
- Maintenir la biodiversité des biotopes.

Leur nature permet leur utilisation aussi bien en agriculture biologique qu'en agriculture conventionnelle. Il est cependant à noter que, dans certains pays, la réglementation en vigueur ne permet pas l'utilisation en agriculture biologique de tous les biopesticides commercialisés sur leur territoire. Si la substance active de ces produits ne pose pas de problème réglementaire, leurs co-formulants peuvent ne pas être compatibles avec ce type d'agriculture. Ainsi, il est recommandé aux agriculteurs biologiques de consulter les listes de produits commerciaux à base de biopesticides autorisés par leur organisme certificateur avant toute utilisation. De même, en tant qu'organismes génétiquement modifiés, les PIPs ne sont pas utilisés en agriculture biologique.

Certains biopesticides microbiens présentent des bénéfices supplémentaires à leur rôle de protection. Les champignons du genre *Trichoderma* ont la particularité de faciliter l'absorption d'éléments nutritifs du sol par les plantes (Harman, 2011). De même, il a été récemment mis en évidence que certains micro-organismes endophytes et/ou certaines rhizobactéries favorisant la croissance des plantes (*Plant Growth Promoting Rhizobacteria* ou PGPR) peuvent conférer à certaines cultures une tolérance aux stress abiotiques comme la sécheresse (Compant *et al.*, 2010 ; Wang *et al.*, 2012). La plupart des bactéries commercialisées en tant que biopesticides font partie du groupe des PGPR, comme *Bacillus subtilis* et sont connues pour leur capacité à favoriser la croissance des plantes. Dans certains produits commercialisés, les molécules bioactives emploient plusieurs modes d'action, ce qui les rend particulièrement intéressantes pour limiter l'apparition de bio-agresseurs résistants. Ainsi, les lipopeptides cycliques produits par les bactéries du genre *Bacillus* peuvent, à la fois, faciliter la colonisation de l'environnement par le micro-organisme producteur (surfactines et iturines), avoir une activité antifongique directe (iturines et fengycines) et induire les mécanismes de défense des plantes (surfactines, fengycines) (Ongena *et al.*, 2008).

Dans la quête de nouveaux bio-insecticides, une attention particulière est portée aux venins d'araignées depuis ces 10 dernières années. En effet, ceux-ci sont composés de centaines de toxines et substances actives qui vont affecter le système nerveux des insectes afin de les paralyser pour ensuite provoquer leur mort. Ils ne sont pas seulement actifs après une morsure, mais le sont également après ingestion, ce qui les rend particulièrement intéressants. Les différentes substances de ces venins ont plusieurs cibles. Ils peuvent aussi bien modifier la conductance de plusieurs canaux ioniques (calcique, potassique, sodium), perturber la disposition des doubles couches lipidiques, agir au niveau de la terminaison des nerfs pré-synaptiques que des récepteurs N-méthyl-D-aspartate. Les multiples cibles des venins vont limiter l'apparition d'insectes résistants. À l'opposé, on retrouve les insecticides conventionnels qui sont formulés pour agir avec l'une de leur cinq cibles principales qui sont les canaux sodium voltage dépendant, les récepteurs acides gamma aminobutyrique (GABA), glutamate, nicotinique acétylcholine et récepteurs acétylcholinestérase. L'utilisation d'une seule cible par les insecticides conventionnels va engendrer des résistances chez les insectes qui pourront soit augmenter leurs métabolites de détoxification, diminuer la sensibilité des cibles et/ou augmenter la séquestration et la biodisponibilité des cibles (Windley *et al.*, 2012).

Des biopesticides, comme les pyrèthres, insecticides extraits de la plante *Tanacetum (Chrysanthemum) cinerariaefolium* ont une action rapide, une faible toxicité contre les mammifères ainsi qu'une faible persistance après leur application (Silverio *et al.*, 2009).

1.5. Les inconvénients des biopesticides

Certains des avantages écologiques des biopesticides, comme leur faible rémanence ou le fait qu'un produit soit actif contre un faible spectre de nuisibles, peuvent être considérés comme des inconvénients. En effet, ces deux avantages écologiques combinés à leur activité souvent dépendante des conditions climatiques et environnementales rendent les biopesticides moins efficaces que leurs homologues chimiques. Certains professionnels de l'agriculture estiment que les biopesticides ne leur conviennent pas car ils ne sont pas assez efficaces. Ces derniers évaluent les résultats du biopesticide à court terme, comme s'il s'agissait d'un substitut aux produits phytosanitaires chimiques. Cependant, la mise en place et l'efficacité d'un contrôle biologique doivent être évaluées sur la durée (Popp *et al.*, 2013).

2. L'Eucalyptus

Les Eucalyptus sont pour la plupart de très grands arbres qui font partie de la famille des Myrtacées. On dénombre aujourd'hui plus de 500 espèces différentes d'Eucalyptus. Ils sont originaires d'Australie mais on en retrouve également en Amérique du sud, en Afrique et en Europe, où ils ont appris à s'acclimater.

Le terme Eucalyptus a été utilisé pour la première fois en 1777 par un botaniste français, Charles-Louis L'Héritier de Brutelle. Il a inventé ce nom à partir du grec « eu » qui signifie « bien » et « calyptos » qui signifie « couvert » en référence à l'opercule qui se trouve sur le fruit des Eucalyptus, les capsules. C'est d'ailleurs une caractéristique commune à tous les Eucalyptus.

De nombreux botanistes ont essayé de créer des classifications du genre Eucalyptus : la première était la classification de Mueller qui se basait sur les différents types d'écorces. Bentham s'est concentré sur les caractéristiques des étamines et en particulier des anthères. Mueller a, par la suite, créé lui-aussi une classification sur les anthères, puis il a été suivi de Maiden et Blakely mais cette classification a vite connu ses limites. De nombreuses classifications ont vu le jour en fonction des nervures des feuilles, de la morphologie des graines, de la nature de la capsule et de la structure de l'inflorescence.

Une classification complète, mais informelle, de toutes les espèces d'eucalyptus connues a été publiée en 1971 par Pryor et Johnson. Elle comprend sept grands groupes basés sur l'association de plusieurs caractères morphologiques et suggérées par l'incompatibilité de reproduction entre eux. Leur système a été soumis à un examen minutieux au cours des 30 dernières années. De nombreuses améliorations de cette classification ont été proposées par Johnson lui-même et par d'autres, même s'il n'a jamais officiellement publié un système de classification.

Dans le volume 19 de « Flora of Australia », publié en 1988, tous les eucalyptus ont été groupés en 513 espèces par Chippendale. En 1995, Hill et Johnson ont pour la première fois décrit le genre *Corymbia*. En 2000, M.H. Brooker a publié une classification officielle du genre, basée sur le travail de Pryor et Johnson (<https://www.anbg.gov.au/cpbr/cdkeys/euclid3/euclidsample/html/learn.htm>).

2.1. Description de l'ordre Myrtale

L'ordre myrtale, aujourd'hui isolé des vraies ROSIDES, présente un certain nombre de spécificités. Ce sont des plantes essentiellement ligneuses (mais il y a quelques herbacées) dont les tiges possèdent un liber ou phloème interne, des feuilles simples souvent opposées, des organes myrmécophiles extra-floraux (Reichenbach, 1828) livre Botanique systématique et appliquée des plantes à fleurs. Cet ordre ressemble plus de 9 000 espèces rassemblées en 13 familles, dont les principales sont les Myrtacées à feuilles perpendiculaires aux principales qui sont convergentes. Les fleurs des Myrtacées ont une odeur suave et sont visitées par divers insectes, oiseaux ou mammifères, certaines feuilles sont recouvertes de cire. Beaucoup de plantes de cette famille sont utiles dans divers domaines: comme bois d'œuvre, certains fruits sont comestibles, certaines plantes sont aromatiques, avec une abondance en huile essentielle d'où l'usage culinaire ou médicinal. (Huq et Misra, 1997).

2.2. Description de la famille des Myrtacées

Les Myrtacées sont une famille de plantes dicotylédones, l'aspect général des plantes de cette famille va du petit arbuste à l'arbre de très grande taille (jusqu'à 120 mètres de haut pour certains Eucalyptus). Souvent producteurs d'huiles aromatiques des zones tempérées, subtropicales à tropicales, poussant principalement en Australie, en Amérique tropicale, région méditerranéenne, l'Afrique subsaharienne, Madagascar, tropicales et tempérées d'Asie, et les îles du Pacifique. Dans cette famille, on peut citer les genres : Eucalyptus globulus et l'eucalyptus Camaldulensis. (Bruneton, 1999).

La famille des Myrtacées possède environ 140 genres et 3000 espèces qu'on retrouve surtout dans les pays chauds. Ce sont des végétaux ligneux. Les feuilles, des myrtacées, ont une curieuse caractéristique: sur les jeunes arbres, elles sont opposées, sessiles, ovales, et quand l'arbre grandit, elles deviennent alternes, pétiolées, très allongées, (certaines feuilles sont recouvertes de cire), les fleurs sont actinomorphes, elles sont généralement hermaphrodites, axillaires ou terminales à nervation pennée. Les étamines sont plus remarquables que les pétales, donnant à l'inflorescence un aspect de «Goupillon», les ovules sont anatropes. Le fruit est une baie surmontée d'un calice ou une capsule, la graine est exalbuminée, les ovules sont anatropes. Chimiquement cette famille est riche en composé phénoliques et en

tannins. Elle est aussi reconnue comme une des principales familles qui produit des Flavonoïdes C-méthylés; (Huq et Misra, 1997).

2.3. Description du genre *Eucalyptus*

Environ entre 550 et 700 espèces décrites. Arbres ou arbustes parfois bas, à croissance le plus souvent rapide, originaires presque exclusivement d'Australie avec quelques espèces en Malaisie et en Nouvelle Guinée. Sempervirents ils sont surtout connus pour leurs feuilles aromatiques. Toutes les espèces le sont à des degrés plus ou moins importants. Souvent, le feuillage juvénile est différent de celui de la plante adulte. Toutes les espèces ont une floraison abondante au bout de 4-8 ans après le semis mais certaines espèces sont franchement exceptionnelle dans ce domaine.

Depuis 1995 le genre est désormais divisé en 2 sous-genres depuis que le sous-genre *Corymbia* a été élevé au rang de genre. Plusieurs classifications ont vu le jour et on trouve encore très souvent un système basé sur les écorces qui est à l'origine de divers noms vernaculaires australiens. Ce dernier distingue notamment :

- Les "gums" (gomiers à écorce lisse et caduque
- Les "boxes" à écorce rugueuse et fibreuse
- Les "peppermints" à écorce finement fibreuse
- Les "stringybarks" à longue écorce fibreuse
- Les "ironbark" à écorce dure (comme du fer), fissurée et souvent sombre.

Beaucoup d'idées reçues circulent sur les eucalyptus mais hélas beaucoup sont fausses. D'abord ils aiment des sols fertiles, bien drainés tout en étant frais en été (au moins en profondeur), certaines espèces recherchant même l'humidité. Ensuite beaucoup d'espèces supportent de fortes gelées et bien que les limites soient encore mal connues, on peut estimer que près de 100 espèces sont rustiques entre -7°C et -18°C contrairement au genre *Corymbia* qui compte peu d'espèce rustiques.

La majorité possède dans leur pays une adaptation au feu qui devient une adaptation au gel : les bourgeons cotylédonaire se transforment en un renflement ligneux au niveau du sol. Ainsi lorsque le gel est trop sévère il suffit de protéger la base du tronc pour éviter la mort de

l'arbre. Certaines espèces tropicales peuvent ainsi être cultivées en enterrant la souche et produire chaque année des rameaux sur plus de 1,50 m de haut (Urban, 2012).

2.4. Description des espèces végétales d'*Eucalyptus globulus* et d'*Eucalyptus camaldulensis*

Classification d'*Eucalyptus* L (Cronquist, 1981)

- Règne : Plantae
- Sous-règne : Viridiplantae
- Division : Magnoliophyta
- Classe : Magnoliopsida
- Sous-classe : Rosidées
- Ordre : Myrtales
- Famille : Myrtacées
- Genre : *Eucalyptus*

➤ *Eucalyptus globulus*

Eucalyptus globulus Grand arbre ornemental hétérophylle poussant rapidement pouvant atteindre 60 mètre hauteur à tronc lisse les feuilles polymorphe, large et opposées sur les plantes juvéniles âgées sont alternes et falciformes à pétiole tordu et orientées verticalement en raison de leur deux faces semblables (Marburg, 1999) L'eucalyptus est un arbre originaire d'Australie où il compose plus de 90% des forêts naturelles le genre est très vaste puisque on dénombre près de 700 espèces (Anonyme, 2003).



Figure 1. *Eucalyptus globulus* (Photo personnelle).

➤ *Eucalyptus camaldulensis*

Le gommier rouge de rivière ou *Eucalyptus camaldulensis* est largement répandu le long des rivières et des vallées du sud-est de l'Australie. Il est également très représenté sur tout le territoire Australien. C'est un eucalyptus très tolérant au stress salin et à la sécheresse, mais sa tolérance au froid dépend des provenances.

Les provenances du sud de l'Australie peuvent tolérer des gels jusqu'à -8°C et sont plus tolérantes que les provenances du nord du pays les arbres ont le plus souvent une taille moyenne, mais il existe de grands arbres chez cette espèce. Les capsules florales sont insérées

à l'aisselle des feuilles, au nombre de 7 à 11 ou Plus (Brooker et Kleinig, 1996). Sa culture est très répandue en raison de sa croissance rapide et sa tolérance pour les Milieux salés. Il est utilisé principalement pour le bois d'œuvre et son ombrage.



Figure 2. *Eucalyptus camaldulensis* (Photo personnelle).

2.5. Les différentes biomolécules contenues dans le genre *Eucalyptus*

Certaines substances naturelles peuvent être utilisées comme produit de biocontrôle. Ce sont des substances présentes dans le milieu naturel et pouvant être d'origine végétale, animale ou minérale. Ces substances peuvent se substituer à des pesticides de synthèse et ainsi limiter leur utilisation. Elles présentent en effet dans la plupart des cas un avantage en matière de

durée de demi-vie assez courte ce qui limite les résidus dans les denrées alimentaires et leur persistance dans l'environnement. Leur utilisation est de plus intéressante dans le cadre de la gestion des résistances car leurs modes d'action sont généralement différents de ceux des pesticides de synthèse. Il est cependant souvent conseillé de les utiliser en combinaison avec d'autres méthodes alternatives (préventives ou curatives).

Certaines de ces substances ont des effets de stimulation des défenses des plantes. Ces substances peuvent agir de différentes manières :

- biochimique : en bloquant un processus vital pour le bio-agresseur (activité insecticide, molluscicide ou herbicide) ou en stimulant les défenses de la plante ;
- physique : en exerçant un effet répulsif ou en créant une barrière.

2.5.1. Les Polyphénols

Les polyphénols ou composés phénoliques forment une grande classe de produits chimiques qui on trouve dans les plantes au niveau des tissus superficielles, ils sont des composés photochimiques polyhydroxylés et comprenant au moins un noyau aromatique à 6 carbones. Ils subdivisent en sous classe principales; les acides phénols, les flavonoïdes, les lignines, les tanins... (Sarni-Manchado et Cheynier, 2006). Comme ces molécules constituent la base des principes actifs que l'on trouve chez les plantes, elles ont un rôle principale à la vie de plante, à la défense contre les pathogènes; principalement les moisissures et les bactéries phytopathogènes et la protection contre les rayonnements UV; sachant que tous les composés phénoliques absorbent les rayonnements solaires (Sarni-Manchado et Cheynier, 2006).

Les acides phénoliques

Les phénols ou les acides phénoliques sont des petites molécules constituées d'un noyau benzénique et au moins d'un groupe hydroxyle, elles peuvent être estérifiées, étherifiées et liées à des sucres sous forme d'hétérosides, ces phénols sont solubles dans les solvants polaires, leur biosynthèse dérive de l'acide benzoïque et de l'acide cinnamique (Wichtl et Anton, 2009). Les phénols possèdent des activités anti-inflammatoires, antiseptiques et analgésiques (médicament d'aspirine dérivée de l'acide salicylique) (Iserin *et al.*, 2001).

2.5.2. Les tannins

Le terme « Tannin » décrit en général un groupe de composés phénoliques polymériques capables de tanner le cuir ou de précipiter la gélatine (Cowan, 1999). Plusieurs activités Tannins (Haslani 1996). Les tannins possèderaient une activité toxique contre les Champignons Filamenteux, les Levures et les bactéries (Scalbert, 1991). Souza *et al.*, (2008) ont montré que les tannins isolés de l'écorce de *Mimosa tenuiflora* seraient responsables de l'activité de cette plante contre les dermatophytes *Microsporium canis*, *Microsporium gypseum*, *Trichophyton mentagrophytes* et *Trichophyton rubrum*. L'activité antimicrobienne des tannins serait due à leur capacité à se complexer aux protéines de transport (Stern *et al.*, 1996).

2.5.3. Les flavonoïdes

Les flavonoïdes sont des composés phénoliques qui possèdent une unité C6-C3 liée à un noyau aromatique (Zhang et Björn, 2009). Étant donné que les flavonoïdes sont synthétisés par les plantes suite à une infection microbienne, il n'est donc pas surprenant qu'ils possèdent des propriétés antimicrobiennes (Cowan, 1999). La catéchine, flavonoïde isolée du thé vert, est douée de propriétés antimicrobiennes (Cowan, 1999). Prasad *et al.*, (2004) ont décrit la 4'-méthoxyflavone extraite de *Psoralea corylifolia* comme possédant des propriétés antidermatophytiques contre *Trichophyton mentagrophytes*, *T. rubrum*, *Microsporium gypseum* et *Epidermophyton floccosum*. Leur activité est probablement due à leur capacité de se complexer aux protéines extracellulaires et solubles. Mais, les flavonoïdes à caractère lipophile peuvent détruire les membranes microbiennes en augmentant la fluidité des lipides membranaires (Prasad *et al.*, 2004).

2.5.4. Les coumarines

Les coumarines sont des composés phénoliques constitués d'un benzène et des noyaux à-pyrènes (Cowan, 1999). Les coumarines possèdent des propriétés physiologiques et antimicrobiennes (Fernandez *et al.*, 1996). La warfarine est une coumarine utilisée comme anticoagulant qui possèderait également des propriétés antivirales (Cowan, 1999). De même, les coumarines présentes dans la plante *Galium odoratum*, seraient responsables de l'activité antibactérienne et antifongique de cette plante (Hambeuger et Hostettmann, 1991).

2.5.5. Les terpènes et les terpénoïdes

Les terpènes constituent un groupe de composés dont la structure de base est une unité isoprénique. Lorsque le composé contient un autre élément (généralement l'oxygène), on parle de terpénoïde. Les terpénoïdes sont connus comme doués de propriétés antifongiques (Rana *et al.*, 1997) et antibactériennes (Amaral *et al.*, 1998). A titre illustratif, la buteline et l'acide 12-oxohardwickique isolés de l'écorce de *Croton macrostachys*, ont montré des activités antifongiques et antibactériennes (Tene *et al.*, 2009). Le mécanisme des terpénoïdes n'est pas bien connu mais, il pourrait induire une destruction de la membrane du microorganisme par une action lipophile (Cowan, 1999). Les terpénoïdes sont les plus représentés dans la constitution chimique des huiles essentielles (Brunetton, 1999).

2.5.6. Les huiles essentielles

Ce sont des molécules à noyau aromatique et caractère volatil offrant à la plante une odeur caractéristique et on les trouve dans les organes sécréteurs (Iserin *et al.*, 2001). Jouent un rôle de protection des plantes contre un excès de lumière et attirer les insectes pollinisateurs (Dunstan *et al.*, 2013). Ils sont utilisés pour soigner des maladies inflammatoires telles que les allergies, eczéma, favorise l'expulsion des gaz intestinales comme les fleurs fraîches ou séchées de plante "camomille" (Iserin *et al.*, 2001).

2.5.7. Les saponines

Les saponines sont des métabolites secondaires constitués d'un noyau glucidique attaché à un aglycone. Suivant la structure de l'aglycone, on distingue deux types de saponines : le type triterpénoïde tétracyclique et le type triterpénoïde pentacyclique. Les saponines sont présentes dans plusieurs espèces végétales et sont doués de propriétés antimicrobiennes. A titre illustratif, on peut citer les saponines contenues dans les racines du ginseng (*Panax notoginseng*) actifs contre les espèces de *Trichophyton* (Cowan, 1999). De même, le 3-O-(4-O-acetyl- β -D-xylopyranosyl)-(1 \rightarrow 3)- α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- α -L-arabinopyranoside, saponine isolé de la fraction hydroalcoolique du péricarpe de *Sapindus saponaria* possède une activité antifongique importante contre *Candida parapsilosis* (Tsuzuki *et al.*, 2007).

MATERIEL ET METHODES

MATERIEL ET METHODES

1. Présentation du matériel végétal

1.1. *Eucalyptus globulus* et *Eucalyptus camaldulensis*

Ce travail est effectué sur les feuilles d'*Eucalyptus globulus* et *Eucalyptus camaldulensis*, dont la description, la classification et les caractéristiques de ces espèces sont présentés précédemment.

Les espèces végétales d'*Eucalyptus* qui ont servi à l'isolement des extraits foliaires bruts naturels étudiées proviennent de la forêt de Bougantas qui est une extension des monts de l'Edough, située entre la commune d'El Bouni et de Annaba, sa superficie est aux alentours de 4000 ha, mais au niveau de Annaba où les prélèvements ont été effectués, elle est aux alentours de 500 ha. C'est une forêt riche en faune et en flore, les espèces dominantes sont le Chêne liège et l'*Eucalyptus* avec leur cortège floristique, les animaux qu'elle abrite sont, sanglier, chacal, genette, mangouste... etc.

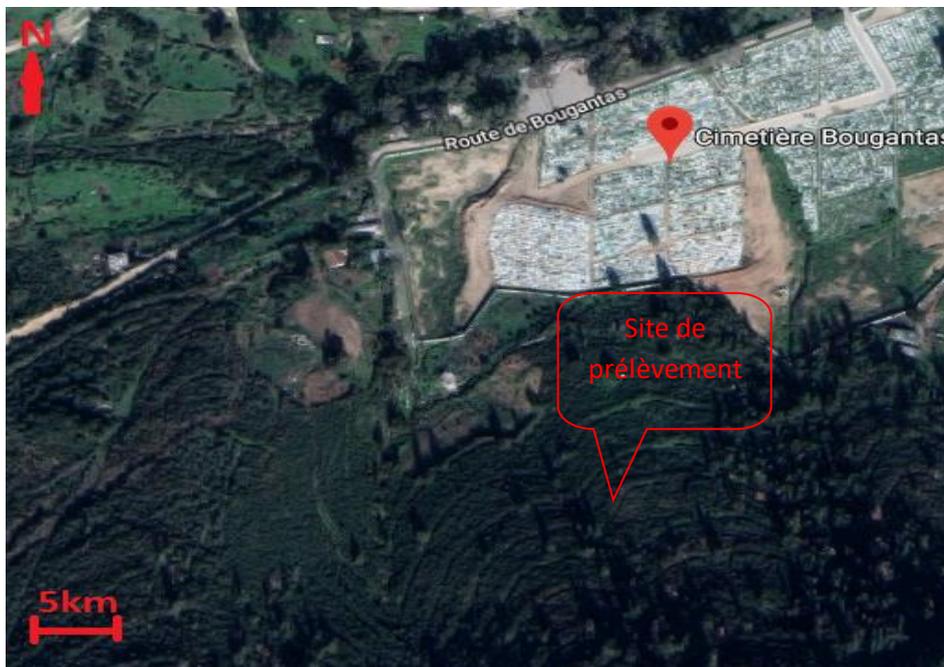


Figure 3. Carte de localisation de la forêt de Bougantas, site de prélèvement d'*Eucalyptus globulus* et *Eucalyptus camaldulensis* (www.google.com/maps)

1.2. Pesticides naturels : extraits des deux espèces d'*Eucalyptus*

Les extraits des plantes considérés comme étant des pesticides naturels, ont été préparés à partir des feuilles de *Eucalyptus globulus* et *Eucalyptus camaldulensis*.

Les prélèvements sont réalisées le matin au moment de débourrement de la plante à la fin du mois d'Avril et par temps sec afin d'éviter toute altération des métabolites secondaires. Les feuilles prélevées sont placées dans des sacs en tissus puis transportées au laboratoire en vue du séchage et des analyses ; elles sont ensuite rincées à l'eau pour éliminer les impuretés puis étendues en couches minces, à bonne aération pendant deux semaines. Une fois séchées, les feuilles sont finement broyées afin d'obtenir une poudre. La drogue obtenue est conservée dans des flacons en verre en vue des expérimentations.

2. Présentation du pesticide chimique de synthèse

Le produit phytosanitaire conventionnel utilisé est un produit commercialisé sous le nom de Vidan 25.

Le Vidan 25 est une substance concentré émulsionnable, dont la substance active est le triadiménol, appartenant à la famille chimique des triazoles, sa formule chimique brute est : $C_{14}H_{18}ClN_3O_2$, son nom chimique est β -(4-chlorophenoxy)- α -(1,1-diméthylethyl)-1H-1,2,4-triazole-1-ethanol et sa structure chimique est la suivante (Figure 1).

Fongicide systémique contre plusieurs champignons parasites dont les oidiums, monolioses , le black-rot des cultures légumières, maraichères, céréalières, et fruitières, et... Il est employé à la dose de 400 à 500 ml/ha (fiche agritox de la substance active présentée dans l'annexe N°)

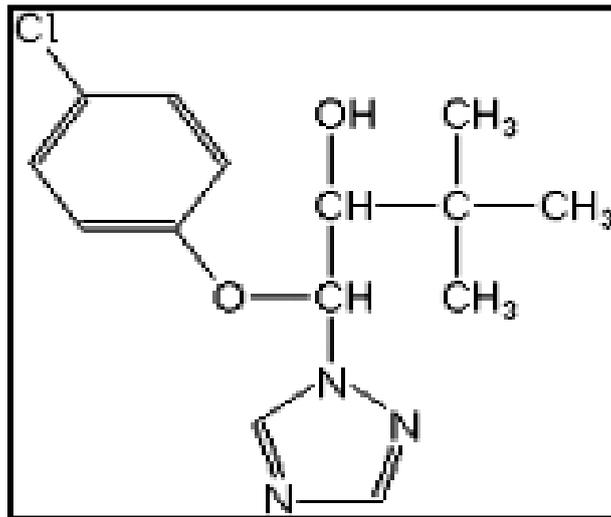


Figure 4. Structure chimique de triadimenol
(<https://encrypted.google.com/patents/EP2102148B1?cl=en>)

Le Vidan 25 EC est systémique. Absorbé par les feuilles et les racines, il est distribué dans toutes les parties de la plante, il inhibe la biosynthèse des stéroïdes des champignons, et il perturbe leurs fonctions membranaires.

Le Vidan 25 EC est destiné au traitement des blés en végétation contre les principales maladies foliaires (oïdium, rouille). Sa formulation EC signifie concentré émulsionnable, sa teneur est de 25%, quant à sa dose d'emploi, elle est de 0,5 l/ha pour les cultures de semences de graminées.

3. Présentation du matériel microbiologique

Nous avons choisi de travailler sur une gamme de microorganismes afin de donner une idée sur l'étendue du champ d'activité antimicrobiennes de nos extraits naturels.

Les agents microbiens utilisés dans cette étude, dans ce travail, sont des espèces fongiques et bactériennes phytopathogènes, capables de provoquer une virulence sur les cultures, ils ont été isolés à partir des sols agricoles contaminés ou des plantes infectées.

4. Etude phytochimique des extraits d'Eucalyptus

4.1. Préparation des extraits bruts hydro-méthanolique

100g de poudre, sont macérés dans dans 1000 ml de mélange méthanol/eau (7:3 V/V) sous agitation douce pendant une nuit à température ambiante. L'extrait hydroalcoolique est récupéré puis filtré une première fois à travers une membrane de filtration millipores. la solution récupérée est remise une 2^{ème} fois pendant 24h dans du méthanol-eau (7:3 V/V), sous les mêmes conditions. après 24 h, elle est filtrée de la même, façon puis reprise encore une 3^{ème} dans le mélange méthanol-eau (7:3 V/V), mais seulement pour une période de 12h. Après la dernière filtration, le mélange méthanol/eau est éliminé du filtrat par évaporation sous vide dans un rotavapeur (BÜCHI) à 40°C, permettant ainsi d'obtenir un résidu caractérisé par une couleur brune foncée, qui est ensuite repris par 5 ml de méthanol. Le résidu obtenu est conservé par congélation (Falleh *et al.*, 2008).

4.2. Mise en évidence des composés du métabolisme secondaire

Un criblage phytochimique, ayant pour but la mise en évidence des différents métabolites secondaires : polyphénols totaux, saponines, tanins, anthocyanes, leuco-anthocyanes, flavonoïdes, alcaloïdes, terpènes et stérols et les cardinolides a été réalisé selon des méthodes standardisées de Solfo, (1973) et Bouquet, (1972). Les détails sont représentés dans l'annexe.

Parmi tous les composés mis en évidence, seuls les polyphénols ont été quantifiés puisqu'ils font partie de la classe la plus riche en métabolites secondaires, rassemblant à la fois les flavonoïdes, les tanins les anthocyanes, les leuco-anthocyanes, les acides phénoliques simples et complexes.

4.3. Quantification des composés polyphénoliques totaux

Le dosage des polyphénols totaux des extraits a été effectué par spectrophotométrie selon la méthode de Singleton *et al.*, (1999).

Ce dosage est basé sur la quantification de la concentration totale des composés à noyaux aromatiques portant un ou plusieurs groupements hydroxyles présents dans l'extrait. Le réactif de Folin-Ciocalteu, consiste en une solution jaune acide contenant un complexe polymérique d'ions (hétéropolyacides). En milieu alcalin, le réactif de Folin-Ciocalteu,

oxyde les phénols en ions phénolates et réduit partiellement ses hétéropolyacides, d'où la formation d'un complexe bleu.

Pour ce faire, 0.2 ml d'extrait (préparé dans le méthanol avec les dilutions convenables) est ajouté à 0.8 ml de la solution de Na_2CO_3 (75mg/ml d'eau distillée), après agitation, 1ml de la solution de FolinCiocalteu (dilué dix fois dans l'eau distillée) est ajouté à l'ensemble, après 2 h d'incubation à la température du laboratoire, l'absorbance est lue à 765 nm contre un blanc sans extrait.

Le taux de polyphénols totaux, a été calculé à partir d'une courbe d'étalonnage linéaire établie avec des concentrations connues et précises d'acide gallique (0-200 $\mu\text{l/ml}$), comme standard de référence, dans les mêmes conditions que l'échantillon. Les résultats sont exprimés en microgramme d'équivalent d'acide gallique par millilitre d'extrait ($\mu\text{g EAG/ml E}$).

4.4. Identification des extraits des deux espèces d'Eucalyptus par chromatographie sur couche mince (CCM)

Par ses faibles contraintes techniques, son emploi simple et son coût modeste, la CCM est un outil de choix pour l'analyse phytochimique de routine d'extraits bruts, de fractions, ainsi que de produits purs isolés. De ce fait nous avons opté dans un premier temps pour cette technique dans le but de faire une caractérisation sommaire des différents composés contenus dans les extraits bruts foliaires des deux espèces d'Eucalyptus.

La séparation, repose sur les mécanismes d'absorption, de partage ou d'échange d'ions ou sur une combinaison de ces mécanismes, et elle s'effectue par migration (développement) de solutés à travers la couche mince (phase stationnaire) dans un solvant ou un mélange de solvants approprié (phase mobile) (Wichtl et Anton, 2003).

Nous avons utilisé des plaques de CCM en gel de silice de dimension (10cm X 15cm). Le dépôt de l'extrait a été réalisé sous forme de spot placé à 1cm du bord inférieur de la plaque et au centre. 20 μl de l'extrait utilisé a été déposés progressivement à l'aide d'un capillaire, la plaque était ensuite séchée sous courant d'air. La plaque de CCM est ensuite déposée dans des cuves en verre contenant 50ml de système éluant et saturé préalablement par la vapeur du

système éluant. Nous avons testé plusieurs systèmes de phase mobile mais nous avons opté pour une phase mobile constituée d'un mélange Toluène, Acide Acétique, eau (2V/1V/1V).

Après migration et évaporation du mélange de solvant, les spots ont été révélés par UV (Fourati-Benfguira *et al.*, 2005), et leurs rapports frontaux calculés. La confirmation de certaines familles de composés a été réalisée par ajouts de la vanilline sulfurique

5. Isolement, purification et identification des agents pathogènes responsables de maladies bactériennes et fongiques des cultures

L'effet biopesticide des extraits doit être apprécié sur des agents pathogènes responsables des maladies culturales. Pour ce faire, des isollements, purifications et identification des bactéries et des champignons ont été réalisés à partir du sol et des organes des plantes infectées. Ces deux composantes constituent d'importants réservoirs de germes voire même hyper-riche en germes pathogènes.

5.1. Isolement à partir du sol

L'isolement des souches autochtones utilisés dans cette étude a été fait à partir de deux sols agricoles, le premier provient d'un domaine agricole de cultures maraichères de la commune de Ain Berda, wilaya de Annaba, et le second provient d'une petite ferme agricole dans les hautes plaines de la wilaya de Sétif non soumise à l'emploi de pesticides.

Les échantillons de sol ont été prélevés par période sèche sur toute la superficie de la parcelle à partir de différents points au voisinage des racines au niveau de l'horizon compris entre 10cm et 20cm. Les échantillons sont placés dans des tubes stériles conçus pour ce type d'échantillonnage, conservés à une température de 5°C et emportés le même jour au laboratoire en vue des analyses. Les échantillons appartenant au même point de prélèvement sont tamisés afin d'éliminer les gros débris, puis bien mélangés de façon à obtenir un matériel homogène.

Après séchage rapide à l'étuve, 1 g de chaque sol est introduit dans un tube contenant 10 ml d'eau distillée stérile; La solution est ensuite homogénéisée par agitation au vortex pendant quelques minutes. Les suspension ainsi obtenues constituent les solutions mères. À partir de la solution mère, une série de dilution au dixième (10^{-1} à 10^{-4}) est réalisée. 1ml de la suspension

mère est prélevé aseptiquement et versé dans 9ml d'eau distillée stérile , la suspension obtenue correspond à la dilution 10^{-1} . Cette dernière est agitée pendant deux minutes avant de prélever 1 ml que l'on ajoute à 9 ml d'eau distillée stérile donnant ainsi la dilution 10^{-2} . On répète ainsi l'opération jusqu'à l'obtention d'une gamme de dilutions décimales appropriées (Figure 5).

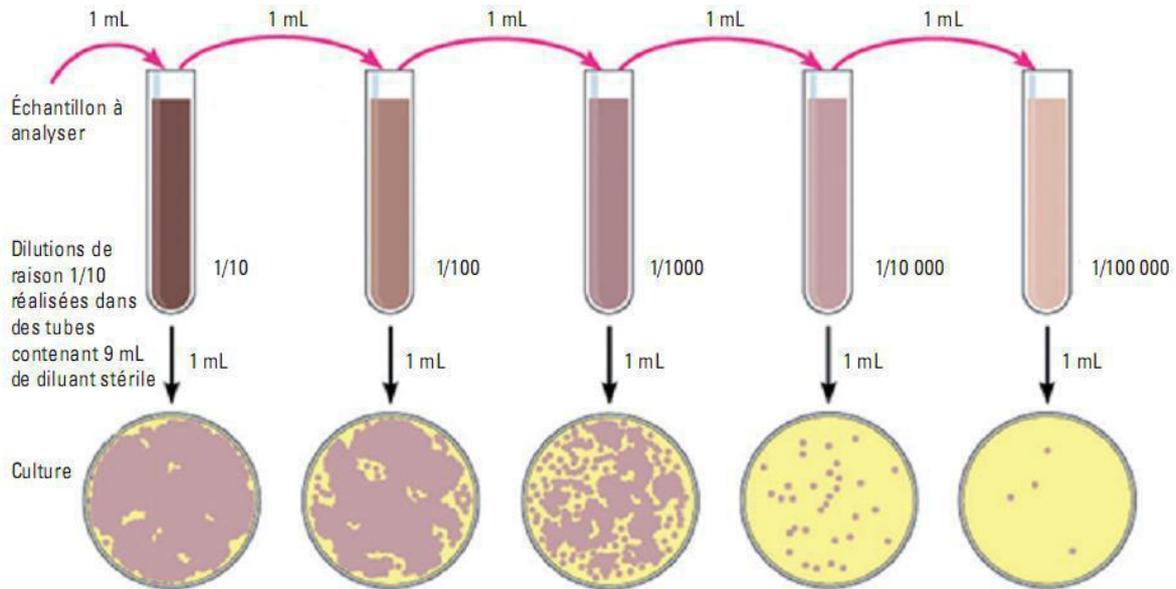


Figure 5. Méthode d'isolement des agents microbiens

5.2. Isolement à partir de la plante

Les microorganismes contaminant les cultures peuvent être exogène ou endogène à l'intérieur des cellules. Pour cela deux modes de détection ont fait l'objet de ces isolements à partir des feuilles de blé (*Triticum durum Desf*) ou de pomme de terre (*Solanum tuberosum L*)

✚ Par lavage

Le lavage permet d'isoler la microflore de surface. Les feuilles prélevées sont soumises à un premier lavage rapide après être débarrassée de souillures superficielles, puis elles ont été mises dans des bocal stériles contenant de l'eau distillée stérile. Après macération de quelques heures, l'eau est récupérée et une gamme de dilutions décimales (au $1/10^{\text{ème}}$) est réalisée à partir d'1ml de cette solution mère récupérée pour être ensuite ensemencer (Figure 5).

Par broyage

Le broyage des feuilles, a pour but de libérer tous les constituant foliaires y compris la microflore endogène, interne. Après un premier lavage rapide, Les feuilles sont broyées délicatement à l'aide d'un mini hachoir préalablement aseptisé. 1ml de ce broyat obtenu constituant la solution mère a subi une gamme de dilutions au $1/10^{\text{ème}}$ (Figure 5).

5.3. Ensemencement

Aussi bien pour le sol que pour la plante lavée ou broyée, la méthode utilisée est celle de l'ensemencement en surface par étalement d'une goutte de la suspension préparée sur le milieu de culture refroidi (Botton *et al.*, 1990). Après agitation des tubes, 0.1 ml de chacune des dilutions indiquées est déposée sur une boîte de Pétri contenant un milieu nutritif gélosé (PDA, MEA, MH, Yeast extract). Le milieu à l'extrait de levure utilisé (Yeast extract) est un milieu amélioré supplémenté de saccharose. Les 10 μ l sont ensuite étalées de façon aseptique et uniforme par un mouvement de balayage et de rotation sur l'ensemble de la surface du milieu de culture puis mise à sécher pendant 10 min. L'expérimentation est réalisée en triplicata. Les boîtes ainsi ensemencées sont déposées à l'étuve pour incubation à différentes températures à 27°C, 37°C, Les lectures sont réalisées entre 24h et 5 jours. Le dénombrement des colonies apparues aux différentes dilutions est réalisé à l'aide d'une cellule de malassez et la moyenne des chiffres obtenus est effectuée en ramenant tout à la même dilution.

5.4. Purification et conservation

La purification des isolaments est une étape très délicate qui joue un rôle important dans l'étape d'identification des isolats, puisqu'il s'agit d'un prélèvement qui abrite des milliers de microorganismes.

Les différents isolats sont d'abord purifiés par plusieurs repiquages successifs monospore ou mono-colonie sur de nouveaux milieux de culture spécifiques ou non. Les milieux de culture utilisés lors des purifications sont les milieux Czapek, Muller-Hinton et extrait de malt-agar. Une fois purifié, chaque isolat est désigné par un numéro de code. La conservation des microorganismes ainsi désignés se fait soit à une température de 4°C soit au congélateur à une température de -18°C. Dans les deux cas, aussi bien pour les bactéries que pour les champignons, des disques de gélose prélevés sur le pourtour de la culture purifiée, sont

transférés dans des tubes Eppendorf stériles de 1,5 ml, contenant du glycérol à 50% (Kebe et *al.*, 2009).

5.5. Identification des souches microbiennes purifiées

5.5.1. Les bactéries

En vue de leur identification, les bactéries sont soumises à un examen macroscopique et microscopique (Botton *et al.*, 1990), suivis de la détermination des caractéristiques physiologiques par la coloration de gram, et biochimiques par les tests de l'oxydase, la catalase ainsi que les métabolismes glucidique et protidiques par les galeries API 20 E et API 20 NE). L'identification des bactéries reste l'opération la plus difficile dans le domaine de la microbiologie, elle a pour but de classer les souches par genres et espèces selon les critères d'identification.

☞ Examen macroscopique

Les différents éléments d'identification macroscopiques sont la taille, la forme, l'aspect de la surface, l'opacité, la couleur, la consistance et la pigmentation. La description avec Toutes ces caractéristiques aboutit à distinguer 3 types principaux de colonies qui sont comme suit:

- ♣ **Colonies S** (Smooth en anglais): colonies à surface lisse et bords réguliers, bombées de consistance crémeuse. Elles donnent des suspensions homogènes ;
- ♣ **Colonies R** (Rough en anglais): colonies à surface rugueuse et bords souvent dentelés, plates, de consistance sèche. Elles donnent des suspensions hétérogènes ;
- ♣ **Colonies M** (Muqueuse): colonies à surface lisse et bords réguliers, bombées mais filantes au prélèvement à l'anse. Elles donnent des suspensions hétérogènes ;
- ♣ Tous les intermédiaires sont possibles (ex. SR).

☞ Examen microscopique

❖ Observation à l'état frais

Ce test permet de déterminer la forme, l'arrangement et la mobilité des bactéries. Le frottis est obtenu à partir d'une suspension bactérienne, agitée et homogénéisée tout en évitant la formation d'un culot au fond du tube. Quelques gouttes sont ensuite prélevées et étalées sur

lame désinfectée. Après séchage, on effectue une coloration avant l'observation au microscope.

❖ Coloration de Gram

La coloration de Gram est la base de l'identification d'une souche bactérienne, et teste son alcool-résistance. En effet, les différences de coloration des bactéries reposent sur des différences de constitution de la paroi. Les bactéries Gram négatives ont une paroi plus fine que celles à Gram positives. De plus, cette paroi est très riche en lipides (membrane externe de la paroi) dans laquelle l'éthanol est fortement soluble. Cette coloration permet en outre de connaître la forme, l'arrangement, la pureté ainsi que la nature biochimique de la paroi des cellules purifiées : (Gram-) ou bien (Gram+) (Perry, 2004). La consistance et la valeur de la coloration de Gram correspond à des différences biochimiques entre la paroi des bactéries Gram positif et les bactéries Gram négatif (Marchal et Bourdon, 1982).

Au terme du processus de coloration, les bactéries dites « Gram Positives » apparaissent bleu foncé/violet tandis que les bactéries dites « Gram Négatives » sont colorées en roses.

☞ Test Oxydase

Ce test permet de mettre en évidence une enzyme : la phénylène -diamine- oxydase des bactéries à partir de leur culture en milieu gélosé. Cette enzyme est capable d'oxyder un réactif : le N diméthyl-paraphénylène -diamine (NDPPD).

Il s'agit d'écraser une colonie de la souche à étudier sur le disque de papier pré-imprégné par le réactif NDPPD. Si la colonie prend une teinte rose, violette. Le germe possède une oxydase: le test est positif, si la colonie reste incolore, le germe ne possède pas d'oxydase, le test est négatif.

☞ Test Catalase

Pendant leur respiration aérobie certaines bactéries produisent du peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) celui-ci est très toxique et certaines bactéries sont capable de le dégrader grâce aux enzymes qu'elles synthétisent et notamment la catalase. Cette enzyme est capable de décomposer l'eau oxygénée selon la réaction : $2\text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow 2\text{H}_2\text{O} + \text{O}_2$. Ce test a pour but de différencier les bactéries lactiques (catalase-) des entérobactéries (catalase+). Une colonie est mise en suspension avec une ou deux gouttes de solution de peroxyde

d'hydrogène (10 volumes) sur une lame. La réaction positive se traduit par un dégagement immédiat de bulles de gaz (O_2) (Marchal *et al.*, 1991).

Systèmes d'identifications à l'aide de galeries API 20 E

Il est possible d'identifier les bactéries selon des caractères biochimiques liés à la production d'enzymes spécifiques de l'espèce.

La galerie API 20E est un système standardisé pour l'identification des Enterobacteriaceae et autres bacilles à Gram négatif. Elle se compose de 20 microtubes contenant un substrat déshydraté pour réaliser 21 tests biochimiques miniaturisés. On inocule chaque tube avec la suspension bactérienne à identifier, les réactions produites après la période d'incubation se traduisent par des virages colorés.

Au-delà des notions de classification, l'identification repose sur le profil biochimique de la bactérie. Cela permet d'aborder parallèlement des aspects du métabolisme bactérien (auxanogramme, fermentation des glucides).

L'identification est obtenue à partir du profil numérique. Sur la fiche des résultats, les tests sont séparés par groupe de trois et une valeur (1, 2, 4) est indiquée pour chacun. En additionnant à l'intérieur de chaque groupe les valeurs correspondant à des réactions positives, on obtient 7 chiffres ; la réaction de l'oxydase qui constitue le 21^{ème} test est affectée de la valeur 4 lorsqu'elle est positive. Par le biais du profil numérique, l'identification de l'espèce bactérienne s'effectue à l'aide du Catalogue Analytique (tableau de lecture) et d'un logiciel d'identification.

Tableau 1. Tableau de lecture des tests du système API 20 E (www.biomerieux.com).

TESTS	COMPOSANTS ACTIFS	QTE (mg/cup.)	REACTIONS/ENZYMES	RESULTATS	
				NEGATIF	POSITIF
ONPG	2-nitropheline-BD-Galactopyranoside	0.223	B-galactosidase (Ortho Nitro Phenyl-BD Galastopyranosidase)	Incolore	Jaune (1)
<u>ADH</u>	L-arginine	1.9	Arginine DiHydrolase	Jaune	Rouge / orange (2)
<u>LDC</u>	L-lysine	1.9	Lysine DeCarboxylase	Jaune	Rouge / orange (2)
<u>ODC</u>	L-ornithine	1.9	Ornithine DèCarboxylase	Jaune	Rouge / orange (2)
<u>[CIT]</u>	Trisodium citrane	0.756	Utilisation du CITrate	Vert pâle/jaune	Bleu-vert /bleu (3)
<u>H2S</u>	Sodium thiosulfate	0.075	Production d'H ₂ S	Incolore / grisatre	Dèpot noir/fin liserè
<u>URE</u>	Urée	0.76	UREase	Jaune	<u>Rouge / orange (2)</u>
TDA	L-tryptophane	0.38	Tryptophane désaminase	<u>TDA / immédiat</u> Jaune morron-rougeatre	
IND	L-tryptophane	0.19	Production d'indole	<u>JAMES / immédiat</u> incolore rose vert pale /jaune	
<u>[VP]</u>	Sodium pyruvate	1.9	Production d'acétoine (Voges Proskauer)	<u>VP 1 + VP 2 / 10 mln</u> Incolore/rose pale rose /rouge(5)	
<u>[GEL]</u>	Gélatine (origine bovine)	0.6	Gèlatinasa (Gèlatine)	Non diffusion	Diffusion du pigment noir
GLU	D-glucose	1.9	Fermentation / oxydation (GLUcose) (4)	Bleu/bleu-vert	Jaune-jaune gris
MAN	D-mannitol	1.9	Fermentation / oxydation (MANnitrol) (4)	Bleu/bleu-vert	Jaune
INO	Inositol	1.9	Fermentation / oxydation (INOsitol) (4)	Bleu/bleu-vert	Jaune
SOR	D-sorbiyol	1.9	Fermatation / oxydation (SORbito) (4)	Bleu/bleu-vert	Jaune
RHA	L-rhamnose	1.9	Fermentation / oxydation (RHAmnose) (4)	Bleu/bleu-vert	Jaune
SAC	D-saccharose	1.9	Fermentation / oxydation (SACcharose)(4)	Bleu/bleu-vert	Jaune
MEL	D-melibiose	1.9	Fermentation / oxydation (MELibiose) (4)	Bleu/bleu-vert	Jaune
AMY	Amygdaline	0.57	Fermentation / oxydation (AMYgdaline) (4)	Bleu/bleu-vert	Jaune
ARA	L-arabinose	1.9	Fermentation / oxydation (ARAbiose) (4)	Bleu/bleu-vert	Jaune
OX	(voir notice du test oxydase)		Cytochrome-OXYdase	(voir notice du test oxydase)	

☛ Systèmes d'identifications à l'aide de galeries API 20 NE

C'est une série de test qui permet d'identifier les bacilles à gram négatif et oxydase positif La galerie API 20 NE comporte 20 microcupules contenant des substrats déshydratés. Les tests conventionnels sont inoculés avec une suspension bactérienne saline qui reconstitue les milieux. Les réactions produites pendant la période d'incubation se traduisent par des virages colorés spontanés ou révélés par l'addition de réactifs. Les tests d'assimilation sont inoculés avec un milieu minimum et les bactéries se développent seulement si elles sont capables d'utiliser le substrat correspondant. La lecture des résultats se fait à l'aide du tableau de lecture et l'identification par un logiciel d'identification.

Tableau 2. Tableau de lecture des tests du système API 20 NE (www.biomerieux.com).

TESTS	COMPOSANTS ACTIFS	QTE (mg/cup.)	REACTIONS/ENZYMES	RESULTATS	
				NEGATIF	POSITIF
NO ₃	Potassium nitrate	0.136	Réduction des Nitrates en nitrites	NIT 1 + NIT 2 / 5 min Incolore rose-rouge	
			Réduction des Nitrates en azotes	Zn / 5 min Rose incolore	
TRP	L-tryptophane	0.2	Formation d'indole (TRYPTOPHANE)	JAMES / immédiat Incolore rose Vert pâle/jaune	
GLU	D-glucose	1.92	Fermentation (GLUCOSE)	Bleu à vert	Jaune
ADH	L-arginine	1.92	Arginine DiHydrolase	Jaune	Orange / rose / rouge
URE	Urée	0.76	UREase	Jaune	Orange / rose / rouge
ESC	Esculine citrate de fer	0.56 0.072	Hydrolyse (β-glucosidase) (ESCuline)	Jaune	Gris / marron / noir
GEL	Gélatine (origine bovine)	0.6	Hydrolyse (protéase) (GELatine)	Pas de diffusion su pigment	<u>Diffusion du pigment</u>
PNPG	4-nitrophényl-βD-galactopyranoside	0.22	β-galactopyranosidase (Para-NitroPhényl-βD-Galactopyranosidase)	Incolore	Jaune
[GLU]	D-glucose	1.56	Assimilation (GLUCOSE)	Transparence	Trouble
[ARA]	L-arabinose	1.4	Assimilation (ARABINOSE)	Transparence	Trouble
[MNE]	D-mannose	1.4	Assimilation (MANNOSE)	Transparence	Trouble
[MAN]	D-mannitol	1.36	Assimilation (MANNITOL)	Transparence	Trouble
[NAG]	N-acétyl-glucosamine	1.28	Assimilation (N-ACÉTYL-GLUCOSAMINE)	Transparence	Trouble
[MAL]	D-maltose	1.4	Assimilation (MALTOSE)	Transparence	Trouble
[GNT]	Potassium gluconate	1.84	Assimilation (potassium Gluconate)	Transparence	Trouble
[CAP]	Acide caprique	0.78	Assimilation (acide CAPRIQUE)	Transparence	Trouble
[ADI]	Acide adipique	1.12	Assimilation (acide ADIPIQUE)	Transparence	Trouble
[MLT]	Acide malique	1.56	Assimilation (MALIQUE)	Transparence	Trouble
[CIT]	Trisodium citrate	2.28	Assimilation (trisodium CITRATE)	Transparence	Trouble
[PAC]	Acide phénylacétique	0.8	Assimilation (acide PHÉNYLACÉTIQUE)	Transparence	Trouble
OX	(voir notice du test oxydase)		Cytochrome-OXYdase	(voir notice du test oxydase)	

5.5.2. Les champignons

Les champignons microscopiques présentent une grande variabilité d'ordre physiologique en fonction des conditions de culture (nature du milieu de culture utilisé et température d'incubation), mais aussi une grande variabilité génétique.

Conventionnellement, l'identification des espèces fongiques repose sur l'observation de critères morphologiques : d'une part l'observation macroscopique du mycélium (aspect, couleur et taille des colonies) et d'autre part, par une observation microscopique des structures reproductrices (Botton *et al.*, 1990)

☞ Examen macroscopique

L'examen s'effectue à l'œil nu et avec la loupe binoculaire. On observe attentivement, l'aspect du champignon, en vérifiant que toutes les colonies soient identiques, en tenant compte de la surface et de la consistance de la colonie, sa couleur, sa taille, son contour ainsi que la pigmentation et la présence de l'exsudat dans le milieu.

☞ Examen microscopique

L'examen microscopique est basé sur les caractères morphologiques des organes de fructifications, types de spores, aspect du thalle, taille, couleur et disposition des pores ainsi que les organes de résistance, suite à la coloration du mycélium et les parois fongiques. L'observation est réalisée au microscope aux différents grossissements. Celle des organes différenciés sera faite à immersion au grossissement ($\times 100$).

Les lames préparées sont conservées par la méthode de Riddel (Botton *et al.*, 1990) qui consiste à appliquer une couche de vernie tout autour de la lamelle sur une zone stérile sèche dans le but de sceller la préparation et la protéger contre l'assèchement par l'évaporation du lactophénol.

Les souches isolées ont été identifiées en se basant sur des clés de détermination complètes à partir des caractères cultureux et morphologiques (Botton *et al.*, 1990 ; Domch *et al.*, 1980 ; Kirk *et al.*, 2008 ; Tabuc, 2007 ; Wanatabe, 2002 ; Mueller et Schmit, 2007). La systématique adoptée est celle de Kirk *et al.*, (2001).

6. Etude in vitro de l'effet biopesticide des extraits des deux espèces d'Eucalyptus

♣ Préparation de l'inoculum bactérien

Les inocula bactériens ont été préparés à partir de colonies de moins de 24 h en bouillon Mueller Hinton (BMH) dans 10 ml de milieu Muller-Hinton puis incubé pendant 24h à 37 °C. Pour chaque souche 1 ml du milieu BMH inoculé a été prélevé et ajouté à 10 ml de milieu BMH stérile. chaque suspension bactérienne obtenue a été évaluée à environ 10^6 cellules/ml et constituent les solutions mères à partir desquelles seront faites les dilutions.

♣ Préparation des dilutions

Les différentes dilutions ont été préparées à partir de dilutions successives au 1/10ème à partir de la solution mère de l'inoculum. La suspension mère ainsi que les dilutions de 10^{-1} à 10^{-8} ont été ensuiteensemencées sur milieu Mueller-Hinton et incubées à 37°C

♣ Préparation de la gamme de concentration des extraits

La gamme de concentration de l'extrait végétal a été préparée dans 5 tubes numérotés de 1 à 5 par la méthode de la double dilution selon une progression géométrique à raison de 1/2.

6.1. Evaluation de l'effet antimicrobien (antifongique et antibactérien)

✚ Selon la technique de la diffusion sur milieu solide

C'est une méthode basée sur une technique utilisée en bactériologie médicale, appelée antibiogramme (Benlilali *et al.*, 1986). Elle a l'avantage d'être d'une grande souplesse dans le choix des produits à tester et de s'appliquer à un grand nombre d'espèces bactériennes (Pibiri, 2005). Cette méthode consiste à mettre en évidence une éventuelle activité antimicrobienne de l'extrait des plantes recensé, en présence des germes à tester.

Des disques absorbants stériles, imprégnés par l'extrait à différentes concentration en commençant par la solutions mère et de dilution au 1/2, 1/4 et 1/8 et disposés sur gélose extrait de malt agar (MEA) pour les champignons et gélose extrait de levure (YE) pour les bactéries, avec les souches et le produit diffuse radialement du disque dans la gélose en formant ainsi un gradient de concentration. Après incubation à 37°C pour les bactérie et 27°C pour les champignons, si la molécule est toxique pour l'espèce microbienne, il se forme une

zone ou un halo autour du disque. Plus grande est cette zone, plus l'espèce est sensible. Cette zone claire ou halo montre l'inhibition voire même la destruction du germe et évalue l'efficacité du produit testé. Des disques témoins positifs imprégnés d'antibiotique ou d'un pesticide, et des disques témoins négatifs imprégnés d'une goutte d'eau distillée stérile sont inclus dans les essais. L'expérimentation a été réalisée en triplicata.

Selon la technique de l'incorporation de l'extrait dans le milieu de culture liquide

Cette méthode est similaire à celle de Morel et Rochaix utilisé pour les huiles essentielles (Drugeon *et al.*, 1991), elle consiste à ajouter l'extrait des plantes au milieu de culture après stérilisation. 1 ml de chaque extrait est alors incorporé à 100 ml de milieu culture, maintenu à une température de 40°C. Les mélanges sont immédiatement repartis dans les boîtes de pétri à raison de 20 ml de milieu par boîte. Après solidification, l'inoculation des milieux de culture contenant l'extrait ou non (témoin) est effectuée par étalement de la souche jeune de 24 h pour les bactéries et de 5 à 7 jours pour les champignons. Les résultats sont exprimés en pourcentage de croissance.

6.2. Evaluation de l'effet bactériostatique/bactéricide et fongistatique/fongicide

L'effet bactériostatique d'une substance est caractérisé par la valeur de la CMI qui est la concentration minimale inhibitrice ou la plus petite concentration d'une substance qui inhibe toute culture visible d'une souche microbienne après 18 heures de culture à 37°C.

Tandis que l'effet bactéricide ou fongicide d'une substance est évaluée par la valeur de la CMB ou CMF qui désigne la plus petite concentration de la substance ne laissant subsister que 0,01% ou moins de survivants de l'inoculum initial après 18 heures de culture à 37°C.

Les produits bactériostatiques ou fongistatiques (antibiotiques ou autres) possèdent des CMB ou CMF éloignées des CMI. les CMB ou CMF peuvent être 32 fois supérieures au CMI. Par contre les substances bactéricides ou fongicides ont des CMB ou CMF proches des CMI. elles sont 32 fois inférieures au CMI.

❖ Préparation de l'inoculum servant à déterminer la CMI et la CMB

Une suspension de 0,5 Mc Farland est préparée à partir d'une colonie microbienne de 24h en milieu solide, puis mise en suspension dans 10 ml d'eau physiologique stérile et agitée au vortex.. Une goutte de la suspension estensemencée puis icubée pendant 24h. Le comptage sur cellule de Malassez a permis d'obtenir 10^6 ufc/ml

Les concentrations des extraits ont été préparée comme précédemment. A partir de la solution mère hydro-méthanolique selon la méthode de dilution en progression géométrique à raison de 2. De chaque concentration des extraits, on prélève 1ml qu'on ajoute à 9 ml de l'inoculum préparé à 10^6 cfu/ml (Mann et Markham, 1998). L'incubation se fait à 37°C pendant 18 à 24 h pour les bactéries et 25°C pendant 1 à 5 jours pour les champignons. La CMI est calculée à partir du premier tube dont la croissance (trouble) n'est pas visible à l'œil nu (Amhis *et al.*,2001 ; Kamagate *et al.*,2001).

La CMB étant la concentration qui ne laisse subsister que 0,01% de la population microbienne, elle est donc déterminée après repicage des dilution se trouvant après la CMI.

La figure montre le protocole qui a été suivi pour la détermination de la CMI par la méthode de dilution en milieu liquide.

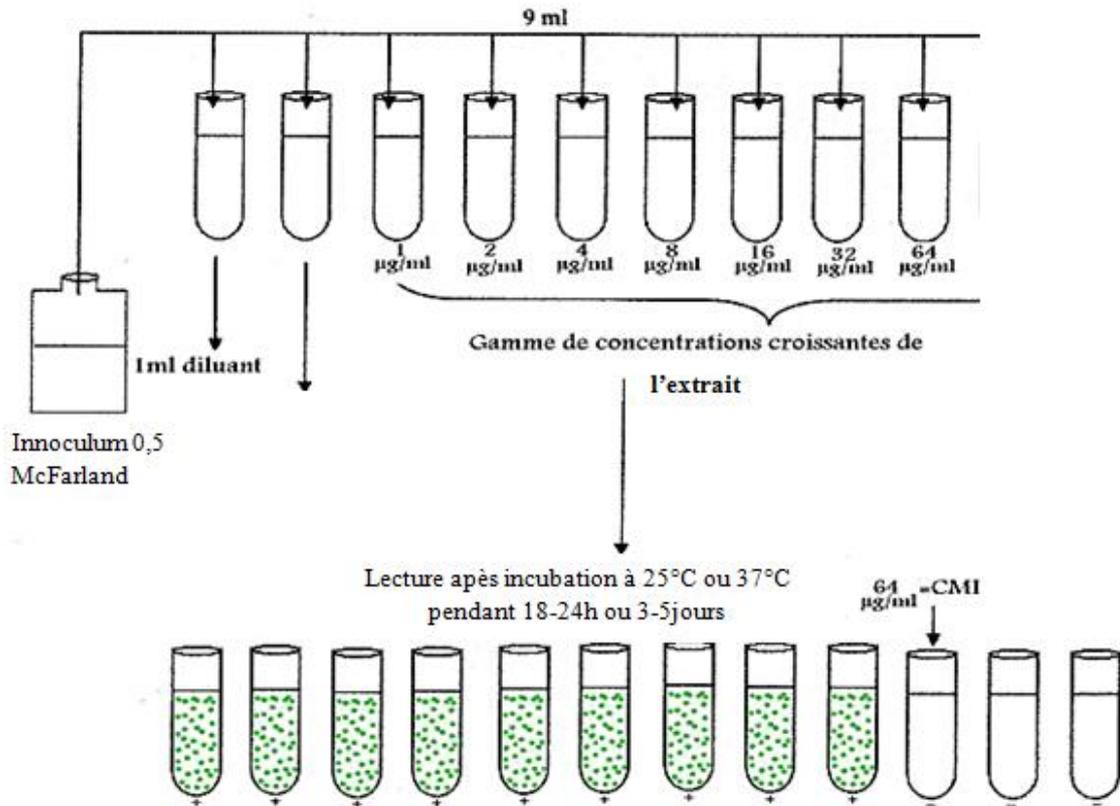


Figure 6. Détermination de la CMI par la méthode de dilution en milieu liquide

6.3. Cinétique de la croissance microbienne sous l'effet des extraits par la méthode de la culture discontinue en mode batch

Afin de suivre la croissance de souches testées en présence des extraits des deux espèces d'eucalyptus globulus et camaldulensis étudiées en mode discontinu non renouvelé, nous avons réalisé des microcosmes microbiens in vitro soumis à des conditions contrôlée pendant 3 jours.

Protocole expérimental

■ Préparation des précultures

A partir des souches identifiées et référenciées, des inocula sont préparés à partir de quelques fragments mycéliens (Spores, hyphes) pour les champignons et des colonies pour les bactéries. Chaque inoculum est activé par ensemencement sur milieu à base d'extrait de malt (MEA) ou à base de yeast extract (YEA), incubé ensuite à 27°C ou 37°C pendant une période de 2 à 5 jours

■ Cultures

Les cultures sont conduites en milieu synthétique GALZY et SLONIMSKI (GS), supplémenté de glucose (5g/l) à pH 5,5 pour les souches fongiques et 6,5 pour les souches bactérienne, le milieu est répartis dans des fioles d'Erlen meyer de 100 ml à raison de 25 ml par fiole, l'ensemble est alors stérilisé sous pression vapeur saturante (20 mn à 120°C). L'inoculum (mycélium plus spores) est prélevé et introduit de manière aseptique dans les fioles. Chaque essai est réalisé en triplicata (trois répétitions pour chaque souche). L'incubation se fait à une température de 27°C pour les souches bactériennes et à une température de 37°C pour les souches fongiques, sous éclairage de 1200Lux (12H/24H) et en condition agitée (sur plaque orbitale à une vitesse de rotation de 180 tr/mn) pendant trois jours.

Les extraits d'Eucalyptus et le pesticide chimique vidan 25 EC, sont préparées dans un mélange DMSO/éthanol (50/50, V/V) et stérilisées par filtration à travers une membrane de 0,22 µm Millipore (Bedford, MA), puis ajoutées dans les cultures d'une façon aseptique à la concentration finale de 20µl.

des témoins sans extrait et sans pesticides, sont inclus dans les essais. Les valeurs sont exprimées en moyennes. Plusieurs paramètres, ont été pris en considération, il s'agit notamment de la DO ou la turbidité, pH ou acidité et le poids sec ou biomasse microbienne. Les cinétiques ont été déterminées à partir d'aliquot de cultures prélevées au temps $t = 0\text{min}$, $t = 6\text{h}$, $t = 24\text{h}$, $t = 48\text{h}$, $t = 72\text{h}$.

Les différentes phases de la méthodologie utilisée sont schématisées dans la figure suivante :

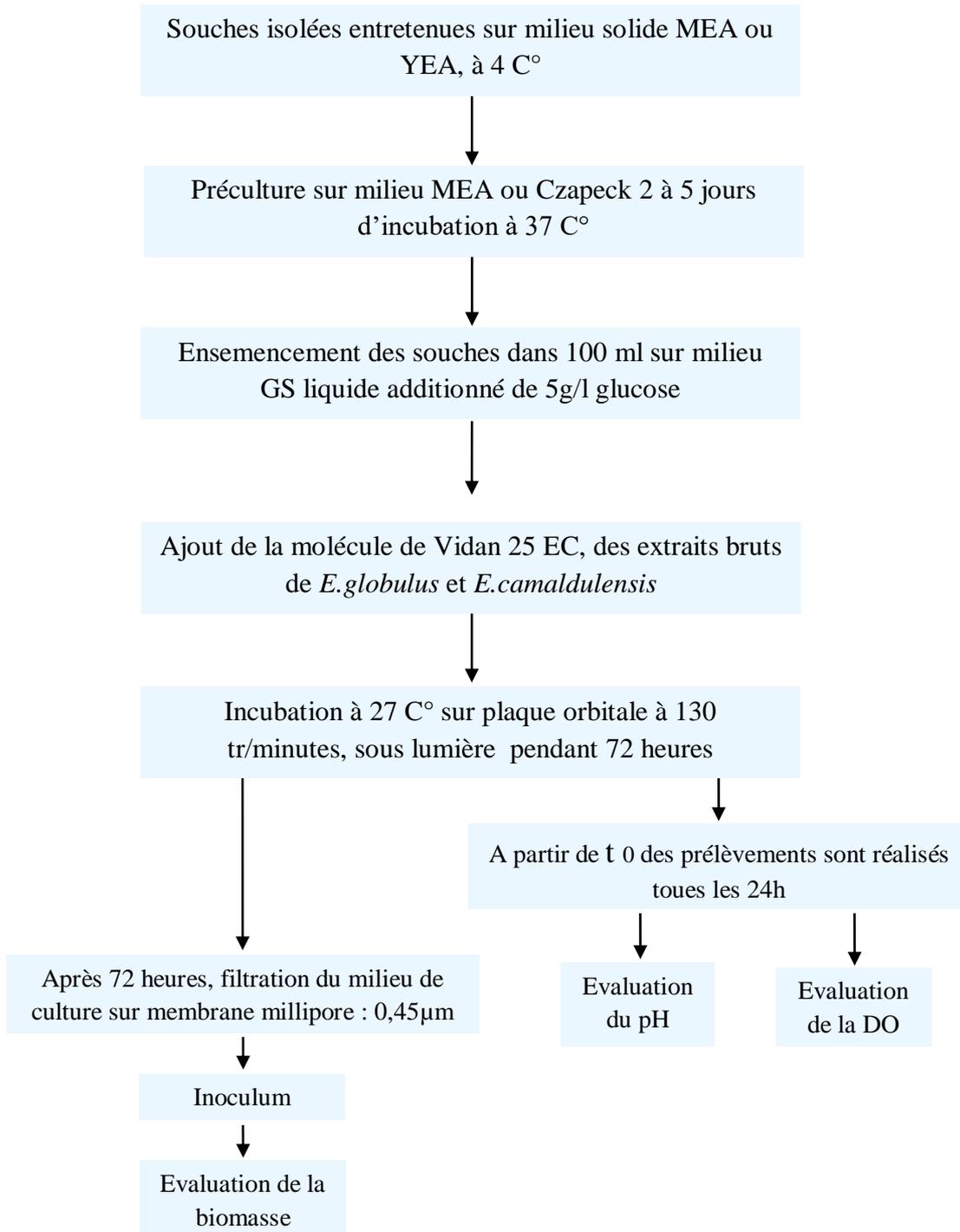


Figure 7. Phases de la méthodologie utilisée pour l'évaluation pouvoir inhibiteur des extraits naturels sur la croissance des souches phytopathogènes

7. Etude in vivo des extraits des deux espèces d'Eucalyptus sur *Capsicum annum* inoculé ex situ par les différentes souches microbiennes

Ce test consiste à évaluer l'effet des extraits d'*Eucalyptus globulus* et *Eucalyptus camaldulensis* sur le fruit infecté par contact direct.

Un lot de poivrons sein (*Capsicum annum*) est inoculé à l'aide d'une suspension microbienne de 10^8 , cette dernière est obtenue à partir d'un fragment mycéliens ou d'une colonie bactérienne d'une culture jeune, mélangé dans un tube à essai contenant de l'eau distillée stérile. La suspension obtenue est vortexée jusqu'à homogénéisation complète.

Les poivrons sont nettoyés plusieurs fois à l'eau courante puis désinfectés avec une solution d'hypochlorite de sodium à 2%. Après séchage, les fruits sont inoculés par injection à la suspension microbienne. Après une incubation à 25 ou 37°C pendant 48 heures, les fruits en question sont traités à base d'extrait des deux espèces d'Eucalyptus ou le Vidan 25 EC. Les poivrons ainsi préparés sont enveloppés dans des sacs en plastiques stériles et placés dans une chambre de culture sous conditions contrôlées de température et d'humidité. Des témoins traités à l'eau distillée stérile sont inclus dans les essais. Les lectures sont faites dès l'apparition des nécroses.

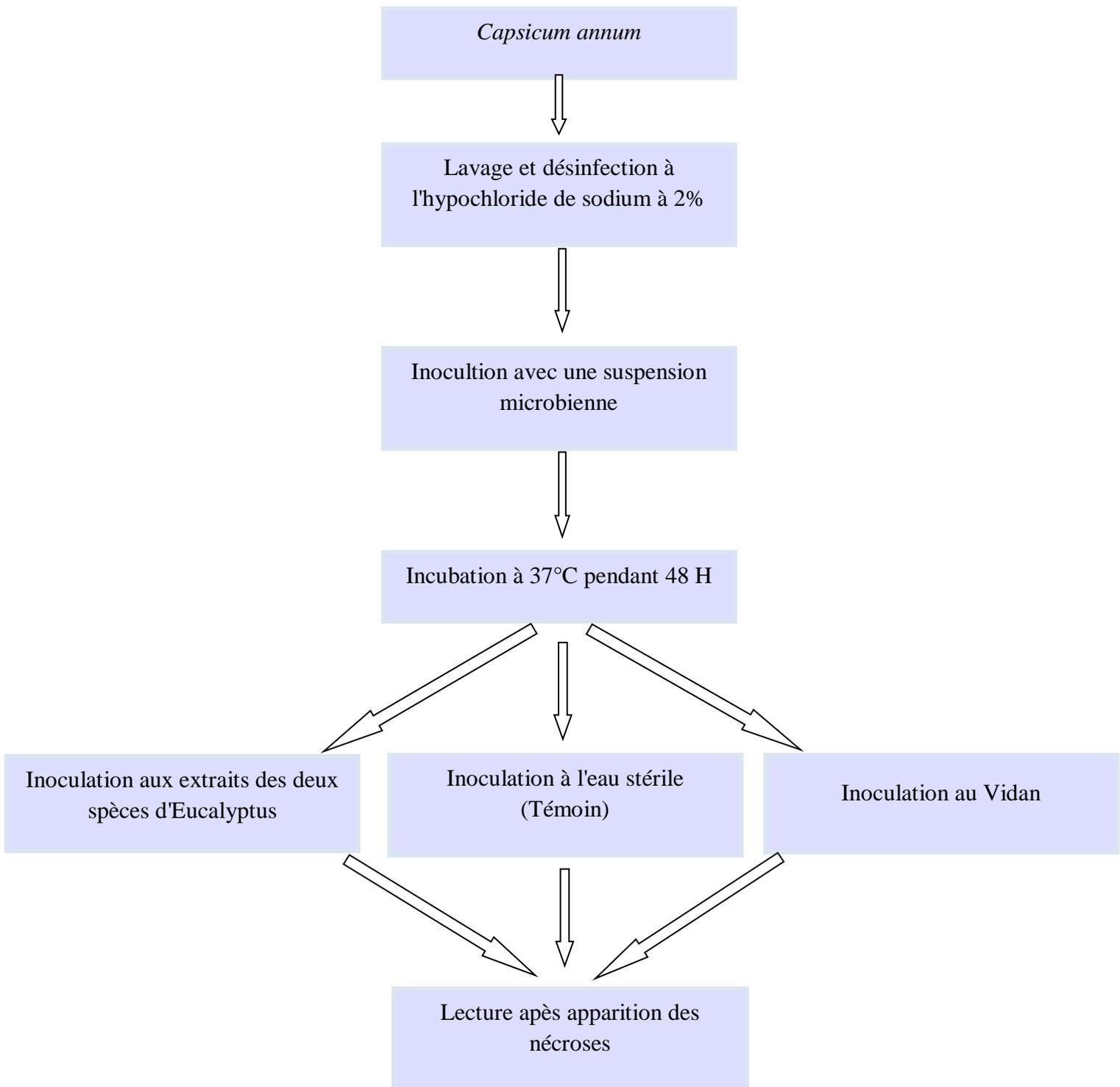


Figure 8. Protocole expérimental de l'effet ex situ des extraits des deux espèces d'Eucalyptus sur *Capsicum annum* inoculé par les différentes souches microbiennes

8. Etude de la toxicité des extraits des deux espèces d'Eucalyptus sur les organismes non cibles

La toxicité de nos extraits végétaux a été appréciée à travers des biotests réalisés sur deux types d'organismes non cibles, *Triticum durum* (organisme végétal) et *Loboptera decipiens* (organisme animal).

8.1. Evaluation de l'effet toxique des extraits sur *Triticum durum*

La toxicité des deux extraits naturels a été testé d'abord sur une espèce végétale de blé dur, *Triticum durum*. Les biotests ont porté uniquement sur la phase germinative du blé dur et non sur la levée et la phase de maturation comme il a été convenu au début de l'expérimentation. Les graines de triticum ont été mis à germer en présence de la solution mère de l'extrait puis par les extraits dilués (1/2 1/4) ou du pesticide conventionnel Vidan 25 EC. Des témoins n'ayant pas subies l'effet des extraits ni du pesticides sont également inclus les tests.

Préalablement au traitement avec les extraits des deux espèce d'Eucalyptus et les solutions du Vidan, les graines de blé dur sont mises dans une solution de Na Cl à 5% pendant 1 minute, puis lavés, cinq fois avec de l'eau distillée. (Ben Hamouda *et al.*, 2001).

Les graines sont méticuleusement choisies avant leur utilisation. (Pas de cassures ni des signes apparents de maladies), sont traitées à base d'extraits végétaux ou de pesticide Vidan 25 EC.

Les concentrations choisies sont comme suit :

- Le Vidan 35µg, 70 µget 140µg
- L'extrait polyphénolique d'Eucalyptus globulus : 0,45g/ml, 0,112g/ml
- L'extrait polyphénolique d'Eucalyptus camaldulensis : 0,55g/ml, 0,137g/ml

Les paramètres étudiés sont le pourcentage de germination (PG), le nombre moyen des racine (NMR), la longueur moyenne des racines (LMR) et l'indice de germination (IN).

Pourcentage de germination

Le pourcentage de germination est déterminé après 48, 72 et 96 heures de traitement, le nombre de grains ayant germé et dont la longueur d'au moins une de leurs racines dépasse les 2 mm est considérée comme ayant germé (Ben Hamouda *et al.*, 2001).

Nombre moyen des racines

Le nombre moyen de racines est déterminé après 48 h, 72 h et 96 h en présence ou non du Vidan et des des extraits d'Eucalyptus globulus et Eucalyptus camaldulensis. Le nombre moyen des racines est suivi pendant cinq jours.

Longueur moyenne des racines

Les paramètres d'élongation racinaire sont déterminé dans des boites de pétri et réalisés sur des germinations de 2 à 5 jours en présence ou non de traitement. La longueur moyenne des racines est suivie pendant 5 jours.

Indice de germination

Selon Abbott (1955), l'indice de germination est donné par la formule suivante :

$$N_1 + (N_2 - N_1)/2 + (N_3 - N_2)/3 + \dots + (N_n - N_{n-1})/n \text{ (Mazliak, 1998).}$$

Où $N_1, N_2, N_3, \dots, N_{n-1}$ et N_n sont les pourcentages de germination obtenus le 1^{er}, le 2^{ème}, le 3^{ème}, ... le (n-1) ème, et le n ème, jours.

8.2. Evaluation de l'effet toxique des extraits d'eucalyptus sur *Loboptera decipiens*

Pour arriver à déterminer ce test de toxicité sur des organismes non cibles animaux, nous avons opté pour *Loboptera decipiens*, ce sont des insectes à intérêt biologique, puisqu'elles sont bioindicatrices de la bonne santé des forêts, elles assurent la dégradation de la matière organique et jouent un rôle important dans la chaîne alimentaire forestière.

Loboptera decipiens est une blatte aptère noir brillant, de forme ovoïde, et présentant chez les adultes une bordure blanchâtre autour du corps; elle mesure 8 à 10 mm de long. Ses élytres sont lobiformes et mesurent environ 2,5 mm; les antennes sont longues et les pattes épineuses de couleur brun roux (Chopard, 1943).

Comme toutes les blattes, *L. decipiens* est un insecte au développement hétérométabole qui passe par cinq stades larvaires (L1 à L5) avant le stade adulte (Haupt et Haupt, 1998 ; Bouachria, 2005 ; Ferrah, 2005).

Méthodologie suivie

les blattes sont élevées dans des boîtes en plastique présentant des orifices grillagés, à raison de 10 individus par boîte. Elles sont nourries par une croquette trempée dans les extraits des deux espèces d'Eucalyptus. Les insectes sont abreuvés grâce à des tubes remplis des extraits dilués au 1/16 et bouchés avec du coton. Ces tubes assurent également l'humification du milieu ambiant. La température est d'environ 26°C, l'hygrométrie de 70 à 80% et la scotophase de 12 heures. Le suivi des blattes s'est fait sur une période de trente jours.

RESULTATS

RESULTATS

1. Etude phytochimique des extraits d'Eucalyptus

1.1. Mise en évidence des composés du métabolisme secondaire

Comme toutes les espèces végétales, les Eucalyptus sont riches en métabolites secondaires et en particulier en composés polyphénoliques tels que les flavonoïdes, les tanins, les anthocyanes. Les saponosides présents également chez les deux espèces sont de nature différentes et classés selon la nature de leur génine selon des travaux antérieurs. Les eucalyptus et notamment *Eucalyptus globulus* renferment 2 types de saponosides, les saponosides à génine stéroïdique et les saponosides à génine triterpénique. On dénote une absence totale des alcaloïdes dans les deux espèces.

Tableau 3. criblage phytochimique des extraits

Métabolites secondaires	<i>Eucalyptus camaldulensis</i>	<i>Eucalyptus globulus</i>
Saponosides	+	+
Anthocyanes	+	+
Leuco-anthocyanes	-	-
Alcaloïdes	-	-
Flavonoïdes	+	+
Tanins	+	+

+ : présence ; - : absence

1.2. Quantification des composés polyphénolique totaux

La détermination de la teneur en polyphénols totaux dans les extraits hydro-méthanoliques d'*Eucalyptus camaldulensis* et d'*Eucalyptus globulus* a été rapportée en mg équivalent d'acide gallique/g du matériel végétal sec. Les résultats montrent que les deux espèces d'Eucalyptus ont une forte teneur en polyphénols totaux (75,214 et 74,714 mg EAG/gMS), comparativement à ce qui a été signalé dans les travaux antérieurs (Tableau 2). Les valeurs sont assez rapprochées avec cependant un excédent de la part d'*Eucalyptus camaldulensis* de

5mgEAG/gMS. Ceci est probablement lié à la présence de plusieurs molécules d'acides phénoliques simples qui ont été détectés à plusieurs reprises au niveau des feuilles de cette espèce.

Tableau 4. Teneur en polyphénols totaux des deux espèces d'Eucalyptus

Extrait hydro-méthanolique	Teneur en polyphénols totaux
<i>Eucalyptus camaldulensis</i>	75,214 mg EAG/gMS
<i>Eucalyptus globulus</i>	74,714 mg EAG/gMS

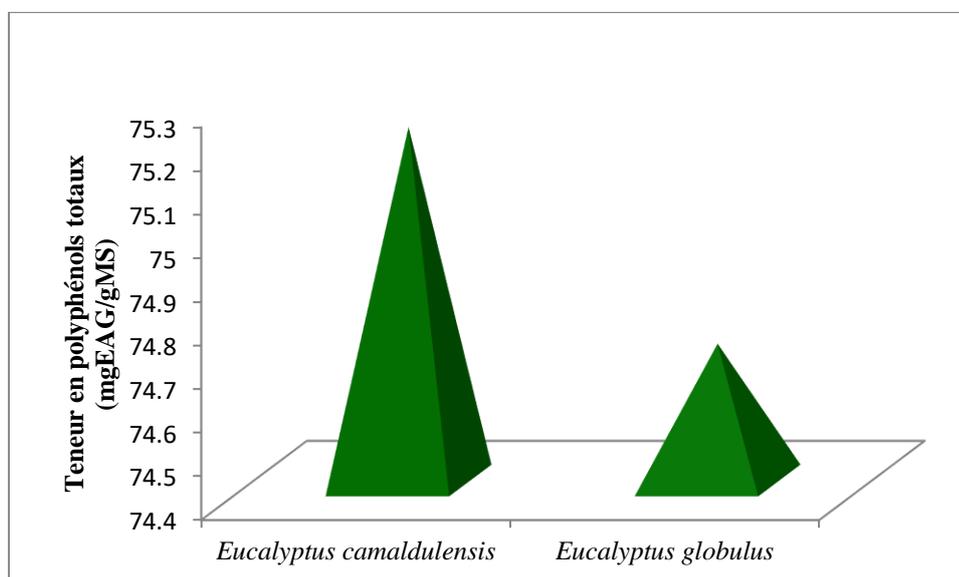


Figure 9. Teneur en polyphénols totaux des deux espèces d'Eucalyptus

1.3. Identification des extraits des deux espèces d'Eucalyptus par chromatographie sur couche mince (CCM)

L'analyse chromatographique sur couche mince a démontré que les extraits bruts d'*Eucalyptus globulus* et *Eucalyptus camaldulensis* contenaient plusieurs molécules différentes (Tableau 5).

Tableau 5. Résultats de l'identification par CCM

Extrait	Rf	Couleur après révélation à au réactif de la vaniline sulfurique	Famille des composés
<i>Eucalyptus globulus</i>	0,14	Violet clair	Triterpènes
	0,24	Marron	Tanins
	0,34	Rose clair	Triterpènes
	0,35	Rose	Triterpènes
	0,39	Jaune	Flavonoides
	0,46	Bleu blanc fluorescent	Stérois
	0,50	Violet foncé	Triterpènes
	0,78	Orange	Triterpènes
	1,88	Marron	Tanins
<i>Eucalyptus camaldulensis</i>	0,14	Violet clair	Triterpènes
	0,15	Violet	Triterpènes
	0,19	Jaune	Flavonoides
	0,28	Orange	Triterpènes
	0,34	Rose claire	Triterpènes
	0,42	Bleu blanc fluorescent	Stérois
	0,50	Violet foncé	Triterpènes
	0,57	Violet	Triterpènes

La chromatographie sur couche mince nous a permis d'obtenir plusieurs taches dont 9 obtenus après la migration de l'extrait de *Eucalyptus globulus* et 8 taches provenant de la migration de l'extrait de *Eucalyptus camaldulensis*. Les couleurs révélées en présence du réactif de vanilline sulfurique sont au nombre de 6 et mettent en évidence la présence des triterpènes (coloration violet, rose et orange) (Joshi *et al.*, 1971; Govindachari *et al.*, 1972 ; Anjaneyulu *et al.*, 1970) et des stérols (coloration bleu) (Anjaneyulu., 1972). On peut aussi émettre l'hypothèse que les composés, qui apparaissent en marron ou en jaune révélés à la vanilline sulfurique, sont respectivement des tanins et des flavonides.

2. Isolement, purification et identification des agents pathogènes responsables de maladies bactériennes et fongiques des cultures

2.1. Isolement à partir du sol

La microflore totale isolée à partir des différents échantillons des deux sols analysés est assez riche et répartie d'une manière hétérogène au niveau des différents points de prélèvement. Elle est composée de 71% de champignons et 29% de bactéries (Figure 10). Le nombre de bactéries est compris entre 3652 et 18345 souches/g de sol isolats et le nombre d'isolats fongiques s'échelonnent entre 6635 et 35768 souches/g de sol. Plusieurs espèces de souches fongiques appartenant à 3 genres différents (*Aspegillus*, *Mucor*, *Penicillium*). *Aspergillus* est le genre le plus prépondérant avec 6 espèces différentes (*A.niger*, *A. candidus*, *A.terreus*, *A.oryzae*, *A.flavus* et *A.sp*, 3 espèces de *Mucor* (*M.plumbeus*, *M. hiemalis* *M. sp*) et uniquement 2 espèces de *Penicillium* : *P.notatum* et *P.sp*.

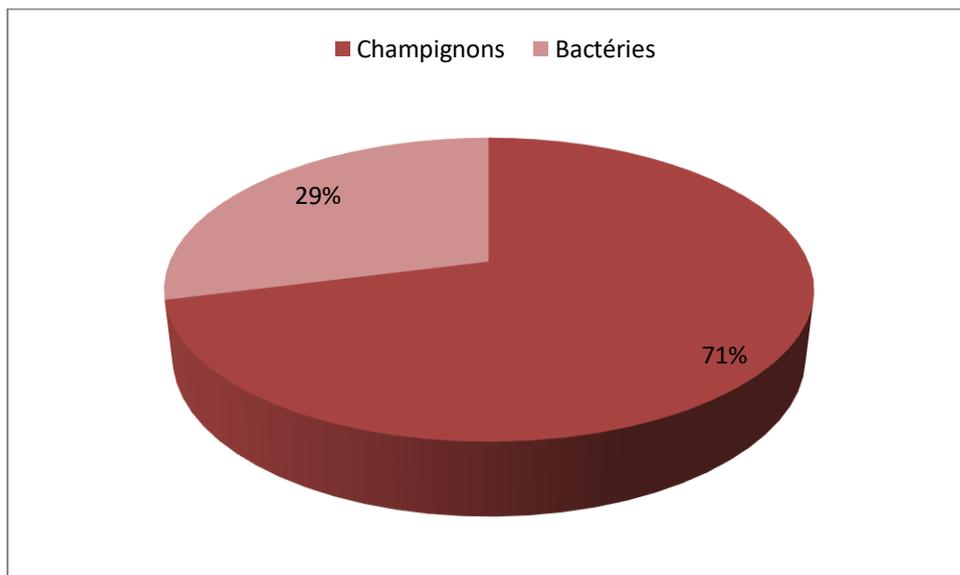


Figure 10. Microflore totale au niveau des deux sols

La différence du point de vue quantitatif et qualitatif entre les deux sols étudiés, n'est pas très prononcée. Le nombre total d'isolats varie de 19654 (36%) au niveau du sol de sétif à 34459 (64%) isolats enregistrés à partir du sol de Ain El Berda (Figure 11). Quant aux espèces, elles ne sont pas très différentes d'un sol à l'autre aussi bien pour la microflore bactérienne que celle fongique.

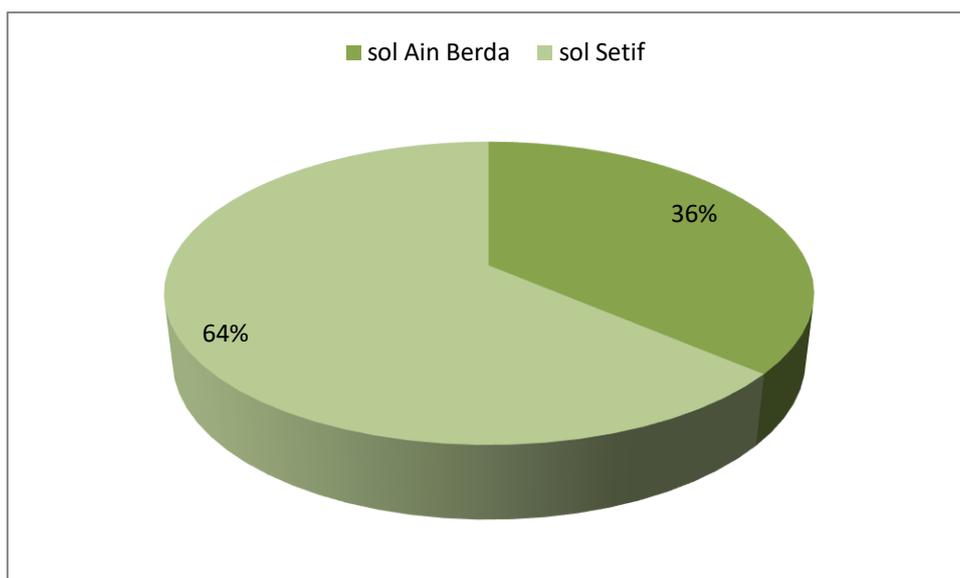


Figure 11. Répartition de la microflore dans les deux sols

2.2. Isolement à partir de la plante

Le dénombrement réalisé à partir des feuilles des plantes malades a fait ressortir un microflore variant entre 9345 souches bactériennes et 5558 souches fongiques pour la pomme de terre et 8837 souches bactériennes et 4932 souches fongiques pour les blé. La microflore en surface épiphyllée obtenue par lavage des organes est plus abondante que celle obtenue par broyage des organes végétatifs et elle représente 67% (19251 souches) de la microflore totale (Figure 12).

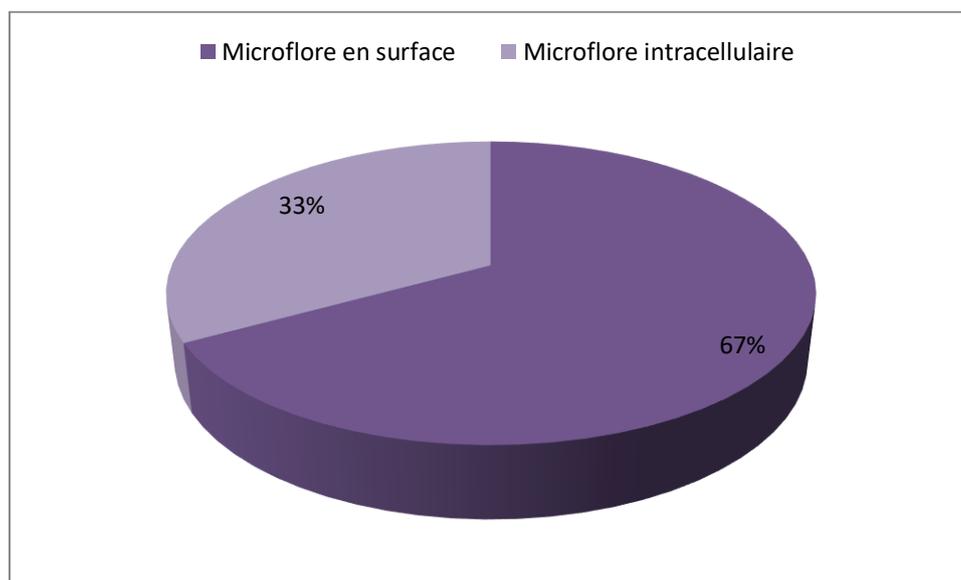


Figure 12. Répartition de la microflore de surface et intracellulaire

Des espèces variées ont été identifiées appartenant à plusieurs familles dont les *Trichocomaceae*, les *Mucoraceae*, et les *Hypocreaceae*. Les genres les plus performants parmi cet inventaire sont les *Aspergillus*, les *Mucors* et les *Penicilliums* qui sont représentés par des espèces ubiquistes telles que *Aspergillus niger*, *Aspergillus terreus*, *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus candidus*, *Mucor plumbeus*, *Mucor hiemalis*, *Penicillium notatum*. Toutes ces espèces sont des champignons qui sont transmis aux plantes via le sol ou les semences et constituent des moisissures banales qui pourraient provoquer des dégâts aux niveaux des différents organes des plantes cultivées voire même réduire le rendement agricole. En ce qui concerne la flore bactérienne, nous retrouvons le genre *Pseudomonas* représenté par les espèces *syringae* et *fluorescens*. Ces deux espèces sont spécifiques aux plantes fruitières à noyaux et pépins. Cependant, elles peuvent contaminer les plantes

maraiières et en particulier la Tomate et la Pomme de terre en provoquant des nécroses assez développées au niveau des feuilles et des fruits.

La technique d'isolement par broyage semble la moins fructueuse car le nombre de souches obtenus est inférieur par rapport aux autres techniques. Néanmoins, elle est très intéressante parce qu'elle a pour but de déceler la microflore systémique et virulente qui pénètre à l'intérieur de tissus de l'organe végétatif, atteint les processus biologiques tels que la photosynthèse, les oxydations respiratoires et la croissance. En effet, dans notre cas, les espèces détectées à partir du broyage sont celles classées parmi les plus virulentes sur le plan létal.

2.3. Identification des souches microbienne isolées

La majeure partie de la microflore isolées aussi bien du sol que des plants contaminés est composée de plusieurs espèces d'*Aspergillus*, *Penicillium*, *Mucor*. Le genre le plus représenté est l'*Aspergillus* avec 6 espèces; le moins représenté est le *Penicilium* avec respectivement 3 et 2 espèces. Ce sont des champignons qui constituent des moisissures saprophytes et ubiquistes très répandus dans les biotopes et dans tous les substrats. Il s'agit des champignons très peu exigeants qui peuvent se développer même lorsqu'ils se trouvent dans des conditions difficiles. Ce comportement fait d'eux des espèces envahissantes et antagonistes de plusieurs autres espèces et peuvent devenir pathogènes pour certaines cultures intensives. Leur présence au niveau des sols agricoles et leur passage au niveau des organes de la plante entraînent des dégâts importants et affecter ainsi les rendements.

La microflore bactérienne est plus variée. On a recensé plusieurs genres différents avec une présence significative de *Pseudomonas* avec 2 espèces virulentes (*Pseudomonas aeromonas* et *Pseudomonas cepacia* très réputées dans la contamination des sols, des plantes. Leur virulence au niveau des feuilles et des fruits a été fréquemment signalée au niveau de plusieurs cultures appartenant à plusieurs familles. Les autres espèces ou genres inventoriées (*Neisseria*, *Acinetobacter*, *Proteus*, *Salmonella*) sont des germes fréquents au niveau des sols agricoles. Elles proviennent d'une contamination ou d'une pollution par les eaux usées industrielles ou domestiques ou à la suite d'irrigation des champs par des eaux contaminées.

Tableau 6. Souches bactériennes identifiées

Taxonomie					
Règne	Division	Classe	Ordre	Famille	Genre
Bacteria	<i>Proteobacteria</i>	<i>Betaproteobacteria</i>	<i>Neisseriales</i>	<i>Neisseriaceae</i>	<i>Nesseria sp</i>
Bacteria	<i>Proteobacteria</i>	<i>Gamma</i> <i>Proteobacteria</i>	<i>Pseudomonadales</i>	<i>Moraxellaceae</i>	<i>Moraxella sp</i>
Bacteria	<i>Proteobacteria</i>	<i>Gamma</i> <i>Proteobacteria</i>	<i>Pseudomonadales</i>	<i>Pseudomonaceae</i>	<i>Pseudomonas sp</i>
Bacteria	<i>Proteobacteria</i>	<i>Gamma</i> <i>Proteobacteria</i>	<i>Aeromonadales</i>	<i>Aeromonaceae</i>	<i>Aeromonas sp</i>
Bacteria	<i>Proteobacteria</i>	<i>Gamma</i> <i>Proteobacteria</i>	<i>Pseudomonadales</i>	<i>Moraxellaceae</i>	<i>Acinetobacter sp</i>
Bacteria	<i>Proteobacteria</i>	<i>Gamma</i> <i>Proteobacteria</i>	<i>Enterobacteriales</i>	<i>Enterobacteriaceae</i>	<i>Proteus sp</i>
Bacteria	<i>Proteobacteria</i>	<i>Gamma</i> <i>Proteobacteria</i>	<i>Enterobacteriales</i>	<i>Enterobacteriaceae</i>	<i>Salmonella sp</i>
Bacteria	<i>Proteobacteria</i>	<i>Gamma</i> <i>Proteobacteria</i>	<i>Enterobacteriales</i>	<i>Enterobacteriaceae</i>	<i>Enterobacter sp</i>
Bacteria	<i>Firmicutes</i>	<i>Bacilli</i>	<i>Bacilliales</i>	<i>Bacillaceae</i>	<i>Bacillus sp</i>
Bacteria	<i>Firmicutes</i>	<i>Clostridia</i>	<i>Clostridiales</i>	<i>Clostridium</i>	<i>Clostridium sp</i>
Bacteria	<i>Proteobacteria</i>	<i>Flavobacteria</i>	<i>Flavobacteriales</i>	<i>Flavobacteriaceae</i>	<i>Chryseobacterium meningosepticum</i>
Bacteria	<i>Proteobacteria</i>	<i>Gamma</i> <i>Proteobacteria</i>	<i>Enterobacteriales</i>	<i>Enterobacteriaceae</i>	<i>Cedecea lapagei</i>
Bacteria	<i>Proteobacteria</i>	<i>Gamma</i> <i>Proteobacteria</i>	<i>Pasteurellales</i>	<i>Pasteurellaceae</i>	<i>Pasteurella pneumotropica</i>
Bacteria	<i>Proteobacteria</i>	<i>Gamma</i> <i>Proteobacteria</i>	<i>Enterobacteriales</i>	<i>Enterobacteriaceae</i>	<i>Serratia plymuthica</i>
Bacteria	<i>Proteobacteria</i>	<i>Beta</i> <i>Proteobacteria</i>	<i>Burkholderiales</i>	<i>Burkholderiaceae</i>	<i>Burkholderia cepacia</i>
Bacteria	<i>Proteobacteria</i>	<i>Gamma</i> <i>Proteobacteria</i>	<i>Vibrionales</i>	<i>Vibrionaceae</i>	<i>Vibrio fluvialis</i>
Bacteria	<i>Proteobacteria</i>	<i>Gamma</i> <i>Proteobacteria</i>	<i>Enterobacteriales</i>	<i>Enterobacteriaceae</i>	<i>Pantoea sp</i>

Tableau 7. Souches fongiques identifiées

Taxonomie					
Règne	Division	Classe	Ordre	Famille	Genre
<i>Fungi</i>	<i>Ascomycota</i>	<i>Eurotiomycetes</i>	<i>Eurotiales</i>	<i>Trichocomaceae</i>	<i>Aspergillus sp</i>
<i>Fungi</i>	<i>Ascomycota</i>	<i>Eurotiomycetes</i>	<i>Eurotiales</i>	<i>Trichocomaceae</i>	<i>Aspergillus niger</i>
<i>Fungi</i>	<i>Ascomycota</i>	<i>Eurotiomycetes</i>	<i>Eurotiales</i>	<i>Trichocomaceae</i>	<i>Aspergillus candidus</i>
<i>Fungi</i>	<i>Ascomycota</i>	<i>Eurotiomycetes</i>	<i>Eurotiales</i>	<i>Trichocomaceae</i>	<i>Aspergillus oryzae</i>
<i>Fungi</i>	<i>Ascomycota</i>	<i>Eurotiomycetes</i>	<i>Eurotiales</i>	<i>Trichocomaceae</i>	<i>Aspergillus flavus</i>
<i>Fungi</i>	<i>Zygomycota</i>	<i>Mucormycotina</i>	<i>Mucorales</i>	<i>Mucoraceae</i>	<i>Mucor sp</i>
<i>Fungi</i>	<i>Zygomycota</i>	<i>Mucormycotina</i>	<i>Mucorales</i>	<i>Mucoraceae</i>	<i>Mucor plumbeus</i>
<i>Fungi</i>	<i>Zygomycota</i>	<i>Mucormycotina</i>	<i>Mucorales</i>	<i>Mucoraceae</i>	<i>Mucor hiemelis</i>
<i>Fungi</i>	<i>Ascomycota</i>	<i>Eurotiomycetes</i>	<i>Eurotiales</i>	<i>Trichocomaceae</i>	<i>Penicillium sp</i>
<i>Fungi</i>	<i>Ascomycota</i>	<i>Eurotiomycetes</i>	<i>Eurotiales</i>	<i>Trichocomaceae</i>	<i>Penicillium notatum</i>
<i>Fungi</i>	<i>Ascomycota</i>	<i>Leotiomycetes</i>	<i>Helotiales</i>	<i>Sclerotiniaceae</i>	<i>Botrytis cinera</i>
<i>Fungi</i>	<i>Ascomycota</i>	<i>Dothideomycetes</i>	<i>Pleosporales</i>	<i>Pleosporaceae</i>	<i>Alternaria alternata</i>
<i>Fungi</i>	<i>Ascomycota</i>	<i>Sordariomycetes</i>	<i>Hypocreales</i>	<i>Necteriaceae</i>	<i>Fusarium culmorum</i>

3. Etude in vitro de l'effet biopesticide des extraits des deux espèces d'Eucalyptus

3.1. Evaluation de l'effet antifongique

✚ Selon la technique de la diffusion sur milieu solide

D'une manière globale, les extraits des deux espèces d'Eucalyptus semblent être efficaces face aux différents agents fongiques testés (Figure 13). Les zones d'inhibitions sont comprises entre 18,66 mm et 20,66 mm pour l'extrait d'*Eucalyptus camaldulensis* et 17,33 mm et 21,88 mm pour l'extrait d'*Eucalyptus globulus*.

D'après le test t de Student, il apparait des différences significatives ($P \leq 0,05$) entre l'activité du pesticide et celle de la solution mère de l'extrait ainsi que celle des dilutions au 1/2 et 1/4 d'*Eucalyptus camaldulensis* et d'*Eucalyptus globulus*. Toutefois le pouvoir antifongique des extraits d'*Eucalyptus globulus* est plus élevé que celui des extraits d'*Eucalyptus camaldulensis* et du pesticide

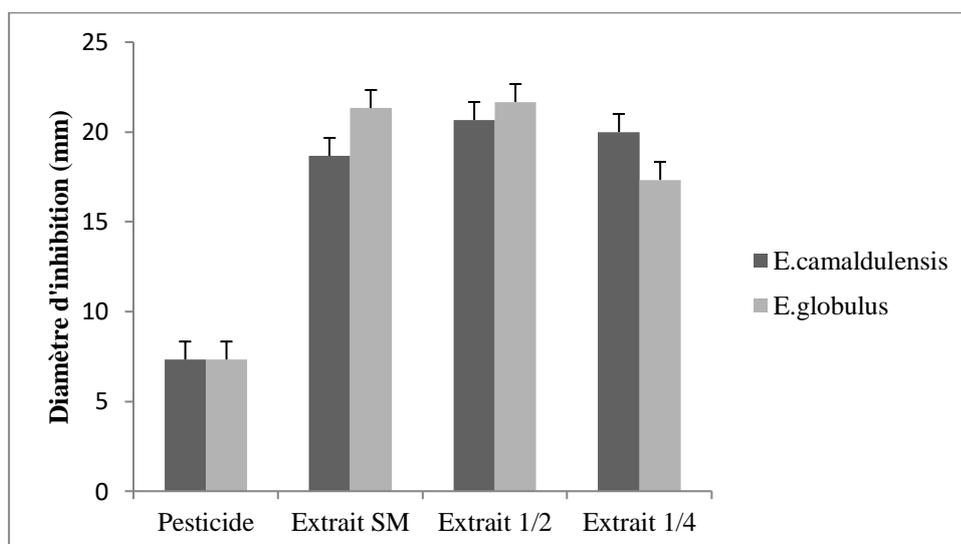


Figure 13. Diamètre d'inhibition de *Aspergillus niger* en présence des extraits des deux espèces d'Eucalyptus

Pour ce qui est du *Fusarium culmorum*, Les zones d'inhibitions sont comprises entre 17 mm et 23 mm pour l'extrait d'*Eucalyptus camaldulensis* et 10 mm et 32 mm pour l'extrait d'*Eucalyptus globulus* (Figure 14).

D'après le test t de Student, il apparait des différences significatives ($P \leq 0,05$) entre l'activité du pesticide et celle de la solution mère de l'extrait ainsi que celle de la dilution au 1/2 d'*Eucalyptus camaldulensis* et la dilution au 1/4 d'*Eucalyptus globulus*. Toutefois le pouvoir antifongique des extraits d'*Eucalyptus camaldulensis* est plus élevé que celui des extraits d'*Eucalyptus globulus* et du pesticide.

Nous avons pu observer des différences non significatives ($P > 0.05$) entre l'activité du pesticide et celle de la solution mère de l'extrait brut et de la dilution au 1/2 d'*Eucalyptus globulus*, ainsi que de la dilution au 1/4 de l'extrait polyphénolique d'*Eucalyptus camaldulensis*.

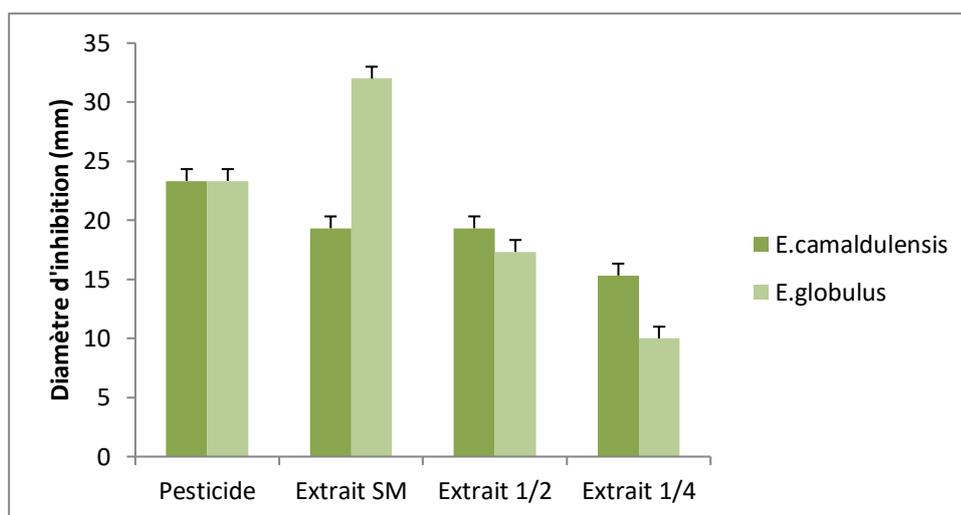


Figure 14. Diamètre d'inhibition de *Fusarium culmorum* en présence des extraits des deux espèces d'Eucalyptus

En présence du *Mucor plumbeus*, les extraits ont donné des zones d'inhibitions qui sont comprises entre 13 mm et 25 mm pour l'extrait d'*Eucalyptus camaldulensis* et 8 mm et 25 mm pour l'extrait d'*Eucalyptus globulus* (Figure 15).

Selon le test t de Student, il apparait des différences significatives ($P \leq 0,05$) entre l'activité de la solution mère de l'extrait ainsi que celle de la dilution au 1/2 d'*Eucalyptus camaldulensis* et la dilution au 1/4 d'*Eucalyptus globulus*. Toutefois le pouvoir antifongique des extraits d'*Eucalyptus camaldulensis* et de l'*Eucalyptus globulus* paraissent assez rapprochés.

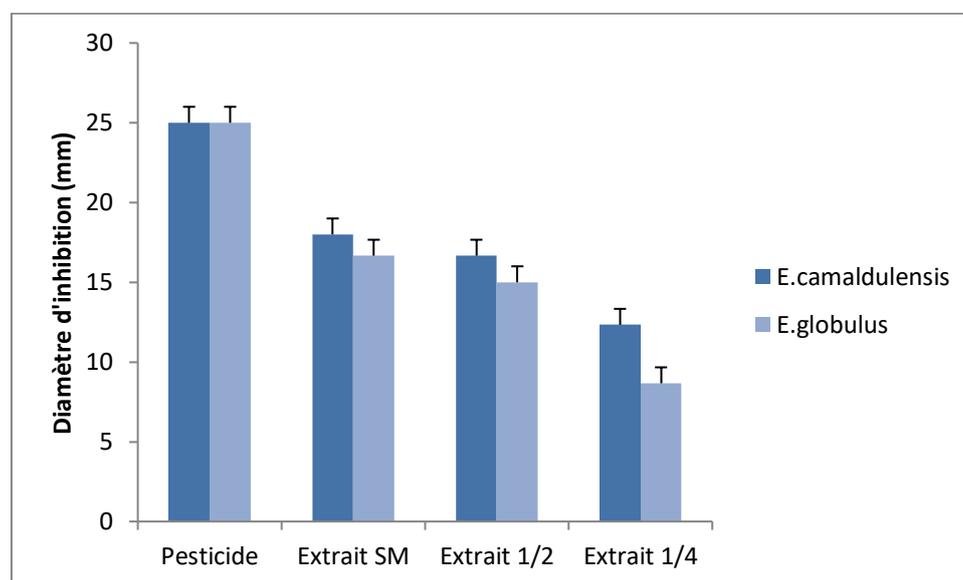


Figure 15. Diamètre d'inhibition de *Mucor plumbeus* en présence des extraits des deux espèces d'*Eucalyptus*

Le *Botrytis cinerea*, espèce réputée pour ces dégâts sur les organes végétatifs et les fruits a montré une certaine sensibilité face aux différentes concentrations des deux extraits (Figure 16). Les zones d'inhibitions sont comprises entre 8,66 mm et 12,33 mm pour l'extrait d'*Eucalyptus camaldulensis* et 10,33 mm et 14,66 mm pour l'extrait d'*Eucalyptus globulus*. Si l'on se réfère aux diamètres d'inhibition provoqués par le pesticide chimique, nous constatons que les diamètres dans ce cas sont plus bas (8,66 mm).

D'après le test t de Student, il apparait des différences significatives ($P \leq 0,05$) entre l'activité de la solution mère de l'extrait ainsi que celle de la dilution au 1/2 d'*Eucalyptus camaldulensis* et la dilution au 1/4 d'*Eucalyptus globulus*. Toutefois le pouvoir antifongique des extraits d'*Eucalyptus globulus* est plus élevé que celui des extraits d'*Eucalyptus camaldulensis*.

Nous avons pu observer des différences significatives ($P \leq 0.05$) entre l'activité du pesticide et celle de la solution mère de l'extrait polyphénolique et de la dilution au 1/2 d'*Eucalyptus globulus*, ainsi que de la dilution au 1/4 de l'extrait brut d'*Eucalyptus camaldulensis*.

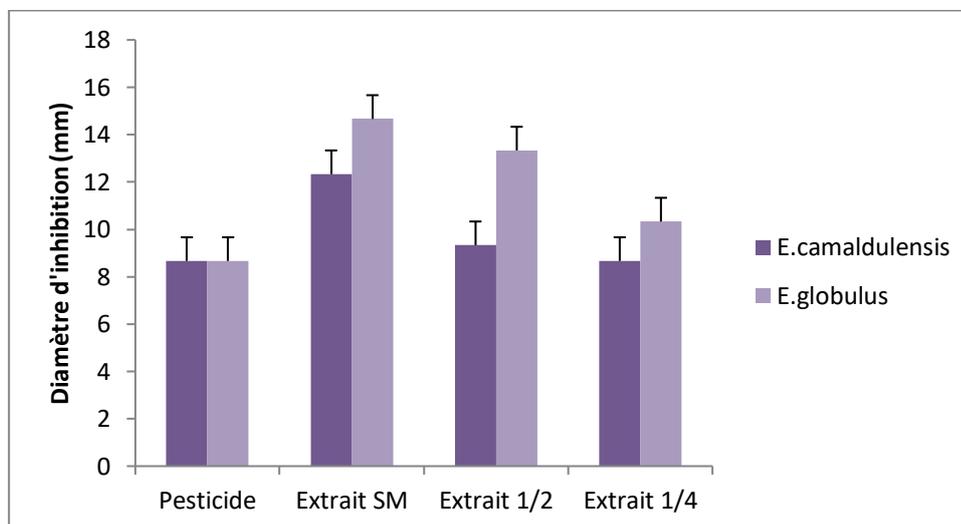


Figure 16. Diamètre d'inhibition de *Botrytis cinera* en présence des extraits des deux espèces d'Eucalyptus

La figure 17, représente l'effet des différentes substances testées sur *Penicillium notatum*.

D'une manière globale, le *Penicillium notatum* semble être moins affecté par le pesticide conventionnel avec seulement 8,66 mm. Les extraits des deux espèces d'Eucalyptus qui ont donné des zones d'inhibitions comprises entre 13,33 mm et 24,66 mm.

D'après le test t de Student, il apparait des différences significatives ($P \leq 0,05$) entre l'activité du pesticide et celle de la solution mère de l'extrait ainsi que celle de la dilution au 1/2 d'*Eucalyptus camaldulensis* et la dilution au 1/4 d'*Eucalyptus globulus*. Toutefois le pouvoir antifongique des extraits d'*Eucalyptus camaldulensis* est plus élevé que celui des extraits d'*Eucalyptus globulus* et du pesticide.

Toutefois le pouvoir antifongique des extraits d'*Eucalyptus globulus* est plus élevé que celui des extraits d'*Eucalyptus camaldulensis* et du pesticide.

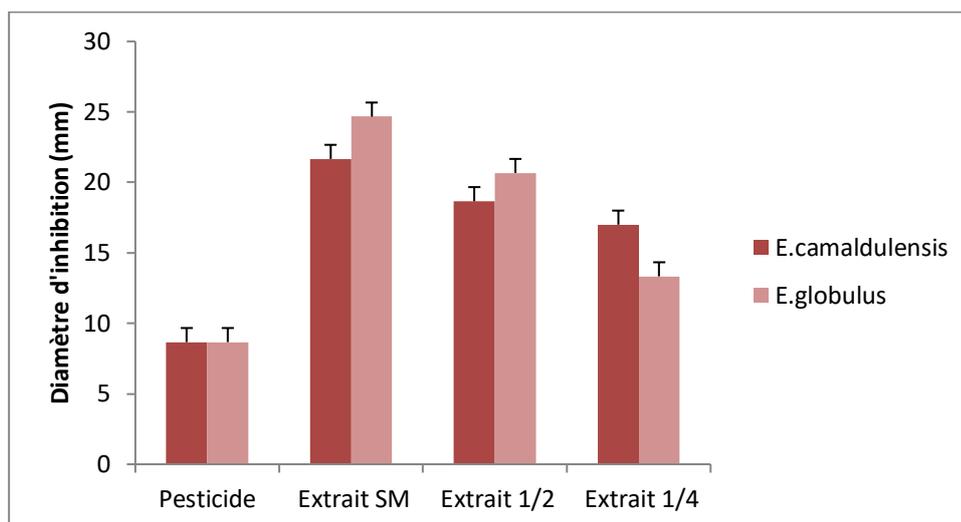


Figure 17. Diamètre d'inhibition de *Penicillium notatum* en présence des extraits des deux espèces d'Eucalyptus

✚ Selon la technique de l'incorporation de l'extrait dans le milieu de culture liquide

Pour *Alternaria alternata* les résultats obtenus montrent une stimulation importante de l'activité antifongique d'*E.camaldulensis* (14,33%) et *E.globulus* (13,66%), néanmoins elle demeure moins importante que celle du pesticide et du Vidan 25 EC (0,41%).

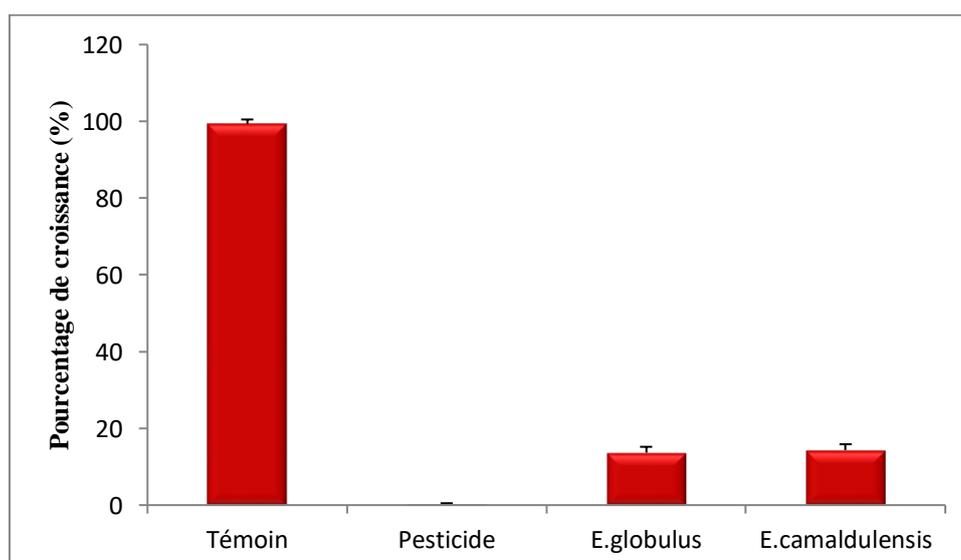


Figure 18. Effet des différentes substances testées sur la croissance d'*Alternaria alternata*

Aspergillus niger montre une sensibilité considérable vis-a-vis des deux extraits polyphénoliques qui se traduit par un pourcentage de croissance de 21,33% pour *E.camaldulensis* et 18% pour *E.globulus*. En revanche, le Vidan reste le plus efficace avec un pourcentage de croissance de 1,16% (Figure 19).

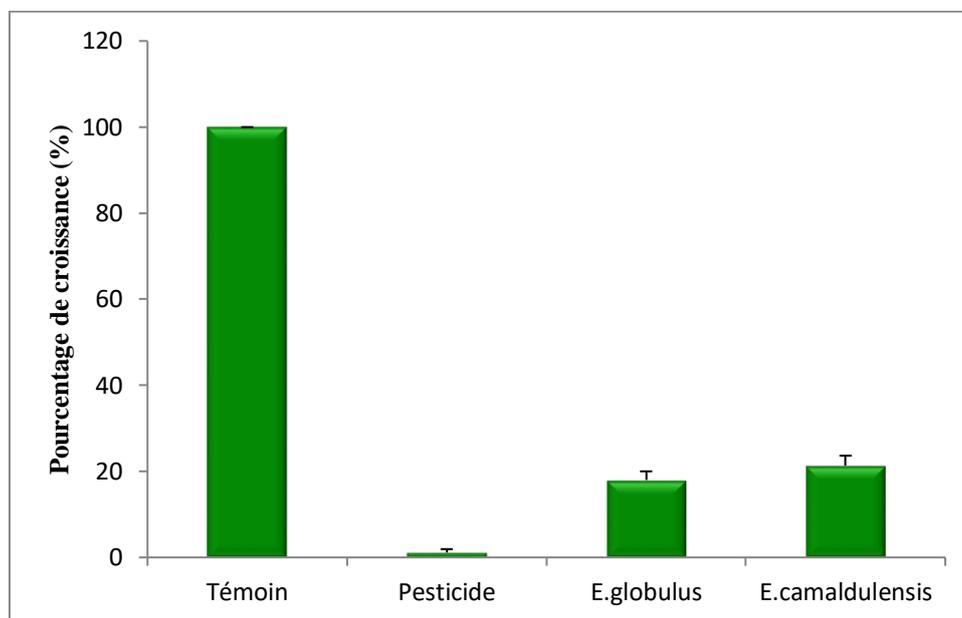


Figure 19. Effet des différentes substances testées sur la croissance d'*Aspergillus niger*

La croissance mycelienne du *Fusarium culmorum* sous l'effet des différentes substances, semble être réduite comparativement au témoin, avec des pourcentages de croissance relativement bas (Figure 20).

On note 16,27% pour l'extrait d'*E.globulus*, 13,33% pour *E.camaldulensis* et 0,58% pour le pesticide témoin positif.

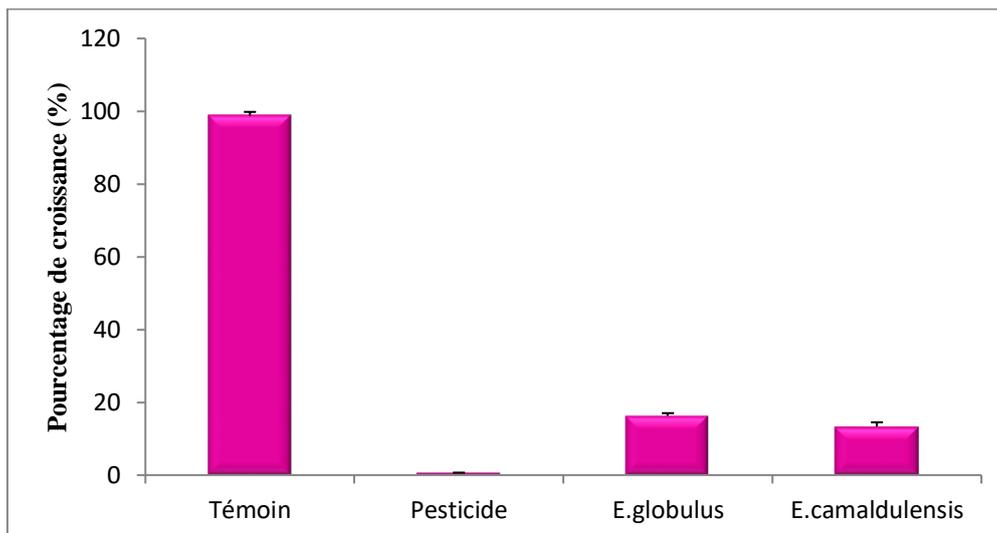


Figure 20. Effet des différentes substances testées sur la croissance *Fusarium culmorum*

Les résultats obtenus avec *Mucor plumbeus* face aux extraits des deux espèces d'Eucalyptus révèlent un fort pouvoir inhibiteur de sa croissance mycélienne en comparaison avec le pourcentage de croissance de 100 % pour le témoin.

On constate que les pourcentages de croissance face aux extraits des deux espèces d'Eucalyptus sont semblables, 17% pour *E.globulus* et 16% pour *E.camaldulensis*. Cependant le Vidan reste très efficace contre la prolifération mycelienne avec un taux de 1,25%.

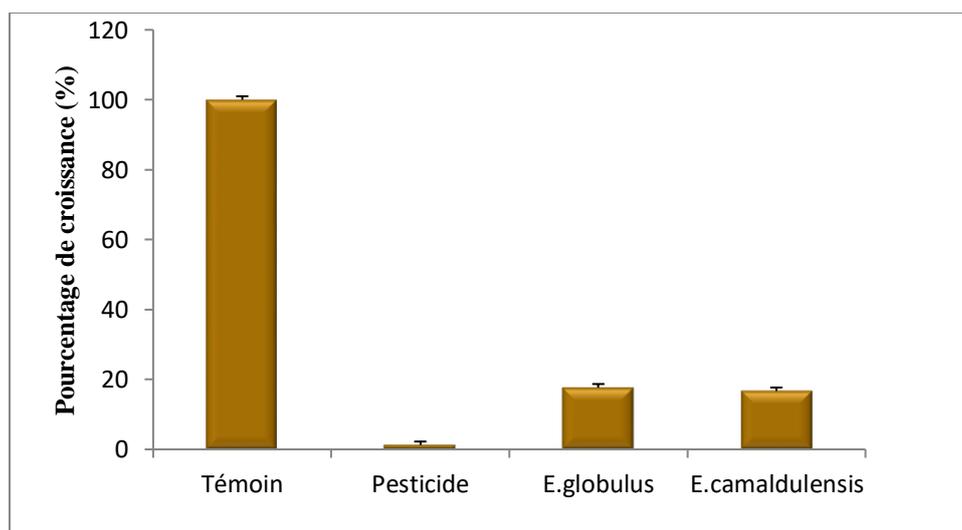


Figure 21. Effet des différentes substances testées sur la croissance de *Mucor plumbeus*

La figure 22, retrace l'effet des extraits des deux espèces d'Eucalyptus sur la croissance mycelienne de *Botrytis cinera*.

On remarque que *Botrytis cinera*, semble être plus sensible face à l'extrait d'*E.globulus* avec un pourcentage de croissance de l'ordre de 13,66% qu'à l'extrait d'*E.camaldulensis* (15,33%). Toutefois le fongicide demeure plus efficace avec une croissance mycelienne de 0,76%.

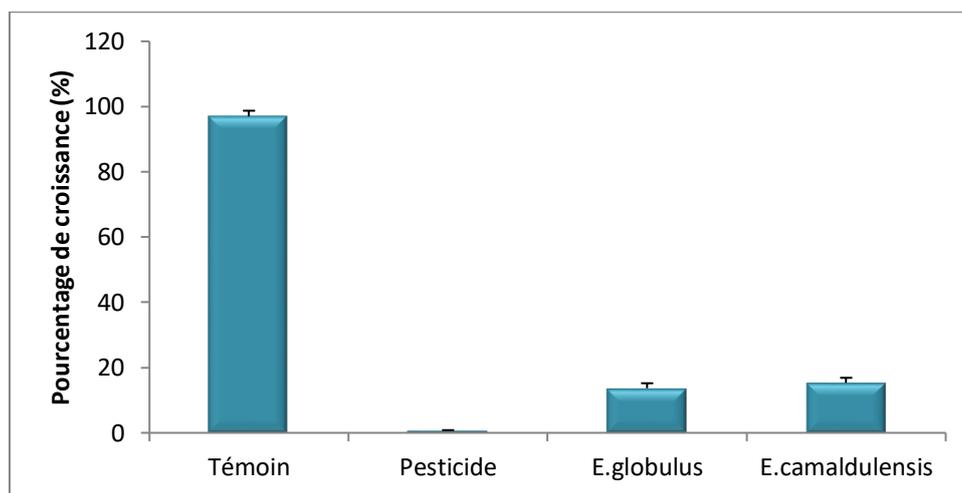


Figure 22. Effet des différentes substances testées sur la croissance de *Botrytis cinera*

Pour *Penicillium notatum*, l'effet des extraits des deux espèce d'Eucalyptus se traduit par des pourcentages de croissance bas, comparativement au témoin, à savoir 20,66% pour *E.globulus* et 22,66% pour *E.camaldulensis*. mais le fongicide demeure très efficace avec un taux de 0,89% (Figure 23).

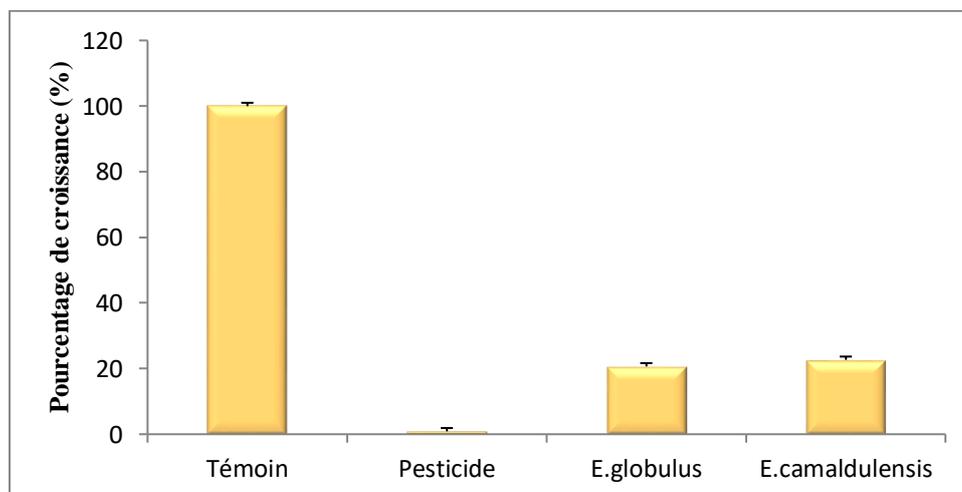


Figure 23. Effet des différentes substances testées sur la croissance de *Penicillium notatum*

3.2. Evaluation de l'effet antibactérien

✚ Selon la technique de la diffusion sur milieu solide

D'une manière globale, les extraits semblent être moins efficaces en présence des bactéries par comparaison au résultats obtenus en présence de champignons. cependant leur effets est meilleur que celui du pesticide de synthèse. Parmi tout le panel des souches testées, les souches de *Chryseobacterium meningosepticum* et *Cedecea lapagei* sont celles qui ont montré des zones d'inhibitions plus importantes avec des valeurs comprises entre 5,83 et 18 mm. Un pouvoir antibactérien moyen ou modeste des extraits vis à vis des espèces *Pasteurella pneumotropica* et *Burkholderia cepacia*. La souche *Serratia plymuthyca* se situe parmi celles qui sont les plus résistantes aux extraits naturels contrairement à son comportement face au pesticide de synthèse.

L'analyse statistique confirme par le test de student, la sensibilité des unes et la résistance des autres et montre également les différences de comportement des espèces face aux différentes substances, à différentes concentrations.

En ce qui concerne *Pasteurella pneumotropica*, les zones d'inhibitions sont comprises entre 6,33 mm et 10 mm pour l'extrait d'*Eucalyptus camaldulensis* et 4,5 mm et 6,33 mm pour l'extrait d'*Eucalyptus globulus*.

D'après le test t de Student, il apparait des différences significatives ($P \leq 0,05$) entre l'activité du pesticide et celle de la solution mère de l'extrait ainsi que celle de la dilution au 1/2 d'*Eucalyptus camaldulensis* et la dilution au 1/4 d'*Eucalyptus globulus*. Toutefois le pouvoir antibactérien des extraits d'*Eucalyptus camaldulensis* est plus élevé que celui des extraits d'*Eucalyptus globulus* et du pesticide.

l'analyse statistique, montre des différences non significatives ($P > 0.05$) entre l'activité du pesticide, celle de la solution mère, la dilution au 1/2 de l'extrait hydro-méthanolique d'*Eucalyptus globulus*, ainsi que de la dilution au 1/4 de l'extrait brut d'*Eucalyptus camaldulensis*. Ce dernier reste plus actif que les extrait d'*Eucalyptus globulus* et le pesticide de synthèse.

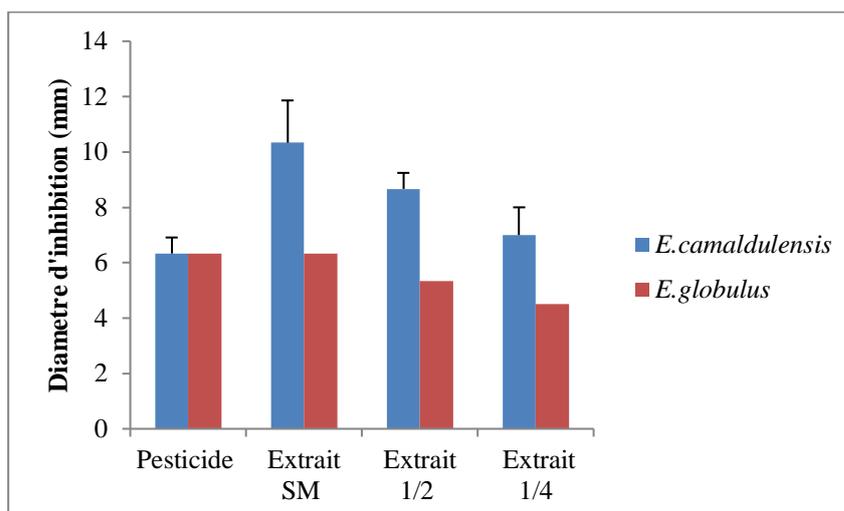


Figure 24. Diamètre d'inhibition de *Pasteurella pneumotropica* en présence des extraits des deux espèces d'Eucalyptus

Burkholderia cepacia, semble également être inhibé par toutes les substances testées (pesticides SM, 1/2, et 1/4 de l'extrait brut), avec des halos différents dont le diamètre varie entre 5,66 et 10,83mm pour *Eucalyptus camaldulensis* et 4,66 et 7mm pour *Eucalyptus globulus*.

Selon le P de signification du Test t de Student, il apparaît des différences non significatives ($P \geq 0,05$) entre l'activité du pesticide conventionnel et celle des dilutions d'*Eucalyptus camaldulensis*, de la solution mère et les dilutions de l'extrait d'*Eucalyptus globulus*. Cependant, des différences hautement significatives ont été notées ($P \leq 0.01$) entre le pesticide et la solution mère de l'extrait d'*Eucalyptus camaldulensis*.

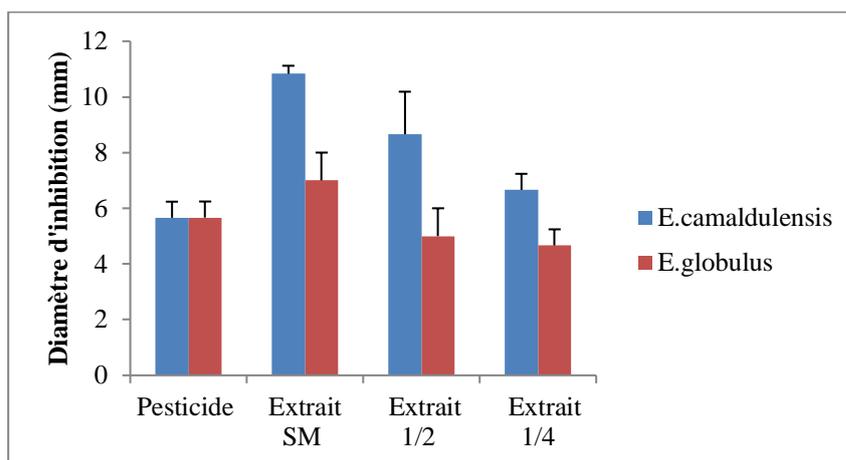


Figure 25. Diamètre d'inhibition de *Burkholderia cepacia* en présence des extraits des deux espèces d'Eucalyptus

Les extraits naturels manifestent une perturbation du développement de *Serratia plymuthyca* (figure 26), cette dernière se traduit par des diamètres d'inhibition variant de 4,83mm pour le fongicide et l'extrait d'*E.camaldulensis* dilué au 1/4 à 7mm pour la solution mère de l'extrait d'*E.camaldulensis*.

D'après l'analyse statistique, il semble y avoir des différences non significatives ($P \geq 0,05$) entre l'effet du fongicide et celui des extraits naturelles. Ces derniers semblent être plus efficaces. Des différences significatives ($P \leq 0.05$) ont été notées entre l'effet du pesticide et celui des extraits dilué au 1/2.

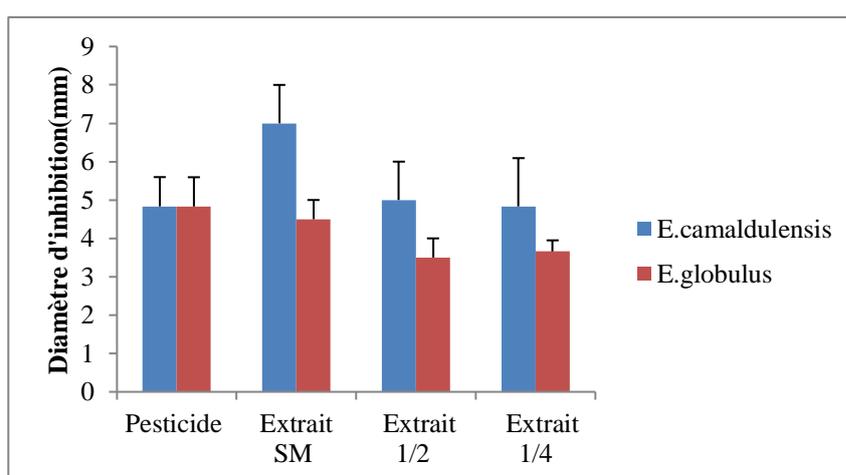


Figure 26. Diamètre d'inhibition de *Serratia plymuthyca* en présence des extraits des deux espèces d'Eucalyptus

La souche de *Cedecea lapagei*, semble être inhibée par les substances testées à savoir le fongicide, SM, 1/2 et 1/4, des deux extraits, avec des zones d'inhibition comprises entre 7,16 et 18mm pour *Eucalyptus camaldulensis* et 7,16 et 12mm pour *Eucalyptus globulus*. (figure 27).

Des différences non significatives ($P \geq 0.05$) ont été observées entre l'activité du pesticide et de l'extrait 1/2 d'*Eucalyptus camaldulensis* ainsi que les extraits 1/2 et 1/4 d'*Eucalyptus globulus*. Nous constatons des différences significatives entre le pesticide et la dilution 1/2 de l'extrait d'*Eucalyptus camaldulensis*. Néanmoins, nous enregistrons des différences hautement significatives ($P \leq 0.01$) entre l'activité de la solution mère de l'extrait d'*Eucalyptus globulus* et le pesticide. En outre, des différences très hautement significatives ($P < 0.001$) ont été noté entre le pesticide et l'extrait SM d'*Eucalyptus camaldulensis*.

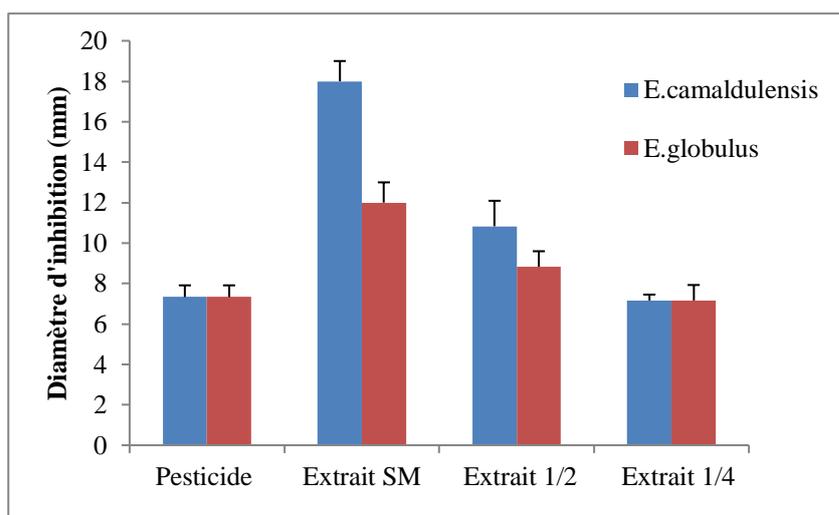


Figure 27. Diamètre d'inhibition de *Cedecea lapagei* en présence des extraits des deux espèces d'Eucalyptus

D'une manière globale, les substances naturelles testées semblent avoir un effet inhibiteur sur *Chryseobacterium meningosepticum* avec des halos compris entre 4,83 et 7,66mm pour *Eucalyptus camaldulensis* et 4,83 et 10,83mm pour *Eucalyptus globulus* (figure 28).

l'étude statistique montre des différences très hautement significatives ($P < 0.01$) entre la solution mère de l'extrait d'*Eucalyptus globulus* et le pesticide chimique. le test t dévoile des différence hautement significatives ($P \leq 0.1$) entre le pesticide et l'effet de l'extrait d'*Eucalyptus globulus* dilué au 1/2 et au 1/4. Par contre, des différences significatives ($P \leq 0.05$) ont été constatées entre l'extrait concentré d'*Eucalyptus camaldulensis* et le pesticide. Néanmoins, nous observons des différences non significatives ($P \geq 0.05$) entre l'effet inhibiteur des extraits d'*Eucalyptus camaldulensis* dilués au 1/2 et au 1/4 et l'effet du pesticide.

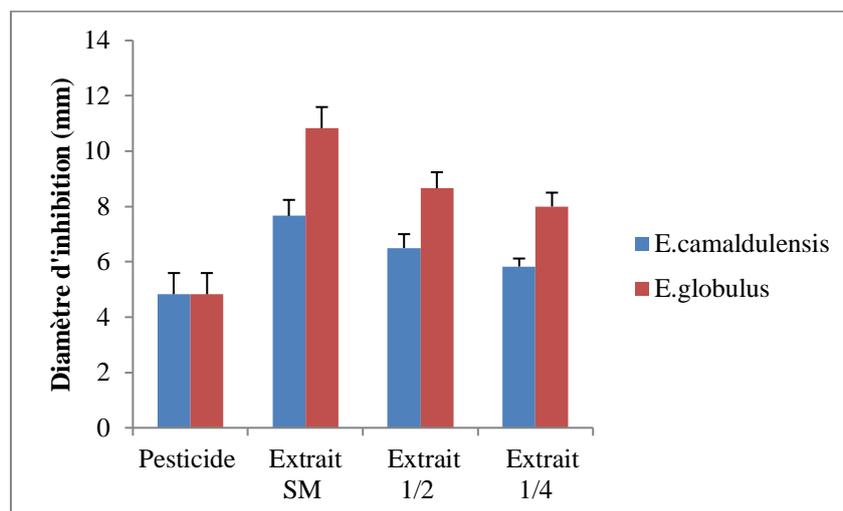


Figure 28. Diamètre d'inhibition de *Chryseobacterium meningosepticome* en présence des extraits des deux espèces d'Eucalyptus

✚ Selon la technique de l'incorporation de l'extrait dans le milieu de culture liquide

La croissance de *Pasteurella pneumotropica* semble être perturbée par la présence des différentes substances testées (Figure 29).

Nous constatons un effet inhibiteur des extraits des deux espèces d'Eucalyptus, meilleurs que celui du Vidan 25 EC. (pesticide) Cet effet est démontré par un pourcentage de croissance plus bas. 35,83 % pour l'extrait *d'E.camaldulensis*, 21,95 % pour l'extrait *d'E.globulus* et 63,14 % pour le Vidan 25 EC.

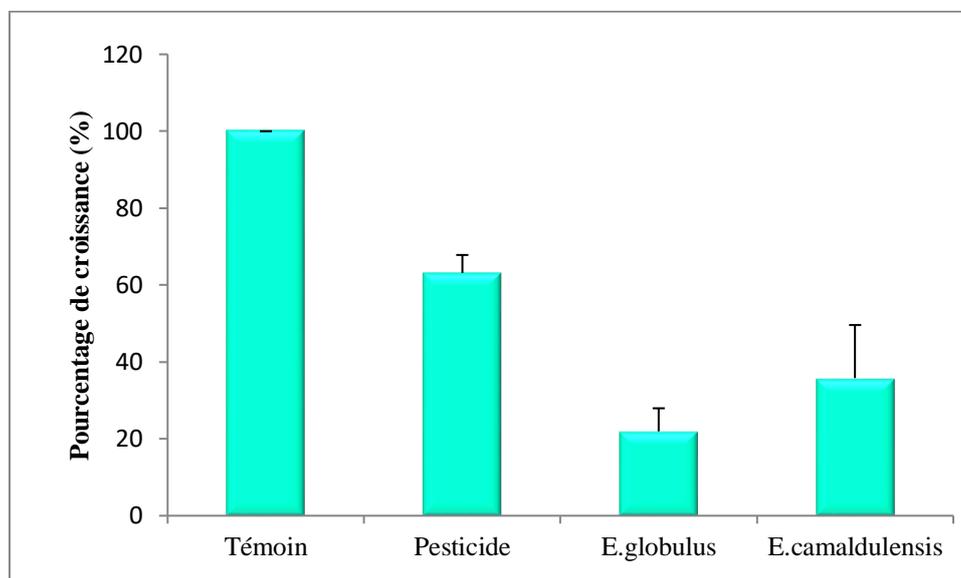


Figure 29. Effet des différentes substances testées sur la croissance de *Pasteurella pneumotropica*

Burkholderia cepacia semble être plus sensible vis-à-vis des deux extraits (Figure 30). Cette sensibilité se traduit par un pourcentage de croissance de 41,55% avec l'extrait *d'Eucalyptus globulus* et 34,67% pour l'extrait *d'Eucalyptus camaldulensis*, alors que pour le pesticide Vidan, le pourcentage de croissance est de l'ordre de 61,62 %.

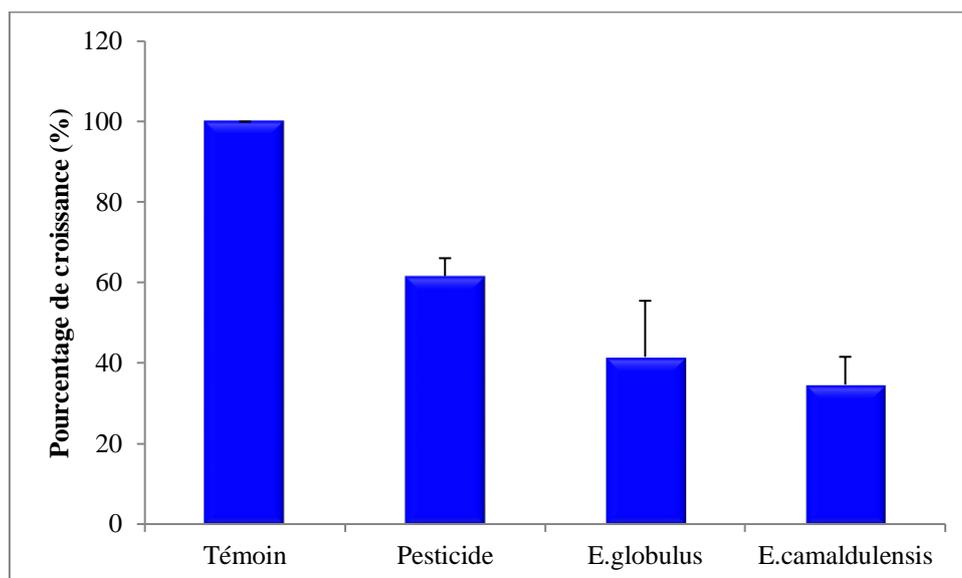


Figure 30. Effet des différentes substances testées sur la croissance de *Burkholderia cepacia*

Une forte baisse du pourcentage de croissance de *Serratia plymuthyca* est enregistrée face au pesticide de synthèse (4,33%) et cette réduction de la croissance est encore plus importante en présence de l'extrait d'*Eucalyptus globulus* (1,48%) ainsi que celui de l'extrait d'*Eucalyptus camaldulensis* (0,71%).

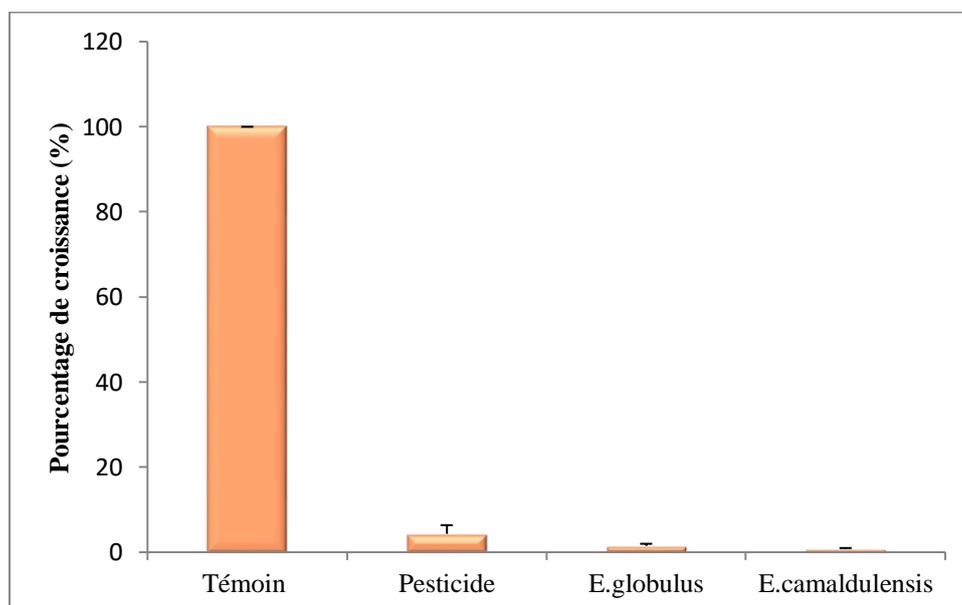


Figure 31. Effet des différentes substances testées sur la croissance de *Serratia plymuthyca*

L'impact des différentes substances testées, montre une baisse du pourcentage de croissance de *Cedecea lapagei* mise en contact avec l'extrait d'*Eucalyptus globulus* (38,75%) et l'extrait d'*Eucalyptus camaldulensis* (46,32%), néanmoins ces taux restent plus élevés que celui du pesticide (1,83%).

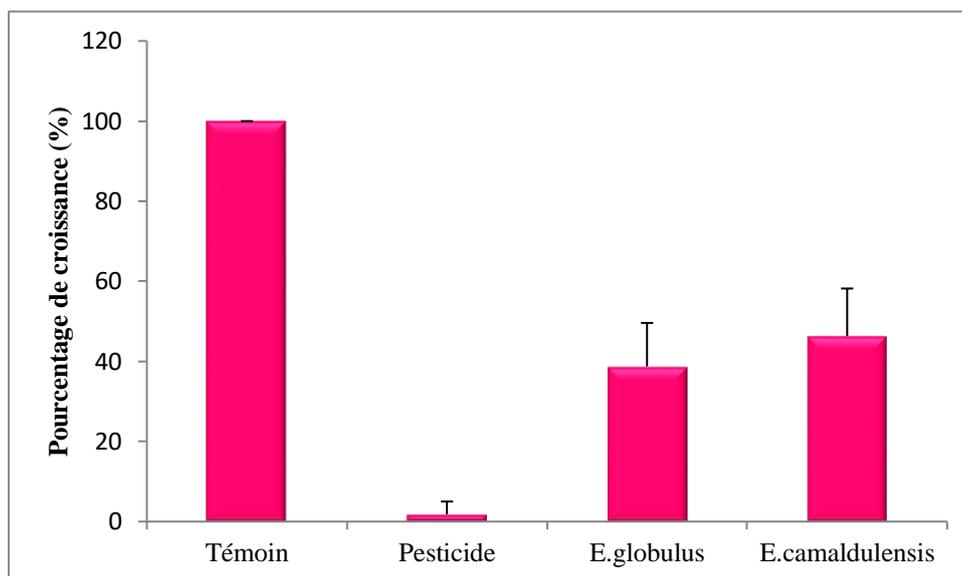


Figure 32. Effet des différentes substances testées sur la croissance de *Cedecea lapagei*

Pour *Chryseobacterium meningosepticum*, l'effet des deux extraits se traduit par une baisse du pourcentage de croissance comparativement au témoin, à savoir 33,63% pour *E.globulus* et 23,63% pour *E.camaldulensis*, mais l'effet du fongicide s'avère moins efficace avec un taux de 57,18%.

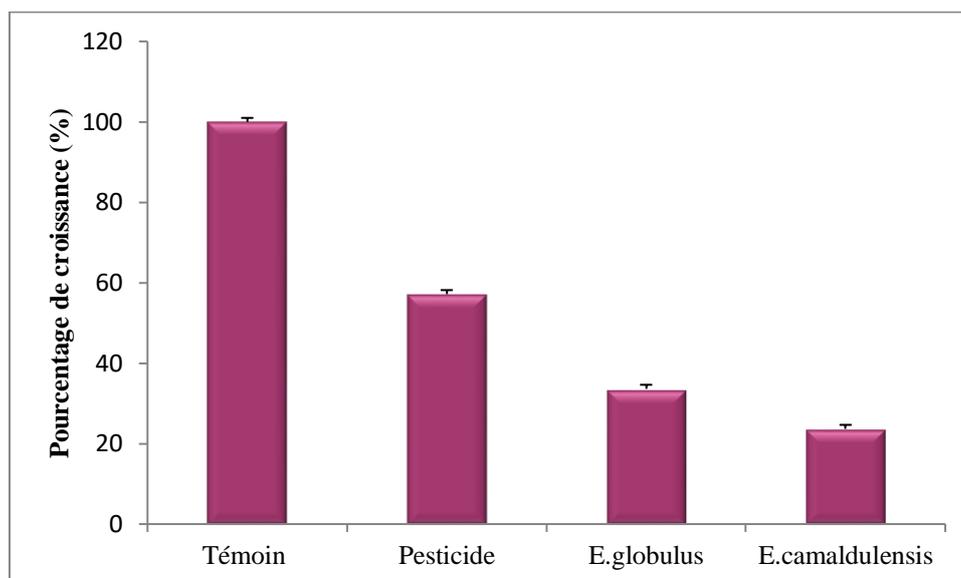


Figure 33. Effet des différentes substances testées sur la croissance de *Chryseobacterium meningosepticum*

3.3. Evaluation de l'effet bactériostatique/bactéricide et fongistatique/fongicide

Les extraits de *E.camaldulensis* et *E.globulus* se sont montrés très actifs sur la croissance bactérienne avec des CMI et des CMB notables. D'une manière globale, *E.camaldulensis* semble plus efficace, la CMI la plus élevée enregistrée est de 0,017g/ml qui correspond à la dilution au 1/32 et la CMB la plus élevée est de l'ordre de 0,068g/ml pour *Cedecea lapagei* et *Chryseobacterium meningosepticum*. Par contre les CMI et les CMB de *E.globulus* sont de l'ordre de 0,056g/ml qui est l'équivalent à la dilution au 1/8 et des CMB à 0,225g/ml et (1/4).

En ce qui concerne la croissance de *Burkholderia cepacia* et *Serratia plymuthyca*, les CMI des extraits d'*Eucalyptus camaldulensis* et *Eucalyptus globulus* correspondent consécutivement à 0,034g/ml et 0,028g/ml ; à la dilution au 1/16 et CMB à 0,137g/ml et 0,112g/ml ; dilution au 1/16.

L'étude a révélé des valeurs de CMI et CMF similaires entre les deux extraits des deux espèces végétales sur la croissance fongique, à savoir une CMI de 0,068/ml et une CMF de 0,225g/ml pour *Aspergillus niger*, *Fusarium culmorum*, *Botrytis cinerea*.

Les souches fongiques de *Penicillium notatum*, *Alternaria alternata* et *Mucor plumbeus* se sont montrées plus sensibles avec une CMF de 0,137g/ml.

Tableau 8. Concentrations minimales inhibitrices et bactéricides (CMI, CMB) des extraits des deux espèces d'Eucalyptus

	<i>Eucalyptus camaldulensis</i>		<i>Eucalyptus globulus</i>	
	CMI	CMB	CMI	CMB
<i>Cedecea lapagei</i>	0,017g/ml (1/32)	0,068g/ml (1/8)	0,056g/ml (1/8)	0,225g/ml (1/2)
<i>Burkholderia cepacia</i>	0,034g/ml (1/16)	0,137g/ml (1/4)	0,028g/ml (1/16)	0,112g/ml (1/4)
<i>Cerratia plymuthyca</i>	0,034g/ml (1/16)	0,137g/ml (1/4)	0,028g/ml (1/16)	0,112g/ml (1/4)
<i>Pasteurella pneumotropica</i>	0,068g/ml (1/8)	0,275g/ml (1/2)	0,056g/ml (1/8)	0,225g/ml (1/2)
<i>Chryseobacterium meningosepticum</i>	0,017g/ml (1/32)	0,068g/ml (1/8)	0,056g/ml (1/8)	0,225g/ml (1/2)

Tableau 9. Concentrations minimales inhibitrices et fongicide (CMI, CMF) des extraits des deux espèces d'Eucalyptus

	<i>Eucalyptus camaldulensis</i>		<i>Eucalyptus globulus</i>	
	CMI	CMF	CMI	CMF
<i>Penicillium notatum</i>	0,034g/ml (1/16)	0,137g/ml (1/4)	0,028g/ml (1/16)	0,112g/ml (1/4)
<i>Aspergillus niger</i>	0,068g/ml (1/8)	0,275g/ml (1/2)	0,056g/ml (1/8)	0,225g/ml (1/2)
<i>Fusarium culmorum</i>	0,068g/ml (1/8)	0,275g/ml (1/2)	0,056g/ml (1/8)	0,225g/ml (1/2)
<i>Alternaria alternata</i>	0,034g/ml (1/16)	0,137g/ml (1/4)	0,028g/ml (1/16)	0,112g/ml (1/4)
<i>Botrytis cinerea</i>	0,068g/ml (1/8)	0,275g/ml (1/2)	0,056g/ml (1/8)	0,225g/ml (1/2)
<i>Mucor plumbeus</i>	0,034g/ml (1/16)	0,137g/ml (1/4)	0,028g/ml (1/16)	0,112g/ml (1/4)

3.4. Cinétique de la croissance microbienne sous l'effet des extraits par la méthode de la culture discontinue en mode batch

✚ Evaluation de la cinétique de la turbidimétrie (D.O)

D'une manière globale nous constatons une diminution de la cinétique de la turbidité, et ceci en fonction des différents temps d'incubation et face aux différentes substances testées. En outre, l'allure des graphiques obtenus avec les différentes souches testées est assez semblables pour toutes les substances étudiées (*Eucalyptus camaldulensis*, *Eucalyptus globulus* et Vidan 25 EC). Les cinétiques des témoins sont très différentes pour toutes les souches.

Les cinétiques de croissance du *Penicillium notatum*, d'*Aspergillus niger*, du *Fusarium culmorum* et *Mucor plumbeus* en présence du pesticide, semblent les plus faibles par rapport à celles des témoins et en présence des extraits des deux espèces d'Eucalyptus.

Cependant, nous observons une activité similaire des extraits des deux espèces d'Eucalyptus et du Vidan vis-à-vis de la croissance de la souche virulente d'*Alternaria alternata*.

Les extraits d'*E.globulus* et *E.camaldulensis*, semblent avoir un effet plus important que celui du pesticide sur la croissance de *Botrytis cinerea*, souche réputée pour son pouvoir pathogène se traduisant par une baisse de turbidimétrie.

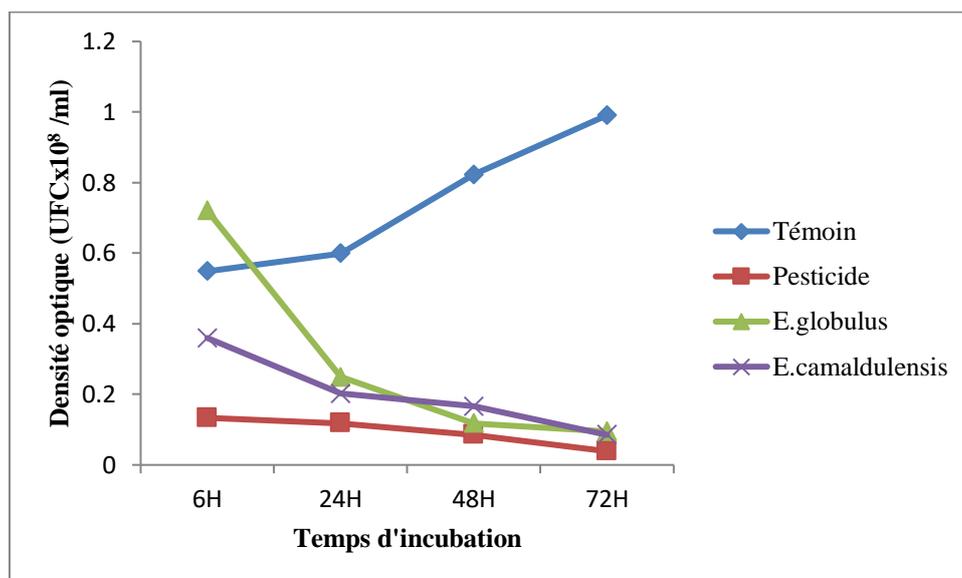


Figure 34. Variation des D.O de *Penicillium notatum* en présence du pesticide et des extraits des deux espèces d'Eucalyptus

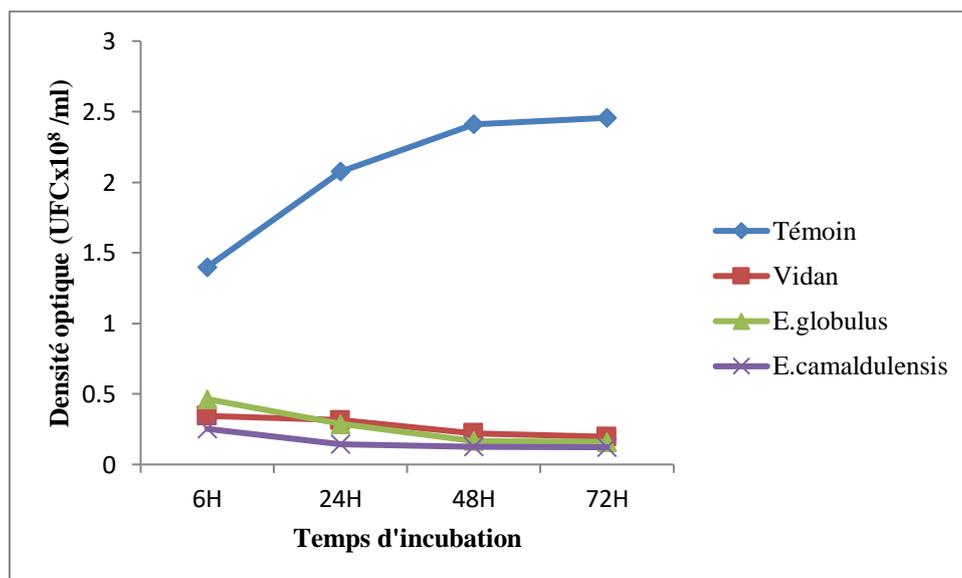


Figure 35. Variation des D.O d'*Alternata alternata* en présence du pesticide et des extraits des deux espèces d'Eucalyptus

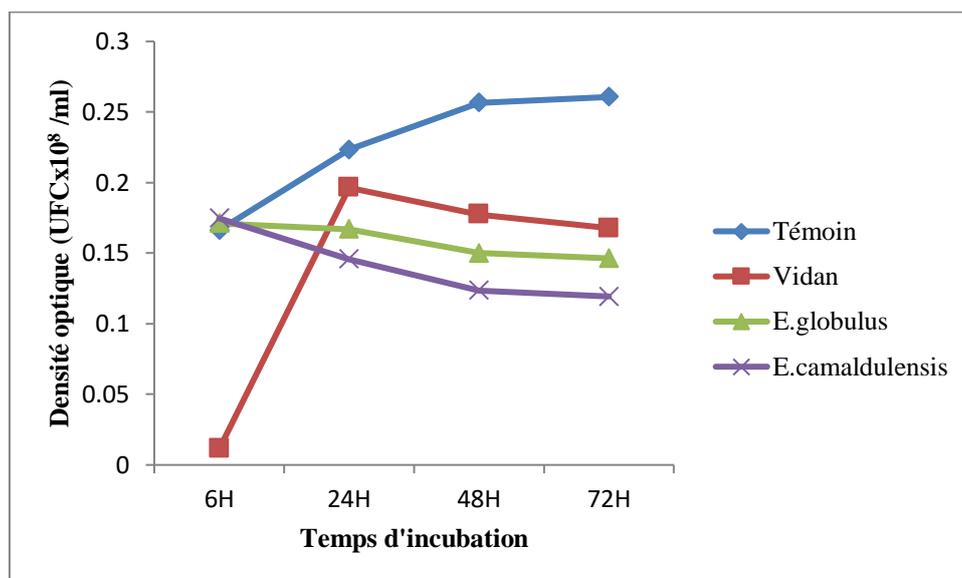


Figure 36. Variation des D.O de *Botrytis cinerea* en présence du pesticide et des extraits des deux espèces d'Eucalyptus

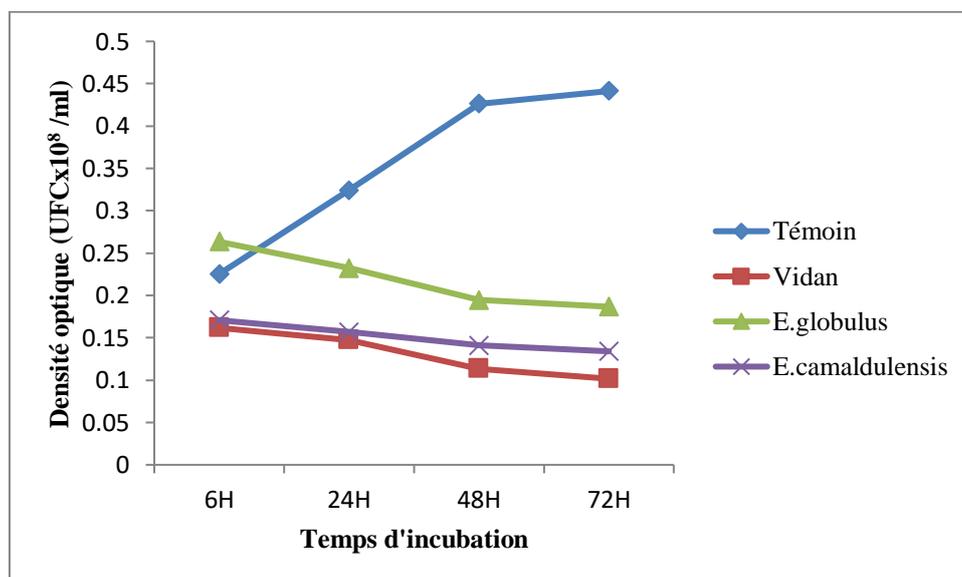


Figure 37. Variation des D.O d'*Aspergillus niger* en présence du pesticide et des extraits des deux espèces d'Eucalyptus

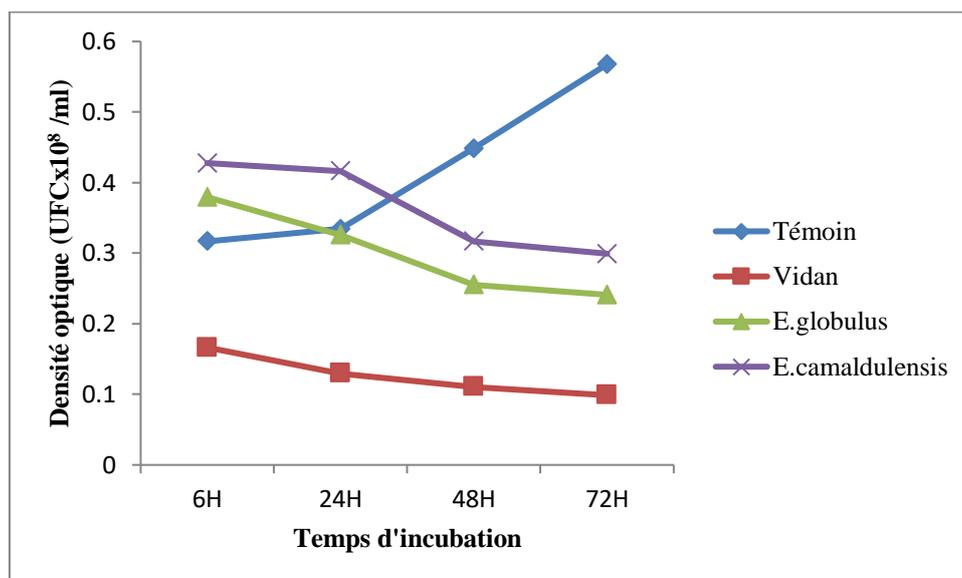


Figure 38. Variation des D.O de *Fusarium culmorum* en présence du pesticide et des extraits des deux espèces d'Eucalyptus

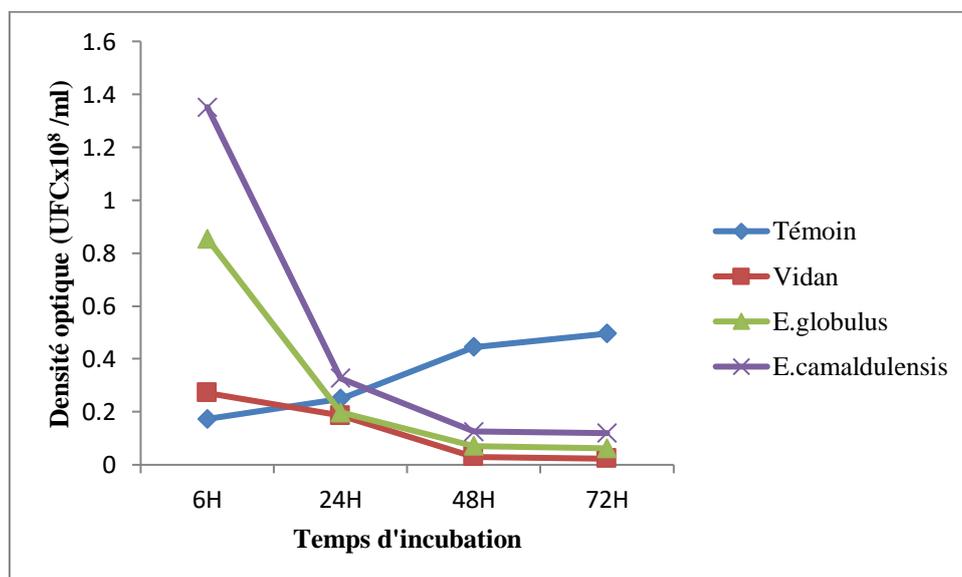


Figure 39. Variation des D.O de *Mucor plumbeus* en présence du pesticide et des extraits des deux espèces d'Eucalyptus

Les résultats obtenus concernant les cinétiques de turbidité des souches bactériennes étudiées en présence du pesticide (Vidan 25 EC) et des extraits naturels des espèces d'Eucalyptus, montrent d'une façon générale, la diminution progressive de cette cinétique en fonction du

temps et des substances testées. Une similarité dans L'allure générale des graphes obtenus avec *Eucalyptus globulus*, le vidan et le témoin. *Eucalyptus camaldulensis* affiche souvent une allure tout à fait différente.

Les souches de *Burkholderia cepacia*, *Serratia plymuthyca* et *chryseobacterium meningosepticum*, manifestent une sensibilité vis-à-vis des extraits des deux espèces d'Eucalyptus qui se traduit par une turbidimétrie plus basse que celle observée chez les témoins et même en présence du produit chimique le Vidan 25 EC.

Le contraire a été observé pour l'espèce *Pasteurella pneumotropica* qui présente une sensibilité plus forte envers le pesticide et une résistance aux extraits des Eucalyptus estimée par des densités optiques plus importantes que celles enregistrée dans les milieux de cultures témoins, en absence de toute substance inhibitrice durant les premières 48h.

Les variation de la turbidité exprimées par les différentes densités optiques montrent que l'espèce *Cedecea lapagei* est très résistante au produit phytosanitaire conventionnel le vidan 25 EC, mais plutot sensible à l'extrait d'Eucalyptus camaldulensis avec des densités moindres. L'*Eucalyptus globulus* quant à lui, exerce un effet bactériostatique moins important se rapprochant de celui du témoin avec des graphes présentant la même allure.

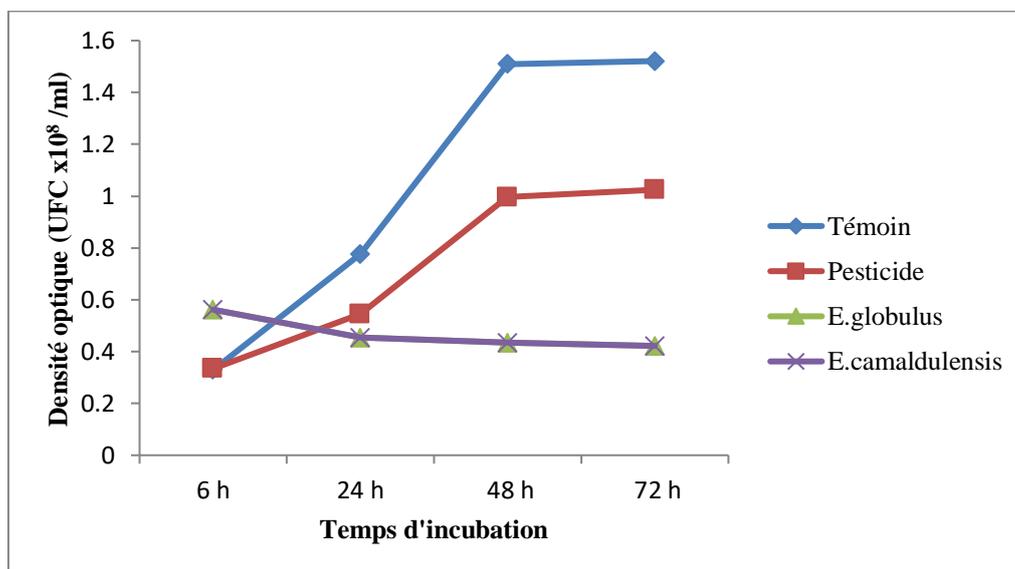


Figure 40. Variation des D.O *Burkholderia cepacia* en présence du pesticide et des extraits des deux espèces d'Eucalyptus

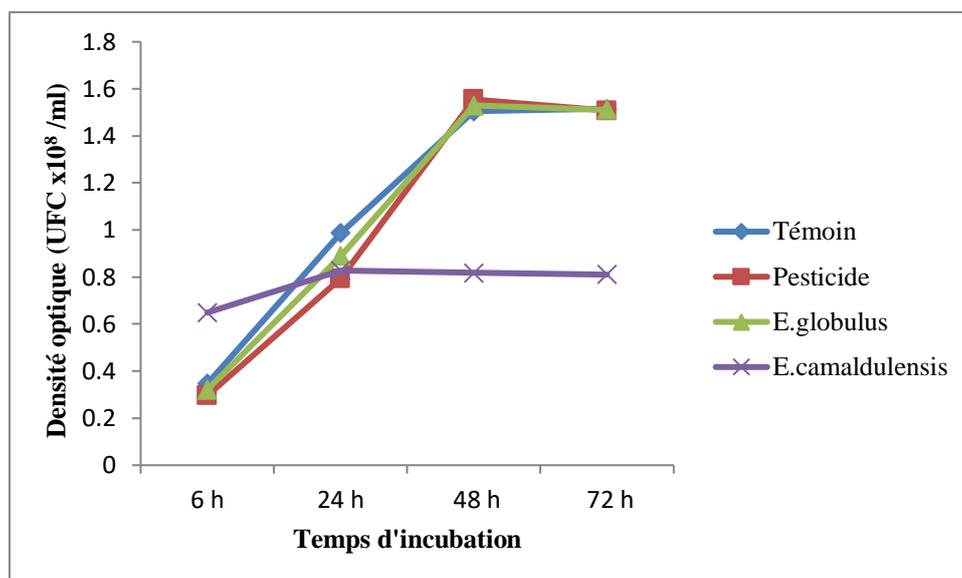


Figure 41. Variation des D.O de *Cedecea lapagei* en présence du pesticide et des extraits des deux espèces d'Eucalyptus

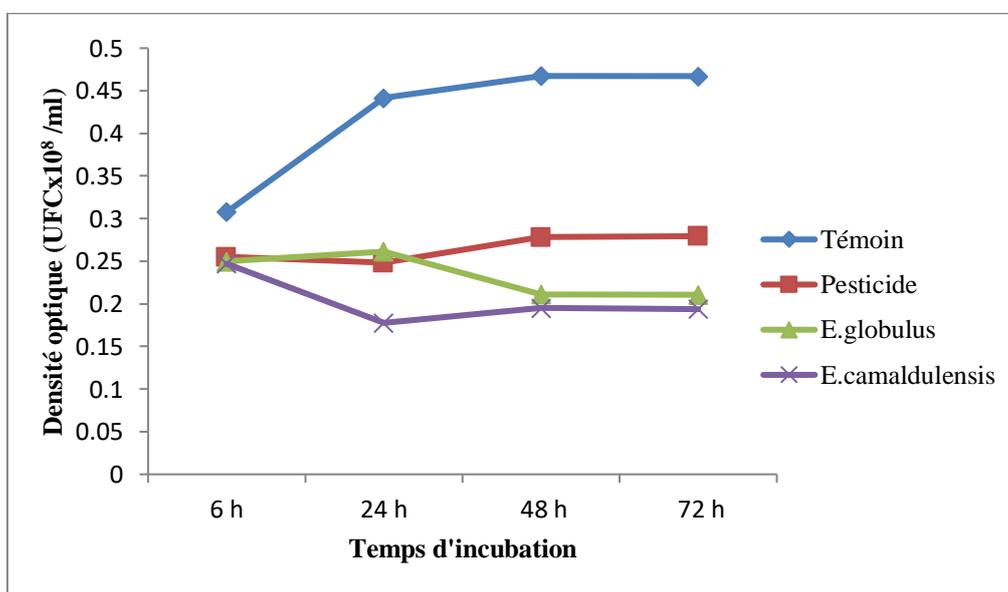


Figure 42. Variation des D.O de *Serratia plymuthyca* en présence du pesticide et des extraits des deux espèces d'Eucalyptus

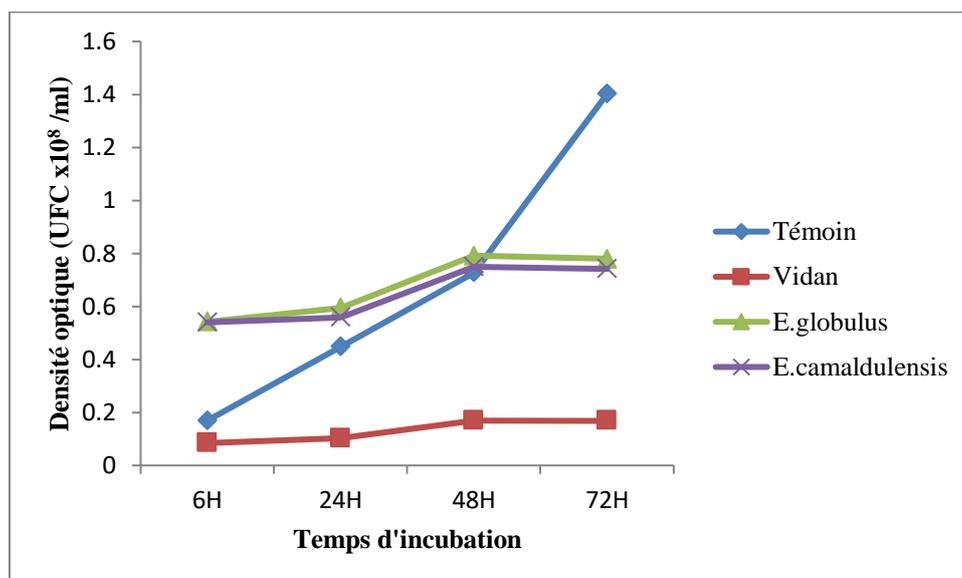


Figure 43. Variation des D.O de *Pasteurella pneumotropica* en présence du pesticide et des extraits des deux espèces d'Eucalyptus

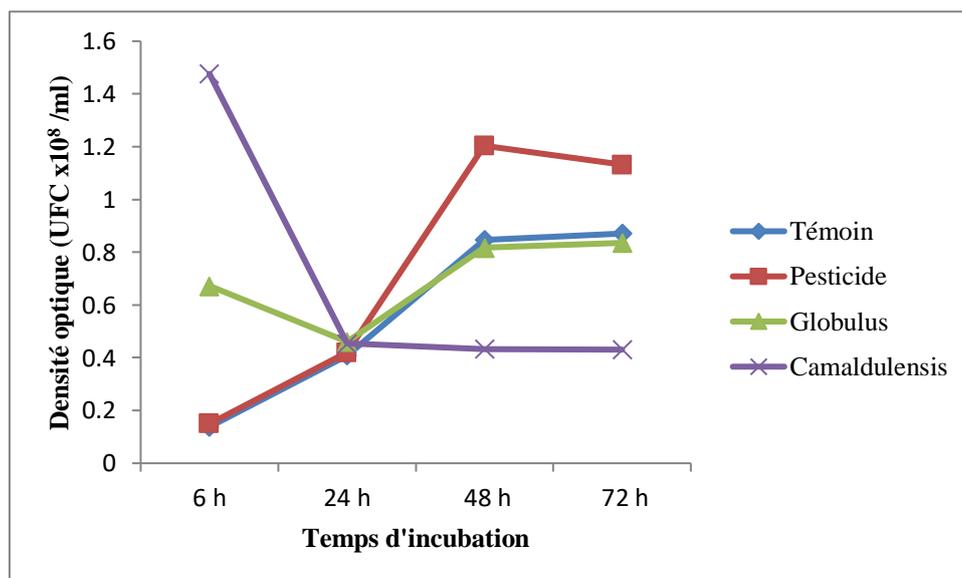


Figure 44. Variation des D.O de *Chryseobacterium meningosepticum* en présence du pesticide et des extraits des deux espèces d'Eucalyptus

🚦 Cinétique de l'acidité (pH)

Les résultats présentés dans les figures (45, 46, 47, 48, 49, 50) montrent que l'ensemble des souches fongiques entraînent une acidification du milieu et ce, en présence des extraits des deux espèces d'Eucalyptus et du Vidan 25 EC. Les valeurs indiquent une baisse de pH pour

tous les échantillons. Les valeurs les plus faibles enregistrées sont celles lorsque *Penicillium notatum* est mis en contact du Vidan (pH:2,7) et celles de *Botrytis cinerea* lorsqu'il est incubé en présence de l'extrait d'*E.globulus* (pH:2,69) et également lorsque *Alternaria alternata* est soumise à l'extrait d'*E.camaldulensis* (pH:2,75). Néanmoins, nous constatons que le pH des différentes substances testées avec la totalité des souches fongiques, semble être supérieur à celui des témoins sauf pour le *Fusarium culmorum* où on remarque une légère hausse de l'acidité du milieu inoculé avec la souche témoin. Par ailleurs, les courbes représentant les variations du pH présentent la même allure en fonction du temps.

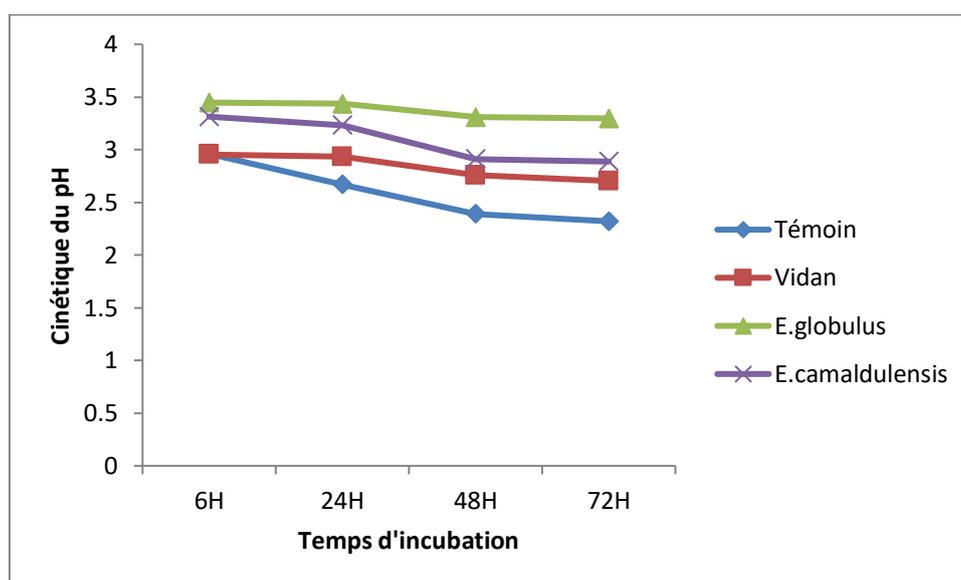


Figure 45. Cinétique du pH de *Penicillium notatum*

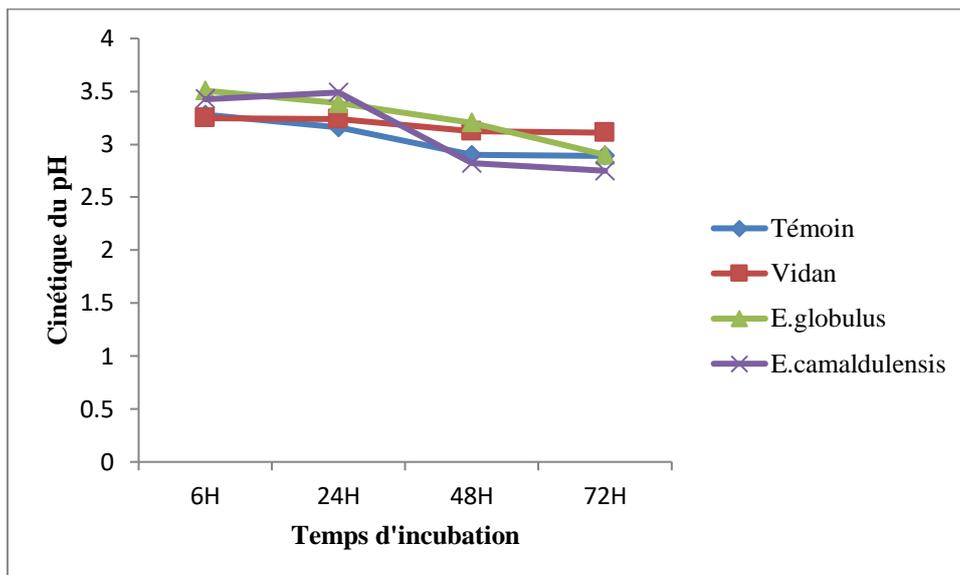


Figure 46. Cinétique du pH d'*Alternaria alternata*

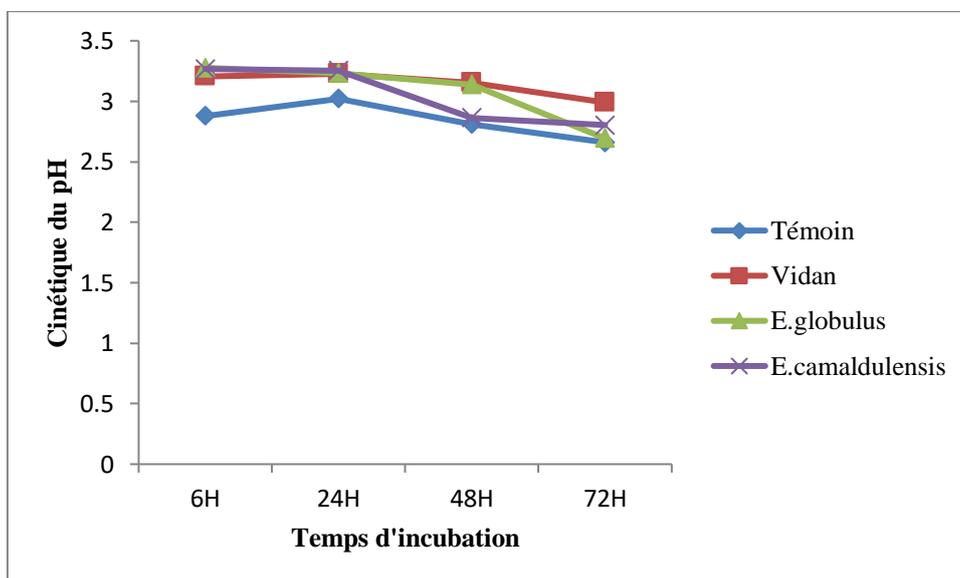


Figure 47. Cinétique du pH de *Botrytis cinera*

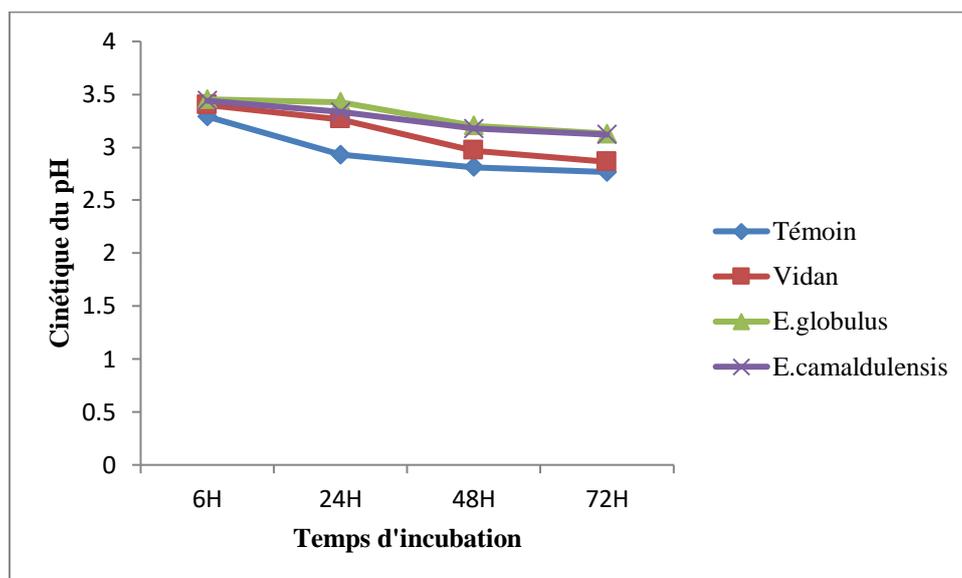


Figure 48. Cinétique du pH d'*Aspergillus niger*

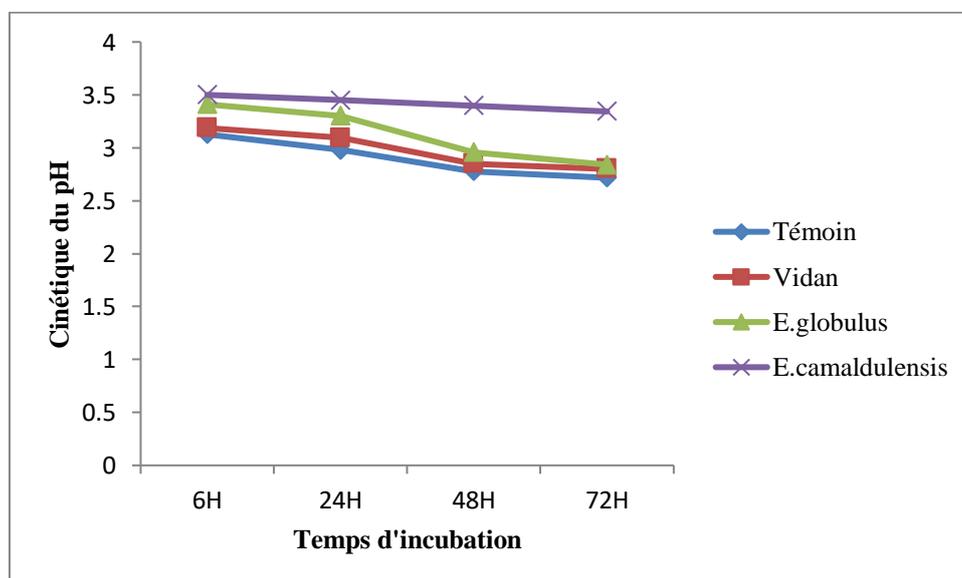


Figure 49. Cinétique du pH de *Fusarium culmorum*

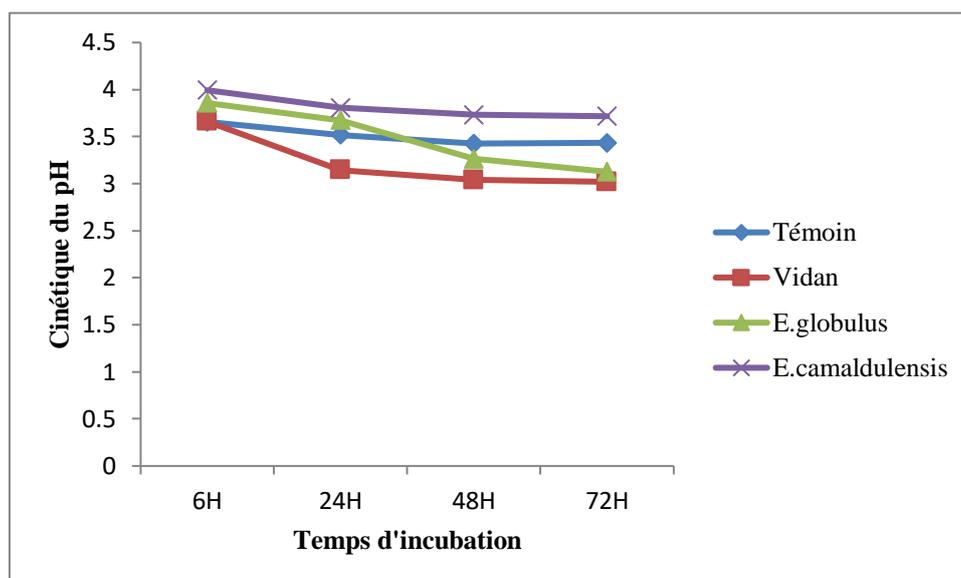


Figure 50. Cinétique du pH de *Mucor plumbeus*

Au temps initial, le pH du milieu de culture était 6,8 dans toutes les cultures bactériennes. Ce paramètre évolue dans le temps, durant l'incubation. En général, après 72 heures d'incubation sous agitation orbitale, la valeur du pH diminue pour toutes les souches bactériennes en présence de toutes les substances testées. (figure 51, 52, 53, 54, 55).

Par ailleurs, si l'on se réfère aux différentes courbes obtenues avec les extraits des deux espèces d'Eucalyptus testées, nous constatons que l'acidification du milieu reste assez stable pour les souches de *Cedecea lapagei* et *Pasteurella pneumotropica* contrairement aux autres souches.

D'autre part, les cinétiques du pH obtenus avec le Vidan 25 EC, apparaissent plus basses que celle obtenues avec les témoins, et ce pour toutes les souches bactérienne hormis *Pasteurella pneumotropica*. La même allure des courbes a été obtenue pour *Chryseobacterium meningosepticum* en présence de tous les produits testés avec cependant des pH hétérogènes plus ou moins importants. L'acidité la moins forte est celle de *Eucalyptus camaldulensis*

suivie de *Eucalyptus globulus*, le produit chimique Vidan 25 EC se trouve en dernière position avec une acidité très prononcée.

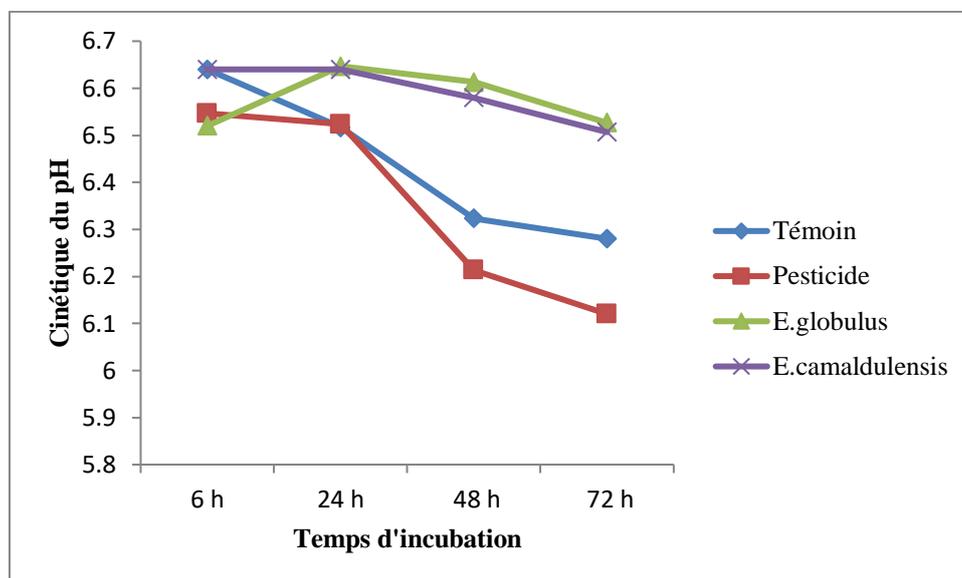


Figure 51. Cinétique du pH de *Burholderia cepacia*

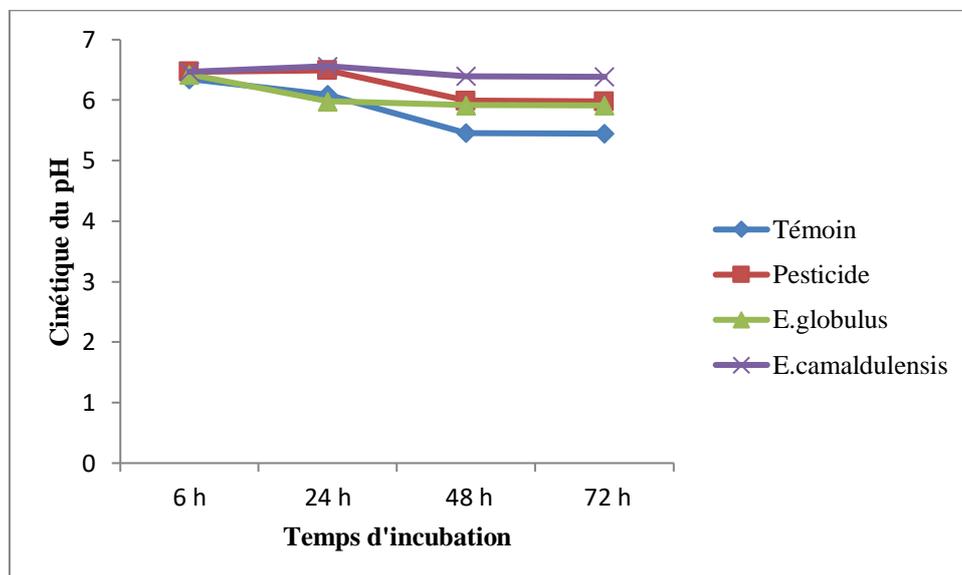


Figure 52. Cinétique du pH de *Cedecea lapagei*

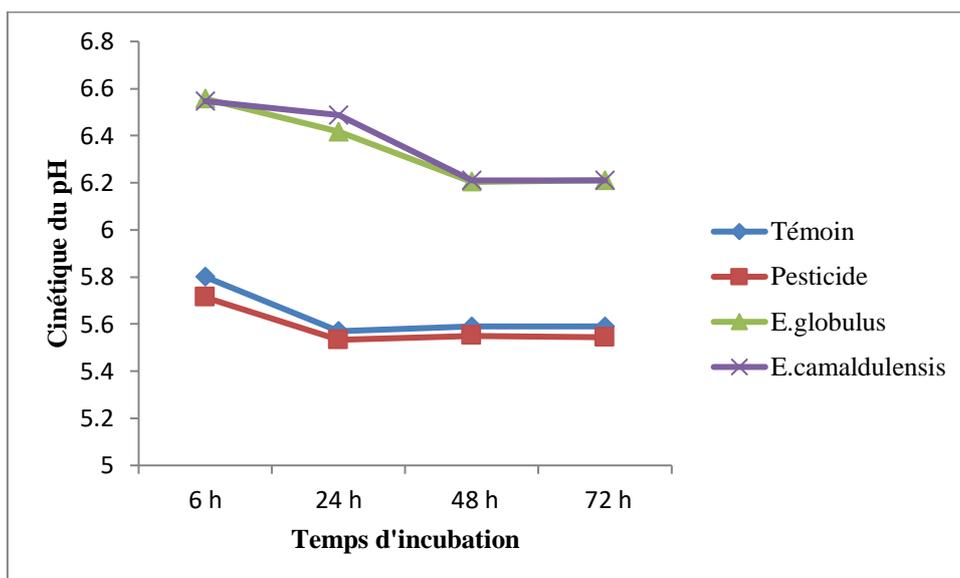


Figure 53. Cinétique du pH de *Serratia plymuthyca*

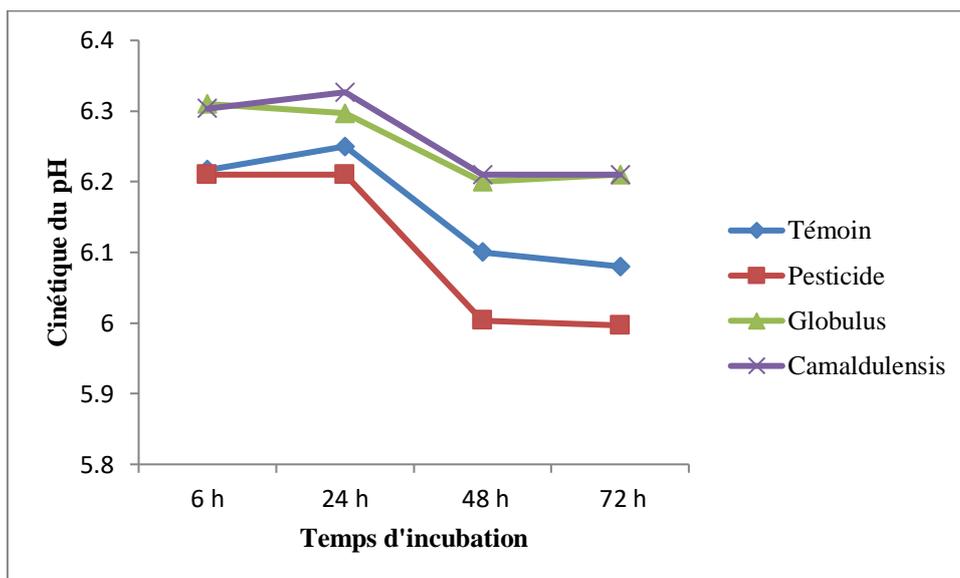


Figure 54. Cinétique du pH de *Chryseobacterium meningosepticum*

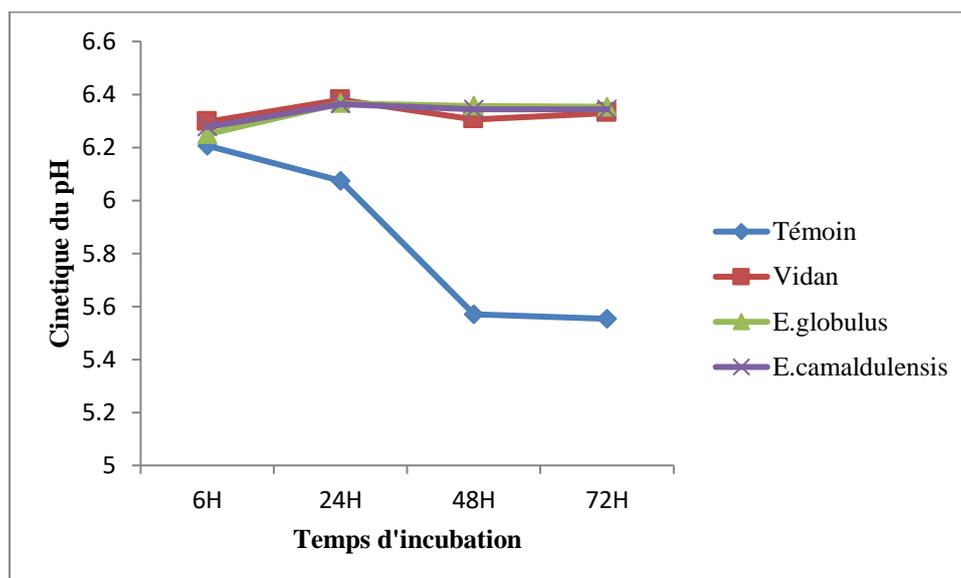


Figure 55. Cinétique du pH de *Pasteurella pneumotropica*

✚ Détermination de la biomasse microbienne fongique et bactérienne

Les inocula fongiques représentés dans la figure 56, indique une perturbation de la croissance mycélienne des souches lorsqu'elles sont soumises aux différentes molécules testées. Le poids de l'inoculum de toutes les souches fongiques utilisées est plus faible que celui du témoin. Le taux le plus faible est enregistré pour *Fusarium culmorum* et *Mucor plumbeus* (1,118 mg pour les deux) en présence du pesticide. En présence de *E.globulus* et *E.camaldulensis* c'est le *Penicillium notatum* qui s'avère être le plus sensible (1,264 mg et 1,259 mg). Quand aux poids les plus élevés, ils sont enregistrés chez *Alternaria alternata*, 1,667 mg (fongicide), 1,655 mg (*E.globulus*) et 1,658 mg (*E.camaldulensis*).

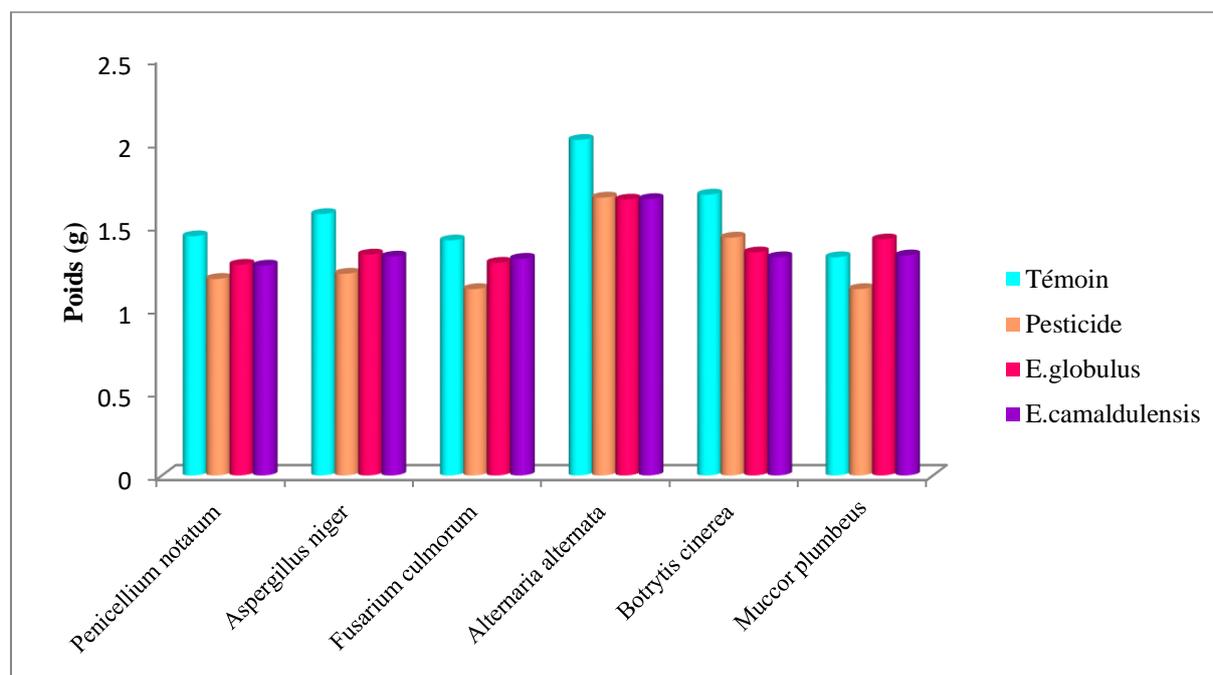


Figure 56. Biomasse fongique soumise à l'effet des extraits des deux espèces d'Eucalyptus et du Vidan 25 EC

Les résultats obtenus (Figure 57) révèlent qu'après incubation en présence du fongicide (Vidan 25 EC) et des extraits bruts des deux espèces d'Eucalyptus, le poids sec de l'inoculum bactérien est inférieur par rapport à celui du témoin.

Les souches testées s'avèrent être plus sensibles face au pesticide de synthèse, la biomasse la plus faible (1,682mg) est celle de *pasteurella pneumotropica*, et la plus élevée (1,682 mg) est celle de *Serratia plymuthyca*. *Cedecea lapagei* semble, cependant, résistée aussi bien au Vidan 25 EC qu'aux extraits et affiche des biomasses plus élevées que le témoin.

Quand à la biomasse obtenue face à *E.globulus* et *E.camaldulensis*, nous enregistrons également une sensibilité de la plupart des souches. Le poids le plus faible est noté chez *Burkholderia cepacia* (1,658 mg pour *E.globulus* et 1,730 mg pour *E.camaldulensis*). Les biomasses les plus élevées, sont atteintes Pour *Chryseobacterium meningosepticum* (1,810 mg) en présence de *E.globulus* et *Pasteurella pneumotropica* (1,725 mg) en présence de *E.camaldulensis*.

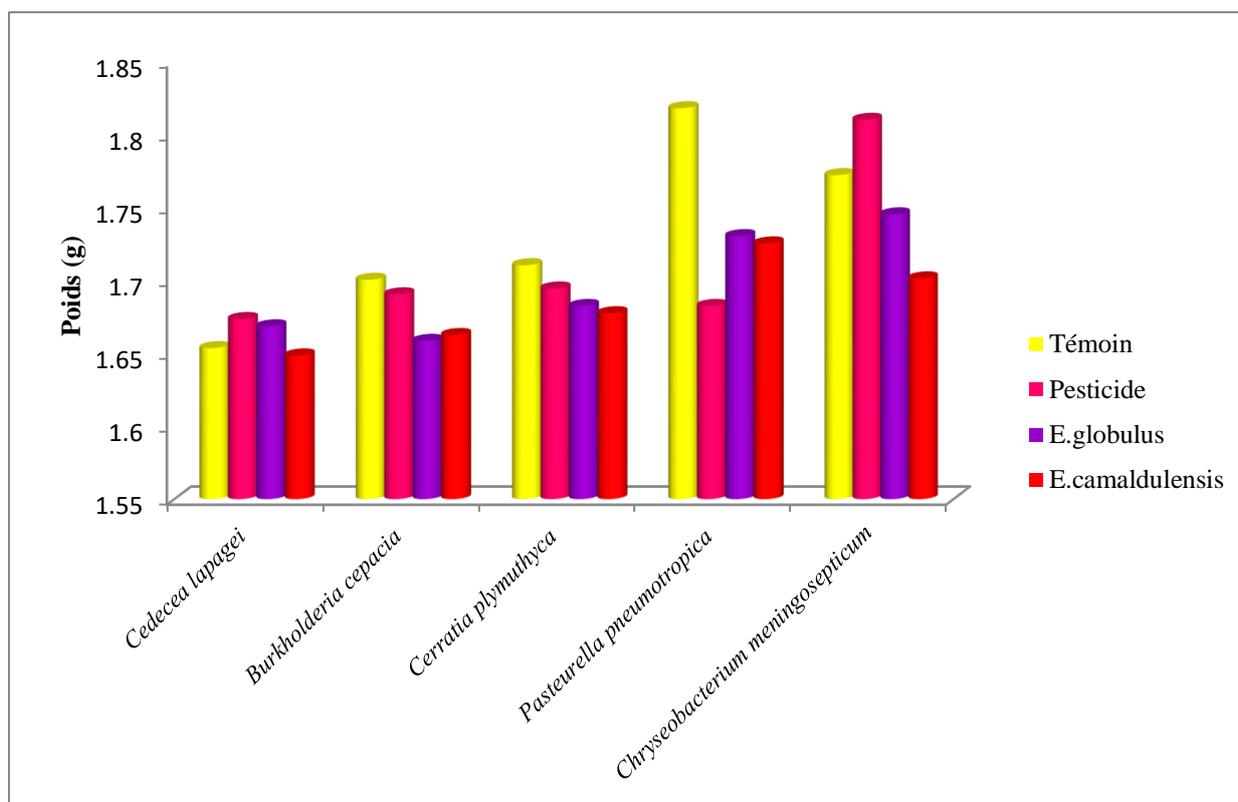


Figure 57. Biomasse bactérienne soumise à l’effet des extraits des deux espèces d’Eucalyptus et du Vidan 25 EC

4. Etude in vivo des extraits des deux espèces d'Eucalyptus sur *Capsicum annum* inoculé ex situ par les différentes souches microbiennes

Les essais montrent que les extraits de *E.globulus* et *E.camaldulensis* ont exercé un effet important sur tous les agents fongiques. En ce qui concerne les souches les plus virulentes à savoir *Alternaria alternata* et *Botrytis cinerea*, les zones nécrosées sont situées dans une fourchette de 9,66mm et 11,33m. Ces lésions semblent moins importantes à celles des témoins non soumis à l'effet des extraits naturels. Par contre, elles sont assez rapprochées à celles obtenues avec le produit chimique Vidan 25 EC, et en particulier pour l'extrait de *E.globulus*.

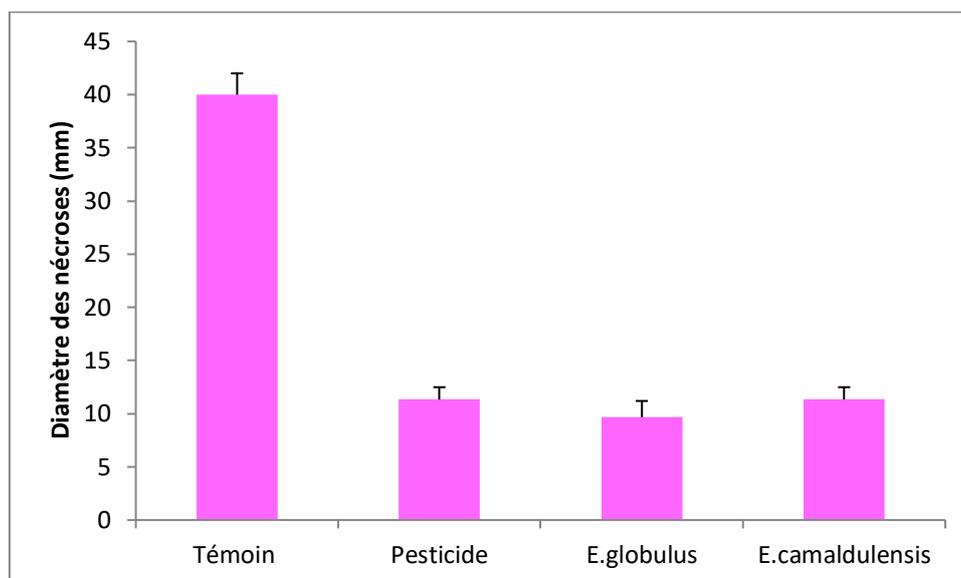


Figure 58. Etendue des nécroses sur *Capsicum annum* inoculé ex situ par *Alternaria alternata* et traité par les différentes substances

La représentation graphique suivante (Figure 59) indique un impact notable de l'extrait d'*E.globulus* vis-à-vis d'*Aspergillus niger* comparativement au témoin et au Vidan 25 EC, avec des lésions nettement inférieures s'échelonnant entre 9.66mm pour *E.globulus*, 35.33mm pour le témoin et 11,33mm pour le vidan. L'extrait d'*E.camaldulensis* paraît moins efficace, néanmoins le diamètre de la nécrose reste inférieur à celui du témoin et similaire à celui du Vidan 25 EC.

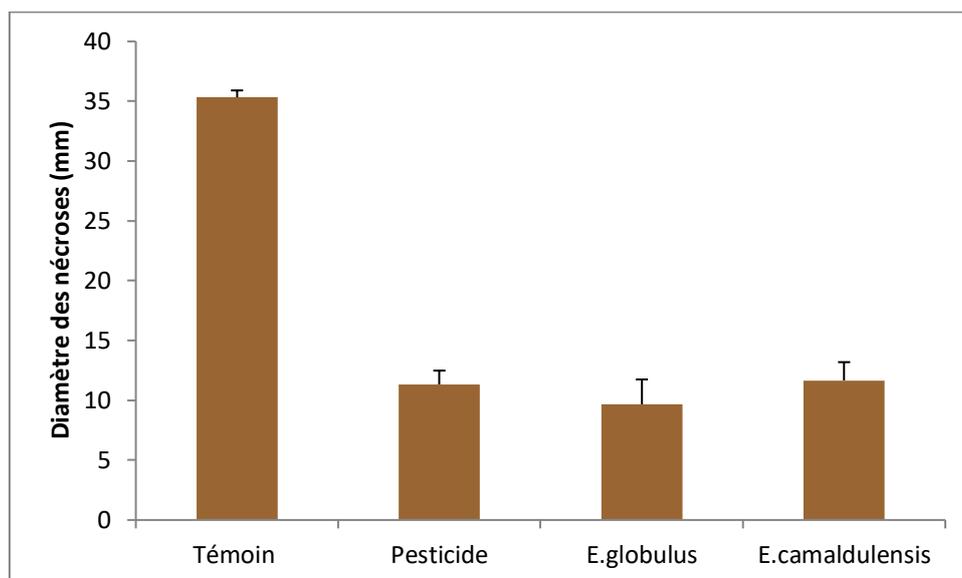


Figure 59. Etendue des nécroses sur *Capsicum annum* inoculé ex situ par *Aspergillus niger* et traité par les différentes substances

Les résultats présentés dans la figure 60, témoignent d'une bonne activité des extraits d'E.globulus et E.camaldulensis sur *Fusarium culmorum* avec des plages nécrosées inférieures à celle du témoin (41 mm pour, 13,33 mm pour et 16,33 mm pour). Cet effet, demeure inférieur à celui du vidan (13,33 mm).

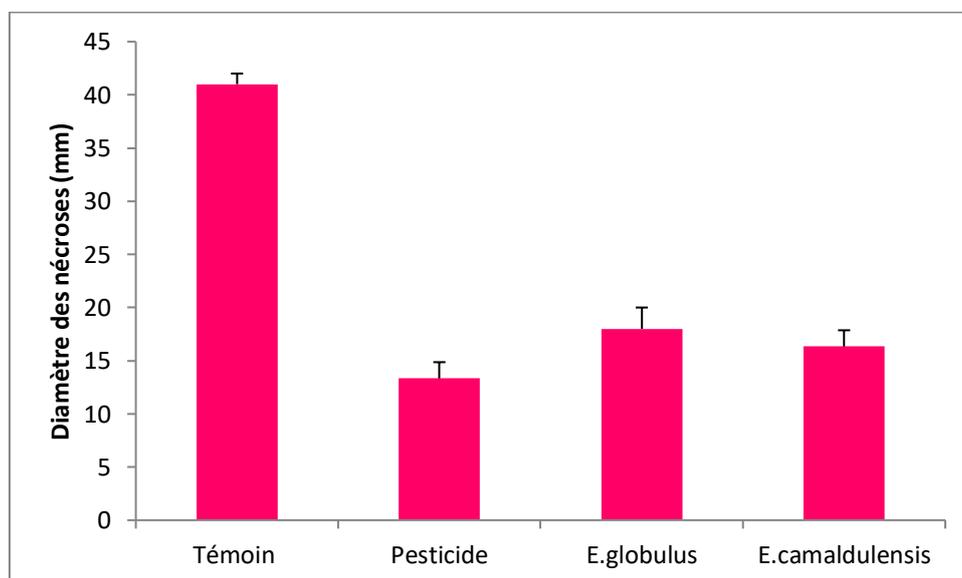


Figure 60. Etendue des nécroses sur *Capsicum annum* inoculé ex situ par *Fusarium culmorum* et traité par les différentes substances

Les nécroses apparues sur *Capsicum annum* après inoculation par *Mucor plumbeus*. montre que les extraits de *E.globulus* et *E.camaldulensis* ont exercé un effet important contre *Mucor plumbeus* avec des lésions de 16mm et 18,66mm, mais elles restent tout de même inferieures à celle du témoin (36,33mm).

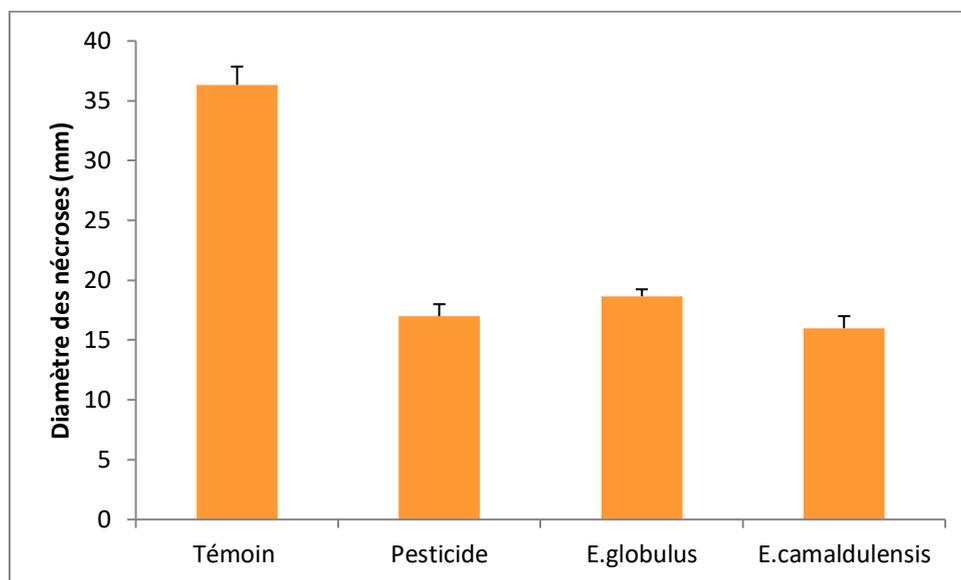


Figure 61. Etendue des nécroses sur *Capsicum annum* inoculé ex situ par *Mucor plumbeus* et traité par les différentes substances

L'effet des extraits des deux espèces d'Eucalyptus sur *Botrytis cinera* semble être efficace, ceci se manifeste par des zones de nécrose inferieures a celle du témoin. Nous constatons également que *E.camaldulensis* est le plus actif avec une zone de nécrose de 15mm. *L'E.globulus* semble avoir un effet similaire à celui du fongicide chimique (17mm et 17,66mm). Ces symptômes restent moins représentatifs comparativement au témoin.

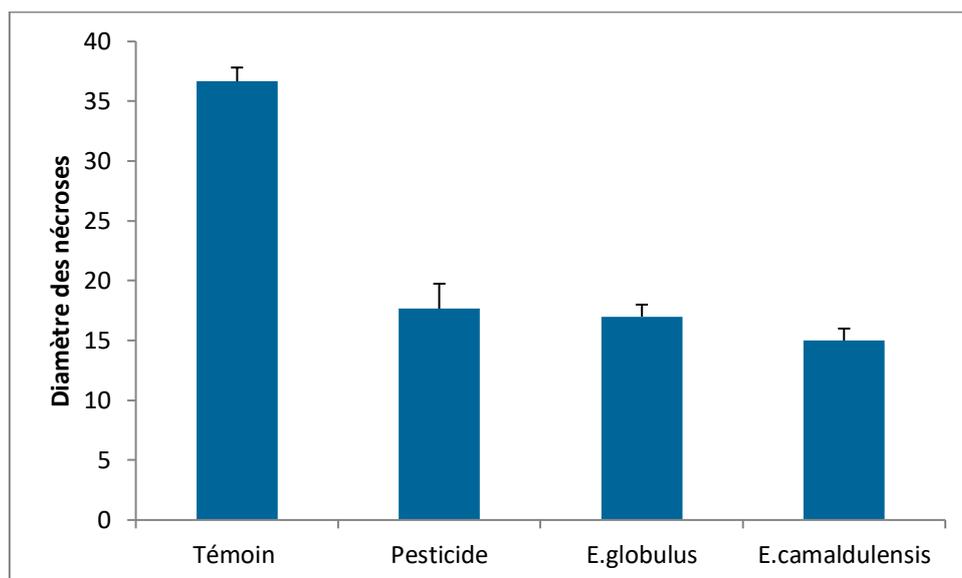


Figure 62. Etendue des nécroses sur *Capsicum annum* inoculé ex situ par *Botrytis cinera* et traité par les différentes substances

Les extraits des deux espèces d'Eucalyptus injecté au niveau de l'épiderme de *Capsicum annum* après inoculation par *Penicillium* montrent que *E.globulus* et *E.camaldulensis* ont exercé un effet important contre ce champignon avec des zones de nécroses diminuées de moitié (20,66mm et 22,66mm) par rapport à celle du témoin (42mm). Les nécroses enregistrées après les traitements à base de fongicide vidan sont évaluées à 14,33mm.

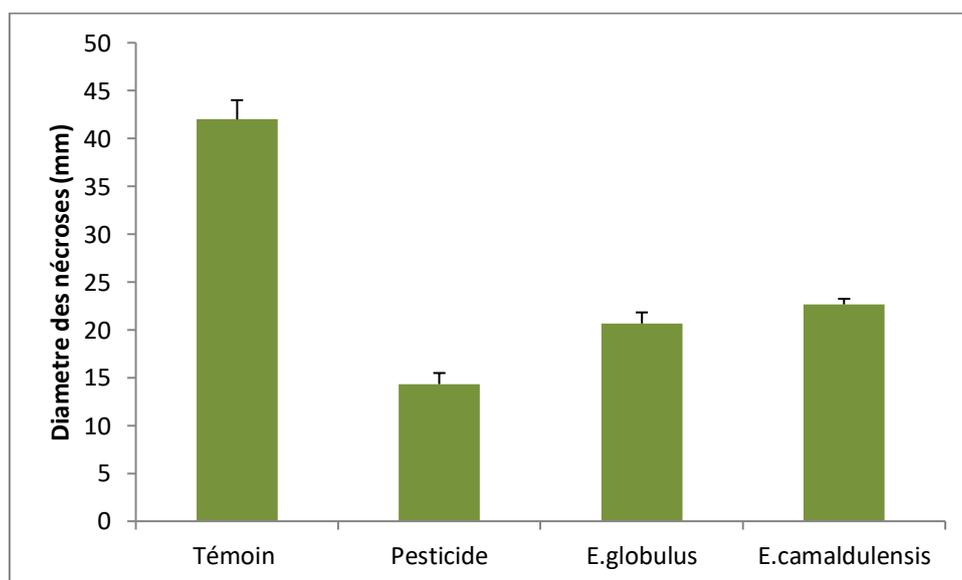


Figure 63. Etendue des nécroses sur *Capsicum annum* inoculé ex situ par *Penicillium notatum* et traité par les différentes substances

Pour ce qui est de l'effet antibactérien, l'injection des extraits a provoqué des lésions très hétérogènes qui varient selon la nature du pathogène. Les extraits de *E.globulus* et *E.camaldulensis* ont exercé une activité remarquable contre *Cedecea lapagei* avec des zones de nécrose s'échelonnant entre 13,1mm et 14,83mm. Les nécroses notées sur poivron traité par le fongicide conventionnel sont nettement supérieures (19,16mm). Les témoins non traités sont les plus touchés avec 36,33mm de surface infectée.

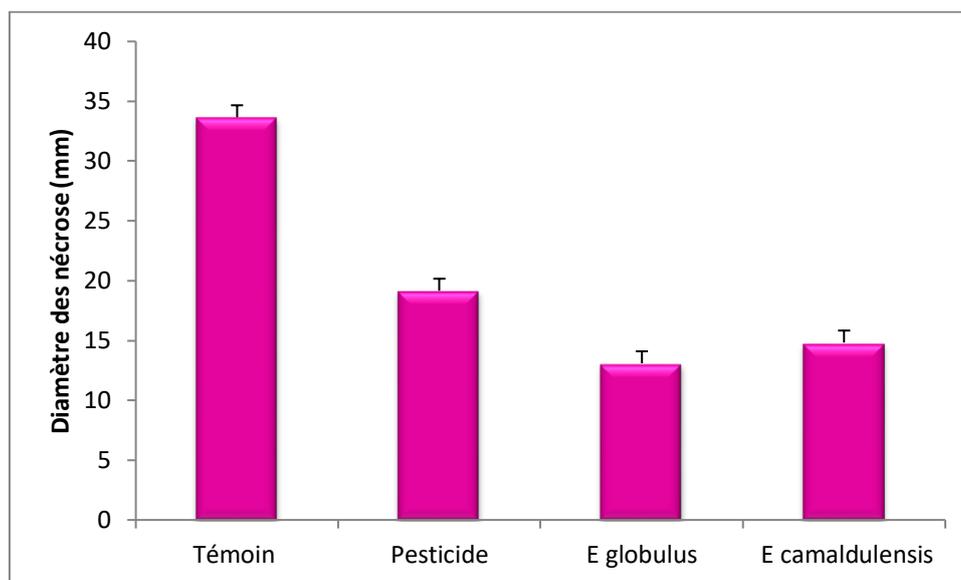


Figure 64. Etendue des nécroses sur *Capsicum annum* inoculé ex situ par *Cedecea lapagei* et traité par les différentes substances

Les résultats illustrés dans la figure 65, exprime l'impact des extraits des deux espèces d'Eucalyptus sur *Burkholderia cepacia*, avec des zone de nécrose inférieur a celle du témoin et du Vidan 25 (témoin 14,12mm / pesticide 8,24mm / E.globulus 6,62mm et E.camaldulensis 5,22mm).

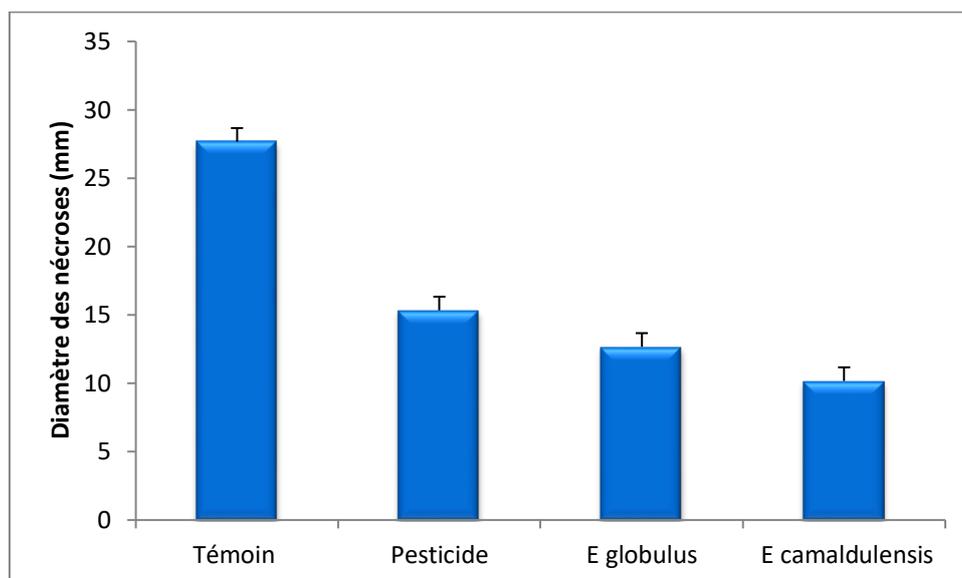


Figure 65. Etendue des nécroses sur *Capsicum annum* inoculé ex situ par *Burkholderia cepacia* et traité par les différentes substances

Une bonne activité de l'extrait brut d'*E.camaldulensis* vis-à-vis de *Serratia plmuthica* comparativement au témoin et au Vidan 25 EC avec des symptômes de différents taille variant entre 10,66 mm et 25, 33mm à la suite des différents traitements. L'extrait d'*E.globulus* s'est montré moins efficace avec seulement un diamètre nécrosé de 12,83mm. Ce chiffre reste inferieur à celui du témoin et similaire à celui du Vidan 25 (12,33mm).

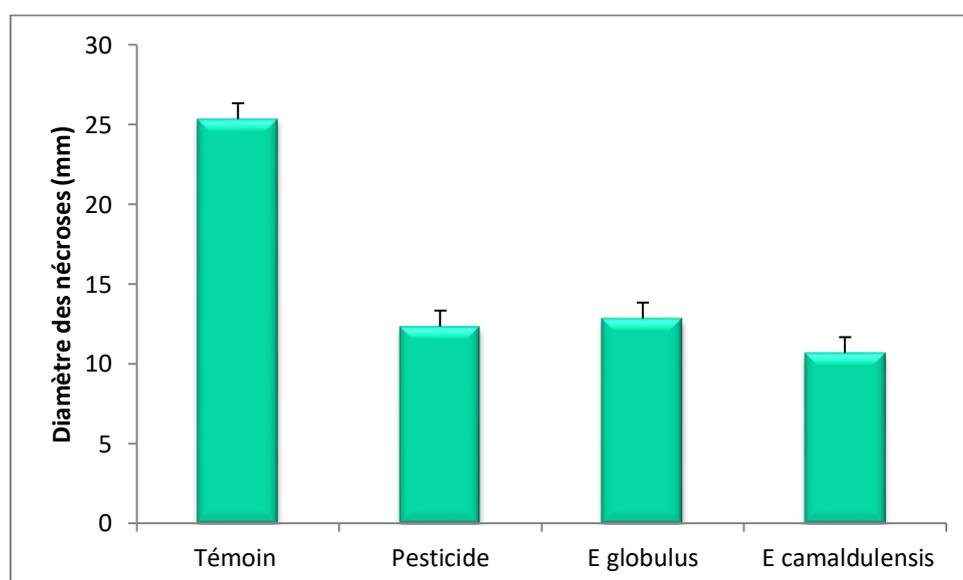


Figure 66. Etendue des nécroses sur *Capsicum annum* inoculé ex situ par *Serratia plmuthica* et traité par les différentes substances

Nous constatons un effet bactériostatique des extraits des deux espèces d'Eucalyptus étudiées, sur la souche bactérienne de *Pasteurella pneumotropica*. Cet effet se manifeste par des zones de nécroses inférieures à celles du témoin et du Vidan 25. Les diamètres de ces nécroses sont de l'ordre de 12mm pour E.globulus et 14,66mm pour *E.camaldulensis*, tandis qu'ils ont atteint 17mm pour le fongicide et 30,33mm pour le témoin.

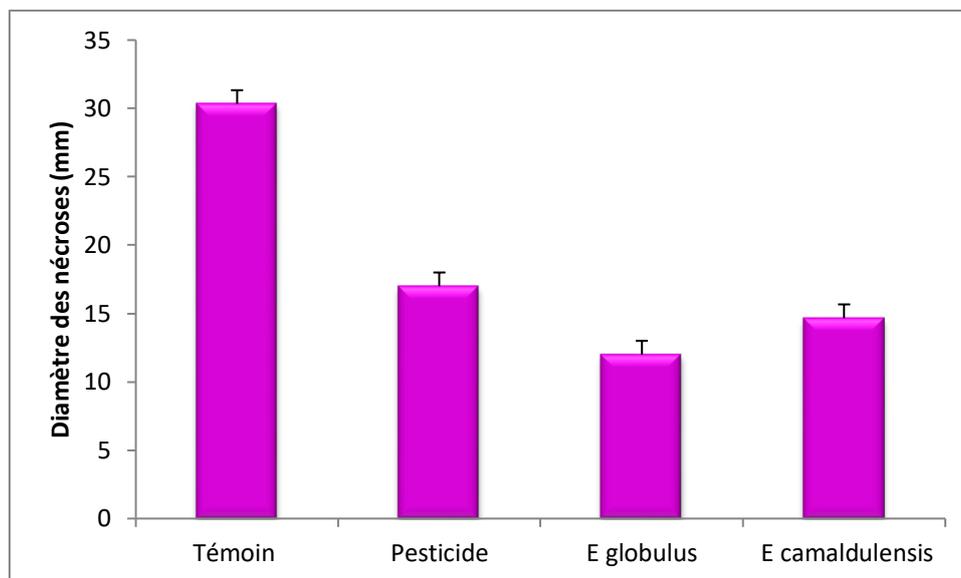


Figure 67. Etendue des nécroses sur *Capsicum annum* inoculé ex situ par *Pasteurella pneumotropica* et traité par les différentes substances

Les zones de nécrose illustrées dans la figure 68, expriment l'activité antibactérienne des extraits des deux espèces d'Eucalyptus vis-à-vis de *Chryseobacterium meningosepticum*, cet effet est apprécié par des diamètres inférieurs à ceux du pesticide et du témoin. Les diamètres sont de l'ordre de 7,74mm pour *E.camaldulensis*, 8,24mm pour *E.globulus*, 10,59 mm pour le fongicide et 18,86mm pour le témoin. les deux extraits naturels semblent avoir un effet bactériostatique plus efficient.

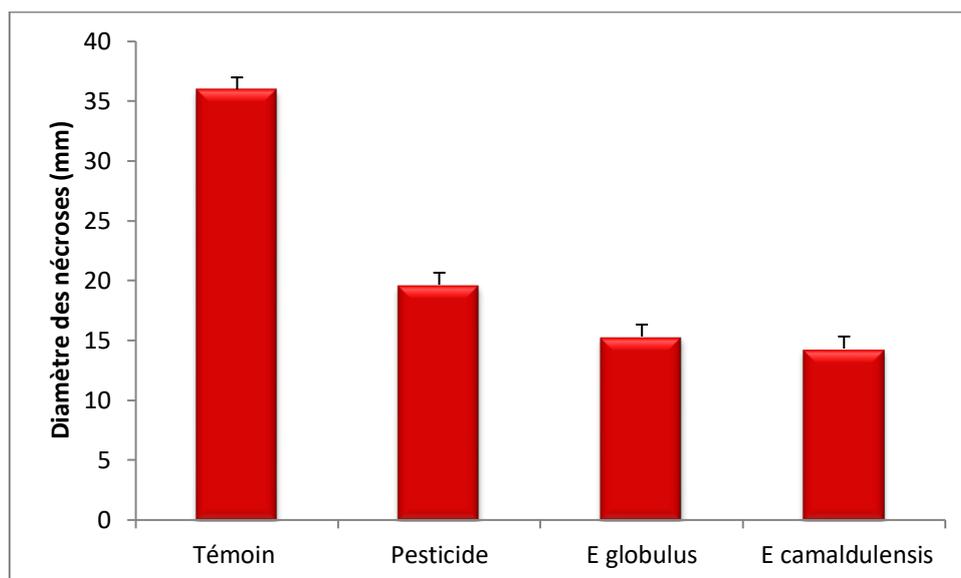


Figure 68. Etendue des nécroses sur *Capsicum annum* inoculé ex situ par *Chryseobacterium meningosepticum* et traité par les différentes substances

5. Etude de la toxicité des extraits des deux espèces d'*Eucalyptus* sur les organismes non cibles

5.1. Evaluation de l'effet toxique des extraits sur *Triticum durum*

Les résultats préliminaires obtenus ont révélés une inhibition totale de la germination des graines de *Triticum durum* traitées avec les extraits méthanolique d'*Eucalyptus camaldulensis* et *Eucalyptus globulus* aux concentrations de 0,55g/ml et 0,45g/ml et qui correspondent aux solutions mères des deux extraits. «Suite à cette inhibition totale des graines faisant allusion à une perte des potentialité de la graine, des dilutions des extraits au 1/2 et 1/4 ont été préparées (0,137g/ml et 0,112g/ml), puis testées pour confirmer cet effet herbicide prononcé sur cette espèce végétale. Les tests ont abouti aux résultats qui suivent».

❖ Pourcentage de germination

Nous constatons une diminution non significative ($p > 0.05$) du pourcentage de germination de *T.durum*. Une comparaison des moyennes entre témoin et traités au Vidan indique une diminution non significative ($p > 0.05$) de du pourcentage de germination.

En confrontant les témoins avec les traités avec les extraits des deux espèces d'Eucalyptus, nous constatons une diminution très hautement significative du pourcentage de germination. L'histogramme représenté par la figure 69 montre l'effet herbicide des extraits exercé sur le pouvoir germinatif des graines de triticum durum. Il semble que les grains de blé ont perdu les potentialités de germination face à ces extraits naturels dilué au 1/4 dès 48h. Le pourcentage de germination est de 16,66% pour *E.globulus* et 13,33% pour *E.camaldulensis* contre 83,66% pour la concentration la plus haute du pesticide chimique.

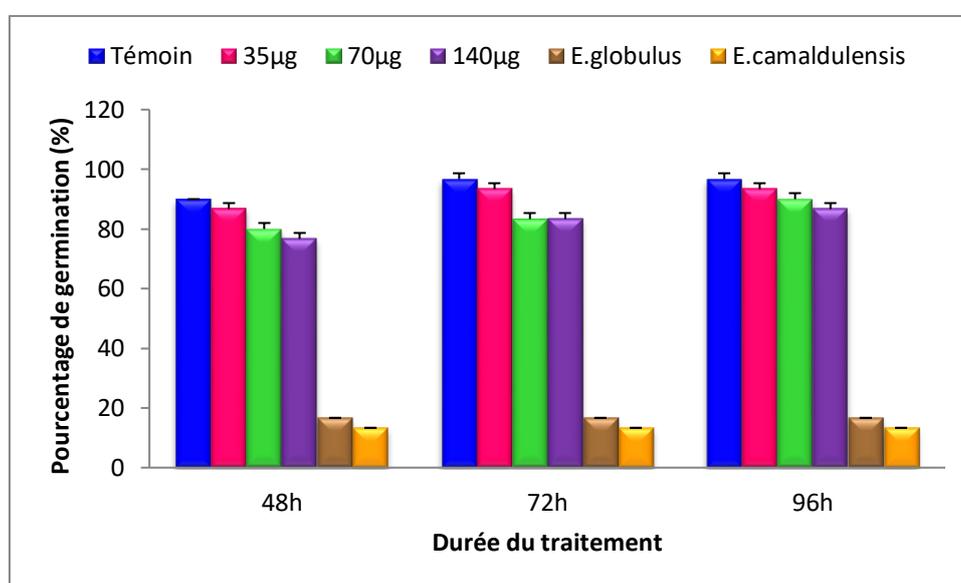


Figure 69. Effet des extraits polyphénoliques d'*Eucalyptus globulus* et *Eucalyptus camaldulensis* sur le pourcentage de germination de *Triticum durum*

❖ Nombre moyen des racines

En fonction du temps, on note une augmentation non significative ($p > 0.05$) du nombre moyen des racines.

En comparant les moyennes entre témoin et traités, nous observons une diminution significative ($p \leq 0.05$) du nombre moyen des racines à 140µg du pesticide de synthèse vidan et les extraits à 48h et 96h.

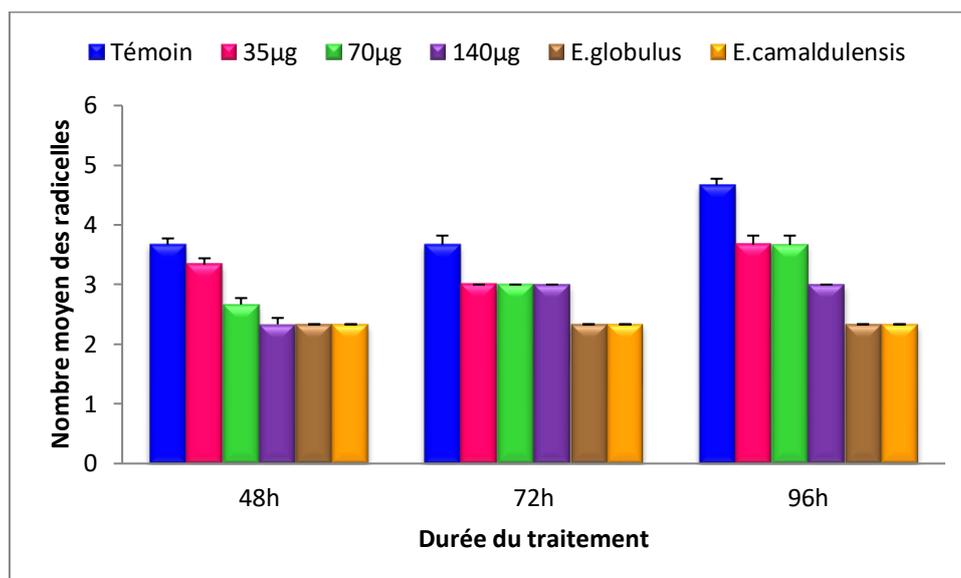


Figure 70. Effet des extraits polyphénoliques d'*Eucalyptus globulus* et *Eucalyptus camaldulensis* sur le nombre moyen racinaire de *Triticum durum*

❖ **Longueur moyenne des racines**

Nous observons une augmentation non significative ($p > 0.05$) de la longueur moyenne des racines de *Triticum durum*, en fonction du temps. A 48h, cette augmentation est non significative pour les 3 doses du pesticides et significative pour les extraits des deux espèces d'Eucalyptus.

A 72h et 96h, le test «t» de Student indique une diminution significative ($p \leq 0.05$) de LMR pour la D3 (140µg) et hautement significative pour les extraits brut d'Eucalyptus par rapport au témoin.

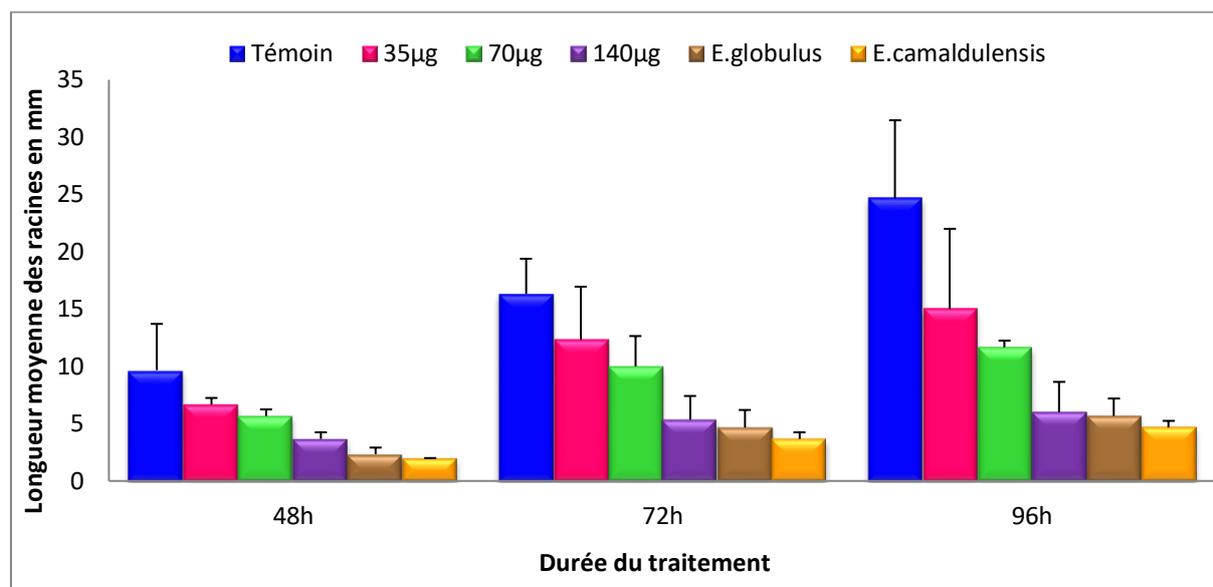


Figure 71. Effet des extraits polyphénoliques d'*Eucalyptus globulus* et *Eucalyptus camaldulensis* sur la longueur moyenne racinaire de *Triticum durum*

❖ Indice de germination

Les tests statistiques, indiquent une baisse de l'indice de germination chez les graines traitées par les extraits d'Eucalyptus. Cette baisse est très hautement significative entre les grains témoins non traités et ceux traités par les substances naturelles des deux Eucalyptus. Par ailleurs, Une comparaison des moyennes entre témoin et traités avec les différentes concentrations du Vidan indique une diminution non significative de l'indice de germination. Néanmoins cette diminution, est très hautement significative entre le témoin et les traités avec les extraits des deux espèces d'Eucalyptus.

De l'ensemble des résultats, il ressort que l'espèce camaldulensis possède un pouvoir d'inhibition meilleur que celui de son homologue globulus vis à vis des graines de *Triticum durum*.

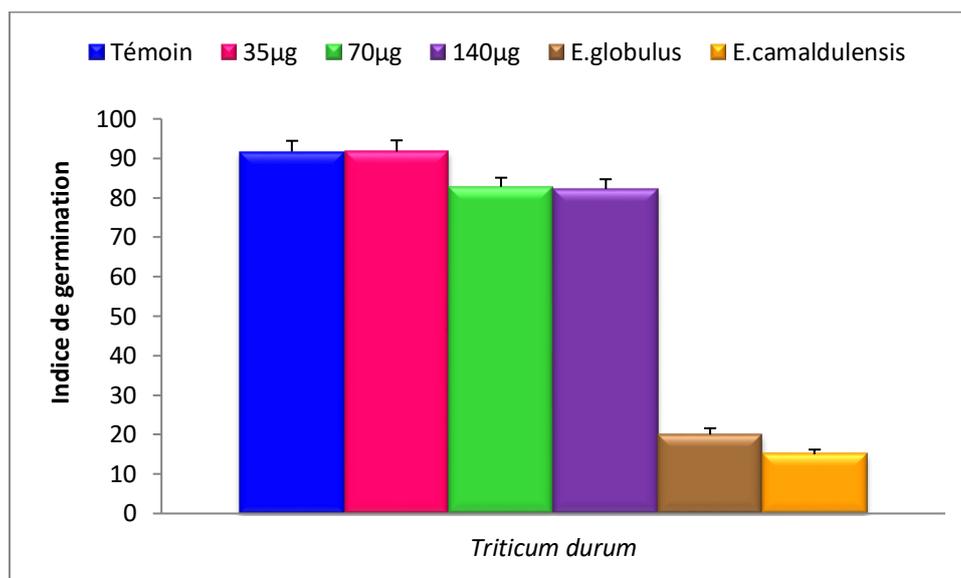


Figure 72. Effet des extraits polyphénoliques d'*Eucalyptus globulus* et *Eucalyptus camaldulensis* sur l'indice de germination de *Triticum durum*

5.2. Evaluation de l'effet toxique des extraits d'eucalyptus sur *Loboptera decipiens*

Les résultats illustré dans la figure 73, représentent le taux de mortalité de *Loboptera decipiens* traité avec les extraits bruts de *E.globulus* et *E.camaldulensis*. Ce test préliminaire nous a permis de démontrer uniquement la toxicité de la solution mère de ces extraits naturels sur la croissance d'un organisme animale utile pour la chaine alimentaire forestière et qui a pour role de dégrader la matière organique. Il s'agit de *loboptera decipiens*. Les taux de mortalité dû aux substances absorbées par voie orale sont d'abord faible au début de l'expérimentation, puis augmentent avec le temps.

Nous observons que *Loboptera decipiens* est plus sensible vis-à-vis de *E.globulus*, cette sensibilité se traduit par un accroissement du taux de mortalité. les observations nous ont permis d'enregistrer un taux de mortalité de 10% uniquement au cinquième jour, ce taux atteint 80% au bout de 25 jours et 100% au bout de 30 jours. Par contre avec l'extrait de *E.camaldulensis*, le taux de mortalité est de 20% au 5^{ème} jour. Ce taux reste stable jusqu'au jusqu'au 25^{ème} jour de traitement, pour arriver seulement à 60% de mortalité au bout de 30 jours de traitement. Nos extraits, bien qu'ils soient toxiques pour les organismes végétaux (mauvaise herbe et plante cultivées) pendant la phase germinative, cette espèce d'*Eucalyptus*

camaldulensis semble exercer un effet moins toxique sur les organismes animaux tels que *Loboptera decipiens*. Pour sa part, le produit chimique a provoqué la mort de presque la totalité de la population au bout de quelques jour seulement.

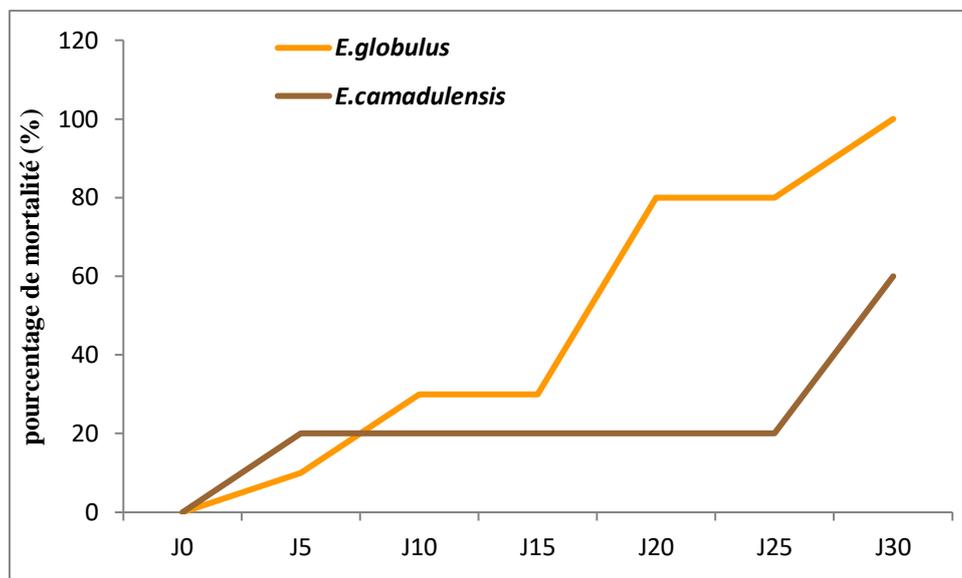


Figure 73. Cinétique de mortalité de *Loboptera decipiens*

DISCUSSION

DISCUSSION

Les produits naturels, sont de plus en plus recherchés pour une agriculture durable, du fait de l'utilisation sans discernement des pesticides conventionnels de synthèse ayant eu un impact écologique et sanitaire néfaste (contamination de l'environnement et des écosystèmes, perte de la biodiversité, acquisition de la résistance des souches aux produits de synthèse (Ahmad et al., 2008). Le recours au monde végétal et aux biomolécules qui permettent aux cultures de se protéger contre les ennemis naturels, devient donc indispensable (Bezzar-Bendjazia, 2016).

Parmi les genres qui sont réputées pour leur richesse en principes actifs figure l'Eucalyptus de la famille Myrtacées. Les recherches sur les principes actifs de cette espèce végétale sur les diverses pathologies humaines, sont nombreuses. Ses vertus médicinales et thérapeutiques sont très intéressantes, vu les activités pharmacologiques des composés phytochimiques présents dans les extraits de la plante. A titre d'exemples, les espèces issues de ce genre sont réputées pour leur propriétés broncho-dilatatrices (Duraffourd et lapraz, 1997), diurétiques, stomachiques contre la dyspepsie atonique ainsi que contre l'inflammation chronique de la muqueuse gastrique ou de la muqueuse intestinale (Nowakowska, 2007 ; Sutradhar *et al.*, 2008 ; Rao *et al.*, 2009 ; Vafeiadou *et al.*, 2009). Elles sont reconnues pour leur pouvoir tonique cardiaque et veineux, cicatrisant, fébrifuge, et déodorant (Kalkhambkar *et al.*, 2007 ; Melagraki *et al.*, 2009). Leurs propriétés antiseptiques générales des voies respiratoires et des voies urinaires et ses activités antispasmodiques et vermifuges sont notoires (Ko *et al.*, 2000 ; Tripoli *et al.*, 2007; Li *et al.*, 2008 ; Hirata *et al.*, 2009).

En revanche, les études concernant son utilisation en agriculture et ses effets biopesticides sur les agents pathogènes des maladies des plantes cultivées et la lutte biologique des maladies des cultures maraichères, céréalières, fruitières sont très limitées. Seul, quelques travaux signalent les effets des composés terpéniques ou flavonoidiques tels que ceux de Djeugap *et al.*, (2011) ; Salehan *et al.*, (2013) ; Nagpurne et Patwari (2016) et Rejeki *et al.*, (2017). Les résultats obtenus à partir de cette thèse, entrent dans cette thématique et contribuent à trouver améliorer les recherches, sur les produits alternatifs naturels, qui invitent les agriculteurs à limiter le recours aux pesticides conventionnels.

Les recherches menées, nous permettent d'avancer tout d'abord que l'analyse phytochimique des deux extraits d'Eucalyptus étudiés a mis en évidence la présence de 3 grandes familles de

composés du métabolisme secondaires, polyphénols (les flavonoides, les tanins, anthocyanes), les saponosides et les terpénoïdes avec cependant l'absence des alcaloïdes. Cette absence a été rapportée dans les travaux antérieurs réalisés sur les Myrtacées, famille à laquelle appartient *Eucalyptus camaldulensis* et *Eucalyptus globulus* tels que ceux de Ahmad *et al.*, (1998); de Pamplona-Roger, (1999) ; Shariff, (2001) ; Ayepola et Adeniyi, (2008) ; Jouki et khazaei, (2010) et Sasikala and Kalaimathi 2014. En revanche, quelques auteurs ont signalé que les extraits ethanologiques à partir des feuilles, des tiges et des racines d'*Eucalyptus camaldulensis* (San *et al.*, 2014) renferment les alcaloïdes avec des teneurs variées.

Les taux des polyphénols totaux quantifiés, sont assez importants par comparaison avec d'autres espèces. Des teneurs assez comparables, ont été rapportées par Dezsi *et al.*, (2015), par Lui *et al.*, (2014) et Pereira *et al.*, (2014) sur *Eucalyptus globulus*, par Hassin *et al.*, (2012) sur *Eucalyptus gilii* par Kanoun (2011) sur *Myrtus communis L*, par Alghazeer *et al.*, (2012) sur *Retama raetam*, et par Meraghni *et al.*, (2017) sur *Rosmarinus officinalis*. Parallèlement, d'autres auteurs ont avancé des teneurs moins élevées et à titre d'exemples Djahra (2014) ainsi que Bougandoura et Bendimerad (2012) qui ont enregistré des taux respectivement de l'ordre de 17,08 mg EAG/ml d'extrait méthanolique de *Marrubium vulgare L* et 2,96 mg EAG/gMS d'extrait méthanolique de *Satureja calamintha*.

Par ailleurs, l'identification qualitative sommaire par chromatographie sur couche mince et après le calcul des rapports frontaux, a permis de déceler 17 substances différentes dont 3 sont des composés flavonoidiques, 3 tanniques, 2 stérols et 6 terpéniques. Les analyses poussées par HPLC réalisées par Dezsi *et al.*, (2015) sur l'extrait polyphénolique d'*Eucalyptus globulus*, confirment une composition riche en substances secondaires avec 19 composés phénoliques. Une autre analyse par HPLC-ESI-MS effectuée par Santos *et al.*, (2011) a détecté la présence de 29 composés phénoliques, Ce qui montre la richesse des eucalyptus en principes actifs intéressants pouvant être associés dans des activités biologiques diverses et entres autres, les activités fongicides et bactéricides.

Les concentrations minimales inhibitrices ou CMI obtenues à partir de nos extraits de *E.globulus* et *E.camaldulensis*, sont d'une manière générale non élevées, elle s'échelonnent de 0,017g/ml à 0,068g/ml pour les bactéries (Dilution de 1/8 et 1/32) et de 0,034g/ml à 0,068g/ml pour les champignons (Dilution 1/8 et 1/16). Ces chiffres sont proches des travaux de Behbahani *et al.*, (2013) sur des souches bactériennes Gram + et Gram. Cependant, nos

résultats sont dissemblables aux travaux de Chuku *et al.*, 2016 qui signalent des CMI (50-200 mg/ml) supérieures sur les souches de *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Penicillium expansum* and *Candida albicans* à partir d'une étude sur les feuilles d'*Eucalyptus camaldulensis*, aux concentrations que nous avons obtenues. Des CMI assez rapprochées (85-300 µg/ml) vis à vis de *Botrytis cinerea*, *Fusarium* sp. et *Clavibacter michiganensis* ont été également rapportées par Daferera *et al.*, 2003.

L'évaluation *in vitro*, des effets de nos extraits sur la croissance des champignons et bactéries pathogènes par plusieurs approches méthodologiques, confirme le pouvoir fongistatique et bactériostatique des deux espèces. Les inhibitions de la croissance mycélienne ont été notées à partir de toutes les expérimentations. Les différentes techniques réalisées *in vitro* des substances naturelles des deux *Eucalyptus* comparés avec celles réalisées avec une substance fongicide de synthèse, le Vidan 25 EC, prouvent que les extraits naturels possèdent des potentialités d'inhibition intéressantes vis à vis des agents pathogènes responsables de certaines maladies désastreuses des cultures (*Botrytis cinerea*, *Alternaria alternata*, *Fusarium culmorum*). Les diamètres ainsi que les pourcentages d'inhibition obtenus par la méthode de diffusion sur milieu solide ou celle de l'incorporation dans le milieu liquide avant ensemencement, sont dans tous les cas non négligeables aussi bien sur les champignons que sur les bactéries. En plus de l'effet fongistatique et bactériostatique vis à vis des toutes les souches fongiques ou bactériennes, on dénote également un fort pouvoir fongicide face à quelques espèces virulentes de champignons (*Alternaria alternata*, *Botrytis cinerea*) ainsi qu'un effet bactéricide vis à vis de *Serratia plymuthyca* mais avec un pourcentage de croissance moindre.

L'activité antimicrobienne (antifongique et antibactérienne) testée pour la première fois en mode batch sur milieu discontinu non renouvelé (technique améliorée) nous a permis de suivre la cinétique de croissance à partir de trois paramètres importants (turbidité de la culture (DO), l'acidité du milieu (pH) et la biomasse microbienne de l'inoculum après plusieurs jours de croissance. De l'ensemble des résultats obtenus, il ressort que les différentes substances utilisées sont actives contre les agents pathogènes testés. Il y a une certaine hétérogénéité dans le comportement des souches microbiennes face aux différents composés. Des pH bas ont été relevés après 72 heures d'incubation à partir des milieux contenant l'extrait végétal. Cette acidification du milieu est plus importante que celle enregistrée dans les milieux de cultures additionnés avec le pesticide chimique (Vidan 25 EC), et ce, pour toutes les souches

bactériennes étudiées, mais uniquement pour *Botrytis cinerea* et *Alternaria alternata* pour les souches fongiques. Cette diminution de pH est plus prononcée notamment avec *Serratia plymuthica* et *Alternaria alternata*.

L'acidification du milieu, peut être engendrée par le processus d'inhibition suite aux différentes réactions métaboliques et, en particulier durant la phase de ralentissement et de déclin de la croissance microbienne. La majorité des travaux antérieurs ont signalé des acidifications du milieu, suite à une sensibilité des espèces microbiennes pathogènes lorsqu'elles sont soumises à des effets toxiques exercés par les substances chimiques non biologiques. Ceci est le cas de *Pseudomonas aeruginosa* ayant provoqué une baisse de pH des milieux de croissance supplémenté d'hydrocarbures à partir des travaux de Hassaine et Bordjiba (2017) ; Hassaine et Bordjiba (2015). Un autre cas concernant la baisse de pH en présence de xénobiotiques signalé par Aimeur (2017) à partir d'une étude sur la biodégradation de pesticides par des souches microbiennes isolées. Nos travaux concordent également avec ceux de Vanishree et *al.* (2014), Al Jawahiri et *al.*, (2014) et Belaze (2016).

Le pH est un facteur important de la croissance et de l'activité enzymatique des microorganismes (Sherwood et *al.*, 2010 ; Ballerini, 1999). Il doit être situé pour les bactéries, entre 5 et 9 avec un optimum aux alentours de 7 (Gabet, 2004). Les micromycètes peuvent se développer dans une large gamme de pH ; elles se développent normalement pour des pH compris entre 3 et 8 (Tabuc, 2007). De nombreux champignons préfèrent les pH compris entre 4 et 5 (Singh, 2006). Selon Sherwood et *al.*, (2010) et Ballerini (1999), les variations du pH du milieu induisent probablement une perturbation dans le système enzymatique microbien et réduit la faculté germinative des spores.

Si maintenant, nous nous reportons aux résultats de la biomasse totale fongique et bactérienne, nous constatons que nos extraits possèdent des potentialités d'inhibition non négligeables avec des valeurs variant selon la souche ciblée. Ce pouvoir fongistatique ou bactériostatique exprimé par le poids sec de l'inoculum obtenu à la fin de l'expérimentation est en général moins important que celui provoqué par le pesticide chimique, le Vidan 25 EC qui semble plus efficient. Il est à noter qu'il existe une parfaite corrélation entre la diminution de la biomasse microbienne et la réduction du pH. Les pH proches de la neutralité et/ou acide défavorisent la croissance des nombreux microorganismes. Les biomasses les plus faibles obtenues en présence des extraits sont celles enregistrées avec les souches de *Fusarium*

culmorum et *Penicillium notatum* pour les champignons et celles de *Cedecea lapagei* et *Borkholderia cepacia* pour les bactéries. Toutes ces valeurs ne semblent pas traduire un effet inhibiteur prononcé, c'est à dire bactéricide ou fongicide. Ceci pourrait s'expliquer par le fait que les biomolécules composant nos extraits ne sont pas très toxiques pour les souches testées et n'arrivent pas à exercer une vraie perturbation dans la multiplication cellulaire des souches avec une inhibition presque totale de la population initiale. Toutefois, nous tenons à signaler que la biomasse calculée ne correspond non seulement pas à la population viable mais elle comprend aussi la population non viable; il est donc probable que les charges bactériennes et fongiques détectées après les 72 heures de croissance, soient représentées par une grande part de cellules non viables.

Ces actions fongistatique/bactériostique ou encore fongicide/bactéricide, lorsque l'agent pathogène est soumis à l'effet des extraits d'origine naturelle sont liées à la nature, la structure chimique de ces biomolécules actives. Ces dernières sont douées d'un pouvoir antifongique ou antibactérien et agissent sur le métabolisme de la cellule fongique et bactérienne. Les composés phénoliques de ces extraits peuvent agir à deux niveaux différents: la membrane cellulaire et la paroi cellulaire des microorganismes (Taguri *et al.*, 2006). Ils peuvent interagir avec les protéines membranaires des bactéries au moyen d'une liaison hydrogène à travers leurs groupes hydroxyles qui peut entraîner des changements dans la perméabilité de la membrane et provoquer la destruction des cellules. Ils peuvent également pénétrer dans les cellules bactériennes et coaguler le contenu cellulaire (Tian *et al.*, 2009). Les composés phénoliques sont connus pour être synthétisés par les plantes en réponse à une agression mécanique ou une infection microbienne (Doughari *et al.*, 2008 ; Sengul *et al.*, 2009) il est donc logique qu'ils aient été prouvées *in vitro* comme étant des substances antimicrobiennes efficaces contre un large éventail de micro-organismes (Cowan, 1999).

Dans notre cas les souches microbiennes testées, ont montré une sensibilité vis à vis de ces produits. L'extrait ajouté aux culture en mode batch discontinu, semble assez toxique pour les souches et ne pourrait être assimilé en tant que source de carbone et d'énergie, et de ce fait, le composé est susceptible de produire des enzymes spécifiques de dégradation des parois cellulaires comme les chitinases ou protéases (Brunner *et al.*, 2005). En effet, à travers la membrane se produisent des échanges de matière, de gaz et d'énergie indispensable au métabolisme de la cellule. Ce métabolisme est contrôlé par l'information génétique de la cellule, puisque chez des microorganismes mutants dont les gènes sont modifiés, le

métabolisme est différent. Le mécanisme responsable de la toxicité des composés phénoliques vis-à-vis des microorganismes a été associé à une réaction avec les groupements sulfhydryles des protéines suivie d'une indisponibilité de substrats aux micro-organismes (Machado *et al.*,2003 ; Naz *et al.*,2007). Aussi, les sites et le nombre des groupements hydroxyles sur les composants phénoliques peuvent augmenter la toxicité contre les micro-organismes (Cowan , 1999)

Par ailleurs, l'expérimentation *in vivo* réalisée *ex situ* a fait ressortir des résultats assez intéressants. Les symptômes de la maladie sur le poivron (*capsicum annum*) semblent assez sévères sous formes de nécroses. La sévérité de la maladie a été évaluée par la surface nécrosée; les lésions apparues sur le poivron inoculé *ex situ* par l'agent pathogène puis traité varient selon la souche inoculée et la substance injectée.

Globalement, les nécroses sont moins importantes sur les poivrons traités aux extraits naturels. Ces derniers semblent plus efficaces que le Vidan 25 EC. Aussi bien l'extrait d'*Eucalyptus globulus* que celui d'*Eucalyptus camaldulensis* s'avèrent plus efficace contre toutes les souches. Cependant il y a une différence dans la sévérité de la maladie entre les deux espèces d'*Eucalyptus*.

Dans la plupart des cas, la virulence est moins ou plus développée face à l'extrait de *E.globulus* pour les bactéries. De tous les agents pathogènes étudiés, ce sont les *Aspergillus niger* et *Alternaria alternata* qui se sont montrés plus sensibles; ils ont été inhibés et n'ont pas pu exhiber leur pathogénicité et leur virulence face aux extraits naturels. Les études effectuées *in vivo* en *ex situ* concernant le pouvoir pathogène des bactéries et des champignons des plantes cultivées en présence des molécules naturelles ne sont pas nombreuses. Le seul travail similaire a été réalisé par Salehan *et al.*, (2013) sur des cosses de cacao détachées et inoculés par *Phytophthora palmivora* et prétraités par des extraits bruts et des fractions de *Cosmos caudatus*. Cette étude a démontré après 7 jours que l'infection la plus grave a été observée chez le témoin, où seul *Phytophthora palmivora* a été inoculé sur des cosses non traitées (L'exocarpe et le mésocarpe ont été fortement noircis et l'infection a pénétré plus profondément dans l'endocarpe, tandis que l'extrait brut et les fractions à l'acétate d'éthyle (EtOAc) ont donné un degré de protection élevé car seule la partie externe des gousses était noircie par *P. palmivora*. Ceci est en parfaite concordance avec nos résultats où des nécroses minimales ont été exprimées à la suite d'inoculations à base d' *Aspergillus niger*,

Fusarium culmorum, *Burholderia cepacia* et *Chryseobacterium meningosepticum*. Cette protection des tissus de *Capsicum annum* est due à une activité exercée par les substances actives, et en particulier les polyphénols. La même hypothèse a été avancée par Salehan *et al.*, (2013) qui explique une protection similaire ex situ des cosses de cacao par la présence de certains métabolites communs dans l'extrait brut et les fractions de *C. caudatus*.

Les effets de nos extraits semblent fongistatiques plutôt que fongicide, car il y a eu apparition des nécroses uniquement sur la face externe du poivron. Ce résultat est similaire à celui de Salehan *et al.*, (2013) concernant les effets des fractions *C. caudatus* sur *Phytophthora palmivora* ainsi que les travaux de Krauss et Soberanis (2001) ainsi que Krauss et Soberanis (2004) sur ce même champignon. D'autres auteurs tels que Banihashemi et Abivardi (2011) ont par contre rapporté des effets fongicides des huiles essentielles, en particulier le citral, un composé clé des plantes médicinales, contre les espèces de *Phytophthora*.

Pour ce qui est de l'étude de la toxicité des extraits sur les organismes non cibles, nous avons pu collecter des résultats assez intéressants. L'effet toxique est très net sur les graines du blé dur *Triticum durum*. La solution mère ainsi que les différentes concentrations testées ont inhibé presque totalement la germination des graines.

Cet effet toxique exprimé par un pouvoir herbicide est plus prononcé que celui du Vidan 25 EC lorsqu'il est employé à la concentration la plus élevée (140µg). Aussi bien le pourcentage de germination, l'indice de germination que le nombre des racines et la longueur des racines sont affectées. Dès le départ et à partir de 48h, le nombre des graines est très faible et n'augmente pas avec le temps. Après 72h, le nombre des graines germées reste identique à celui de 48h.

En ce qui concerne le nombre des racines, la toxicité des extraits est également prononcée avec un nombre très restreint à 48h et qui le restera même après 72h. Le nombre des racines développées n'augmentent pas avec le temps même en présence du pesticide chimique qui semble également exercer un effet toxique sur l'apparition des racines.

Pour ce qui est de la longueur des racines, on dénote des résultats contraires à ceux qui ont été enregistrés pour le pourcentage de germination et le nombre des racines. On enregistre une croissance assez similaire des racines en présence des extraits par rapport au Vidan 25 EC et au témoin. Les résultats obtenus viennent confirmer ceux signalés dans la littérature, tels que

les travaux réalisés sur les composés des différents *Eucalyptus* qui ont démontré cet aspect herbicide phytotoxique. Parmi les travaux réalisées sur le pouvoir herbicide des extraits naturels et en particulier les substances naturelles d'*Eucalyptus*, nous mentionnons ceux de Setia *et al.*, (2007) et Daizi *et al.*, (2006) qui ont testé l'huile essentielle d'*Eucalyptus citriodora* ainsi que les travaux d'Imatomi *et al.*, (2015) sur l'effet phytotoxique d'extraits aqueux de quatre espèces de Myrtaceae sur des mauvaises herbes. Les études entreprises par Ladhari *et al.*, (2011) sont en parfaite corrélation avec nos résultats, puisque les extraits aqueux de *Daphne Gnidium* ont exprimé une toxicité vis-à-vis d'une espèce cultivée non cible (la laitue, *Lactuca sativa*), qui a provoqué l'inhibition de 60 à 80% de la germination des graines.

Nous tenons à signaler en outre que cet effet herbicide a été constaté sur terrain in situ au niveau de notre site d'échantillonnage (forêt de Bougantas Annaba), où nous avons noté l'absence de développement des espèces herbacées tout autour des arbres et une inhibition totale de la flore herbacée forestière à proximité d'*Eucalyptus camaldulensis*. L'activité herbicide de nos extraits pourrait s'expliquer par la présence des composés abondants tels que les substances terpéniques, tanniques et flavonoidiques. En effet, il est connu que les composés herbicides d'origine naturelle ou synthétiques sont des inhibiteurs de la division cellulaire et en particulier le blocage de la tubuline et du fuseau achromatique (Calvet *et al.*, 2005). Ce sont également des perturbateurs de la croissance avec une action inhibitrice sur la synthèse de l'auxine et du transport auxinique. Ils agissent négativement sur les découplants, la photosynthèse, le PSI et le PSII et sur la synthèse de l'acide folique et la cellulose (Calvet *et al.*, 2005).

Un autre test préliminaire sur un organisme animal non ciblé, nous a permis de démontrer la toxicité de la solution mère de ces extraits naturels sur la croissance de *Loboptera decipiens*. Les taux de mortalité dus aux substances absorbées par voie orale sont d'abord faibles au début de l'expérimentation, puis augmentent avec le temps. Cette espèce animale s'est avérée plus sensible vis-à-vis de l'*Eucalyptus globulus*, cette sensibilité se traduit par l'accroissement du taux de mortalité avec 80% au bout d'un mois. Par contre, elle a exhibé une certaine résistance face à l'*Eucalyptus camaldulensis*, le taux de mortalité n'atteint que 60% au bout de 30 jours. Nous ne pouvons malheureusement comparer la fiabilité de nos résultats, car les tests de toxicité sur les organismes non cibles sont peu nombreux ou quasiment nuls. Idéalement, la toxicité des biomolécules actives sur les individus non ciblés devrait être nulle dans

l'environnement. Seul les ravageurs nuisibles devraient être contrôlés (Meeusen et Warren, 1989). Cependant, est-ce vraiment le cas?

Il est à noter que nous sommes en présence de produits naturels dont la structure pourraient être très complexes et pouvant éventuellement affecter les organismes utiles nécessaires au bon fonctionnement de l'agro-écosystème, de façon directe et/ou indirecte. L'effet direct serait dû à l'ingestion de toxines par des organismes utiles, et les effets indirects se résument globalement dans les changements (physiologiques, biochimiques des organismes) et les changements des paramètres physicochimiques des autres composantes de l'environnement (sol, eau, air). La toxicité de ces nouvelles biomolécules sur les prédateurs, les pollinisateurs, les mammifères etc... pourrait être liée à une inhibition et une perturbation des systèmes enzymatiques impliqués dans les processus biologiques vitaux de la cellule telle que L'inhibition des protéases. Il semblerait toutefois que les prédateurs ont la capacité d'adapter leur métabolisme digestif en présence de protéines toxiques ingérées par leurs proies (Bouchard *et al.*, 2003). Ainsi, sans causer la mort, les inhibiteurs de protéase retrouvés dans certains pollens causent des changements d'activités enzymatiques dans l'intestin (Malone et Burgess, 2000). Ces molécules actives, quoique naturelles, leur effet bénéfique peut interférer avec d'autres actions négatives sur tout l'environnement.

Évaluer les risques toxicologiques et/ou écologiques de ces métabolites secondaires naturels s'avère très délicate car toutes les activités comportent des risques qui ne peuvent pas être totalement éliminés. Il faut les réduire au minimum tout en conservant des exigences sécuritaires pour l'homme et l'environnement (Ingold, 1988). Selon Gauthier (1999), le risque peut être défini comme suit: «probabilité qu'un acte posé, généralement considéré comme potentiellement dangereux sur l'écosystème, se produise dans des situations particulières». Il est possible que des variables et/ou critères développés actuellement soient considérés comme désuets dans le futur ou encore que des paramètres peu sensibles donnent des effets indésirables et non imaginés, lourds de conséquences pour l'environnement (Rouisse, 1999).

Pour éliminer au maximum ces imprévus inutiles, il serait intéressant d'évaluer puis de gérer les risques de la manière la plus rigoureuse et la plus complète possible. Car une fois ces produits lâchés dans l'agro-écosystème, il sera difficile, voire impossible, de stopper ou freiner les échanges qui auront lieu entre ces plantes et l'environnement (Shatters, 2000). Malheureusement, La gestion des risques demandent de grands investissements.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Dans cette étude, des expérimentations *in vitro* et *ex situ* sur des extraits hydro-méthanoliques des deux espèces d'*Eucalyptus* ont été effectuées, dans le but de déterminer l'effet biopesticide sur les agents pathogènes des cultures céréalières et maraichères afin de sélectionner des biomolécules naturelles actives. Ces dernières pourront constituer une alternative aux produits phytosanitaires de synthèse (les pesticides) pour la gestion des productions agricoles et le développement durable. Les résultats des différents tests *in vitro* et *ex situ* des extraits nous ont permis de rassembler un certain nombre de données.

Tout d'abord, le criblage phytochimique des extraits foliaires bruts a permis de mettre en évidence, la présence des 4 groupes de composés, appartenant à des familles potentiellement actives, les polyphénols, les terpènes, les tanins et les stérols traduisant ainsi la richesse de ces plantes en principes actifs. Ces derniers renferment une teneur non négligeable en polyphénols totaux égale à 74,7 et 75,2 mg EAG/ml.

L'identification qualitative sommaire de ces métabolites secondaires effectuée par CCM a dévoilé la présence de 17 composés dont 9 sont issus des extraits de *Eucalyptus globulus* et 8 provenant de *Eucalyptus camaldulensis* se subdivisant en flavonoïdes, triterpènes, tanins et stérols

Des CMI et CMB plus ou moins faibles, selon la nature de l'agent pathogène ciblé, témoignent de l'efficacité des extraits des deux espèces d'*Eucalyptus*. Cette efficacité est confirmée par un pouvoir inhibiteur plus ou moins important de la croissance des agents pathogènes testés au travers des différents essais. Cette évaluation *in vitro* de l'effet des extraits sur la croissance des champignons et bactéries pathogènes par plusieurs approches méthodologiques, confirme le pouvoir fongistatique et bactériostatique des deux espèces d'*Eucalyptus*.

L'activité antimicrobienne (antifongique et antibactérienne) testée pour la première fois en mode batch, sur milieu discontinu non renouvelé, nous a permis de suivre l'activité fongistatique/bactériostatique ou encore fongicide/bactéricide. Une sensibilité de la plupart des souches microbiennes lorsqu'elles sont soumises à l'effet des deux extraits naturels a été mise en exergue confirmant ainsi la toxicité des biomolécules végétales pour les agents

pathogènes des différentes cultures. Les souches *Serratia plymuthyca*, *Alternaria alternata* et *Botrytis cinerea* sont les plus affectées par cette inhibition et dont la croissance a été fortement limitée. Cet effet réductif et toxique, pourrait être lié à la présence de différents composés flavonoidiques et tanniques et voire même des stérols au niveau des feuilles d'*Eucalyptus globulus* et *Eucalyptus camaldulensis*.

Par surcroît, les bioessais réalisés ex situ sur *Capsicum annum* confirme encore une fois de plus l'efficacité des extraits d'origine végétale avec apparition des nécroses sur une surface limitée de l'exocarpe et du mésocarpe par comparaison aux plages nécrosées formées après traitement par le pesticide chimique vidan 25 EC. La sévérité des nécroses qui sont superficielles et non profondes est corrélée avec la nature du composé d'une part, et la souche pathogène visée d'autre part.

Par ailleurs, les tests de toxicité sur les organismes non cibles, ont démontré un effet inhibiteur des extraits d'Eucalyptus très net sur les graines du blé dur, *Triticum durum*. La solution mère, ainsi que les différentes concentrations testées ont inhibé presque totalement la germination des graines. Cependant, on dénote une diminution de la toxicité en fonction du temps. En effet, On enregistre une croissance assez normale des racines similaire à celle du témoin après 72h. Ce comportement serait dû à la dégradation des composés de l'extrait dans les étapes avancées de la germination.

Par ailleurs, la toxicité des extraits vérifiée sur une espèce de blattes, *Loboptera decipiens* a permis d'apprécier la toxicité de la solution mère des extraits après 48h qui n'est pas plus forte que celle du produit phytosanitaire le Vidan 25 EC. Les taux de mortalité sont plus accentués en présence des extraits *E. globulus* (80%). En revanche cette espèce de blattes semble un peu plus résistante face à *E.camaldulensis* (60%). La toxicité des blattes enregistrée pourrait s'expliquer par une inhibition de la protéase ou une perturbation des autres systèmes enzymatiques impliqués dans les processus biologiques vitaux de la cellule.

Que ce soit au niveau fondamental ou appliqué, de la compréhension des activités antimicrobiennes (antibactérienne et antifongique), de nombreuses perspectives découlent de cette recherche. En fait, des études plus approfondies sur le pouvoir bactériostatique/ fongistatique ou bactéricide. Pour pouvoir le démontrer, il est nécessaire de déterminer le ou

les CMI et les CMB et en particulier les CMI à partir des doses efficaces capables de provoquer la mort de presque toute la population initiale et ne laissant subsister que 0,01% de celle-ci.

Par ailleurs, d'un point de vue appliqué, nous ne disposons pas encore d'informations suffisantes pour concevoir une utilisation efficace et rationnée de ces extraits végétaux, en tant que biopesticides. De ce fait, plusieurs expériences complémentaires doivent être réalisées, en l'occurrence :

- Il serait judicieux de comparer l'effet des ces substances naturelles sur un large panel de souches phytopathogènes multi-résistantes.
- Des études complémentaires et détaillées s'avèrent être utiles afin d'évaluer la toxicité de ces extraits foliaires sur d'autres organismes non cibles animaux et végétaux
- Une identification quantitative et qualitative détaillée des extraits et de leurs chemotypes s'avère indispensable afin de pouvoir déterminer les biomolécules actives, qui sont associées dans les processus de la lutte biologique.

En guise de conclusion, nous terminerons nos propositions de perspectives par répéter, ce qu'a avancé un chercheur agronome de l'université du Québec, Fleury (2003) : *l'heure est au choix. Il faut se décider si, on veut investir de façon durable dans une agriculture fournissant des aliments sains, pour les êtres humains, tout en ayant des impacts minimes sur l'environnement, on ne doit pas dire non aux nouvelles technologies sous prétexte de peurs non identifiées. Les plantes offrent très certainement des possibilités intéressantes pour l'avenir de l'agriculture. De plus, il faut continuer d'étudier les risques que peuvent avoir ces produits naturels végétaux dans les différents agro-écosystèmes de cette planète pour obtenir une image aussi globale que possible concernant leurs effets sur l'écologie.*

REFERENCES
BIBLIOGRAPHIQUES

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Abbott, G. et Wingard, P., 1981.** The Teaching of English as an International Language. Collins, London.
- Ahmad, M., Sayyed, A.H. et Saleem, M.A., 2008.** Evidence for field evolved resistance to newer insecticides in *Spodoptera litura* (*Lepidoptera noctuidae*) from Pakistan. *Crop Prot.*, **27**(10): 1367-1372.
- AI-Jawhari, I.F.H. 2014.** Ability of some soil fungi in biodegradation of petroleum hydrocarbon. *Journal of Applied & Environmental Microbiology.*, **2**(2): 46-52.
- Aimeur, N., 2017.** Effet des pesticides sur la microflore des eaux dans la région du Nord-Est algérien. Biodégradation par les souches isolées. Thèse Doctorat, Université Annaba. 175p.
- Amaral, J.A., Ekins, A., Richards, S.R. et Knowles, R., 1998.** Effect of Selected Monoterpenes on Methane Oxidation, Denitrification, and Aerobic Metabolism by Bacteria in Pure Culture. *Applied and Environmental Microbiology.*, **64**: 520-525.
- Amhis, W., Benslimane, A., Tiout, D. et Naim, M., 2001.** Tests de sensibilité utiles au traitement antibiotique. *Médecine de Maghreb.* **91**: 022-025.
- Anastasiadis, I., Giannakou, I., Prophetou-Athanasiadou, D. et Gowen, S., 2008.** The combined effect of the application of a biocontrol agent *Paecilomyces lilacinus*, with various practices for the control of root knot nematodes. *Crop Prot.*, **27**: 352-361.
- Anonyme, 2003.** Information Eucalyptus : présentation générale de l'eucalyptus afocel : lettre d'information semestriel eucalyptus Numéro 1 .fiche information eucalyptus. **1**: 1-4.
- Aquiloni, L. et Gherardi, F., 2010.** The use of sex pheromones for the control of invasive populations of the crayfish *Procambarus clarkia*: a field study. *Hydrobiologia.*, **649**: 249-254.
- Ayepola, O.O. et Abdulkareem, B.A., 2008.** The Antibacterial Activity of Leaf Extracts of Eucalyptus camaldulensis (Myrtaceae), *Journal of Applied Sciences Research.*, **4**(11): 1410-1413.
- Bajwa, W.I. et Kogan, M., 2004.** Cultural practices: springboard to IPM. In: Integrated Pest Management: Potential, Constraints and Challenges, Koul, O., G.S. Dhaliwal and G.W. Cuperus (eds.). CABI Publishing, Wallingford, United Kingdom, pp. 21-38.
- Ballerini, D., 1999.** Traitements biologiques des sols. Tech. Ing., pp.1-2.
- Banihashemi, Z. et Abivardi, C., 2011.** Evaluation of fungicidal and fungistatic activity of plant essential oils towards plant pathogenic and saprophytic fungi. *Phytopathol. Mediterr.*, **50**: 245-256.

- Bates, S., Zhao, J.Z., Roush, R. et Shelton, A., 2005.** Insect resistance management in GM crops: past, present and future. *Nat. Biotechnol.*, **23**: 57-62.
- Batish, D.R., Singh, H.P., Kohli, R. et Kaur, S., 2008.** Eucalyptus essential oil as a natural pesticide. *Forest Ecology and Management.*, **256**: 2166-2174.
- Behbahani, B.A., Yazdi, F.T., Mortazavi, A., Zendeboodi, F., Gholian, M.M. et Vasiee, A., 2013.** Effect of aqueous and ethanolic extract of *Eucalyptus camaldulensis* L. on food infection and intoxication microorganisms “ in vitro ”. *J Paramed Sci.*, **4**(3): 89-99.
- Belaze, A.H., 2016.** Effets des pesticides sur les deux composantes de l'environnement (sol, eau) responsables de leur transfert le long de la chaîne alimentaire. Biodegradation d'un fongicide et d'un herbicide par la flore microbienne isolée. Thèse Doctorat, Université Annaba. 181p.
- Ben Hassine, D., Abderrabba, M., Yvon, Y., Lebrihi, A., Mathieu, F., Couderc, F et Bouajila, J., 2012.** Chemical composition and *in vitro* evaluation of the antioxidant and antimicrobial activities of *Eucalyptus gillii* essential oil and extracts. *Molecules.*, **17**: 9540-9558.
- Benhamouda, M., Ghobal, H. et Kremar, R.J., 2001.** Allelgsathic effects of barley extracts on germination an ace ling growth of brearon durum wheats. *Agronomies. INRA. Ed. Sciences.* **21**: 65-71.
- Benjlali, B., Tantaoui-Elaraki, A., Ismaïli-Alaoui, M. et Ayadi, A., 1986.** Méthode d'études des propriétés antiseptiques des huiles essentielles par contact direct en milieu gélosé. *Plant Médicinal Phytotherapy.* **20**: 155-167.
- Bezzar-Bendjazia., 2016.** Effet d'un biopesticide, l'azadirachtine, sur un modèle de référence, *Drosophila melanogaster* (Diptera): Toxicité, Développement et Digestion. Thèse de Doctorat LMD, Université de Annaba. p125.
- Botton, B., Breton, A., Fèvre, M., Gauthier, S., Guy, P., Larpent, J.P., Reymond, P., Sanglier, J.J., Vayssier, Y. et Veau, P., 1990.** Moisissures utiles et nuisibles, Importance industrielle, Ed. Masson, Paris. pp. 12-426.
- Bouachria, O., 2005.** Etude du cycle de développement de *Loboptera decipiens* (Dictyoptera : Blattellidae) dans les conditions contrôlées. Mémoire d'ingénieur. Université de Annaba (Algérie). 55p.
- Bouchard, É., Cloutier, C. et Michaud, D., 2003.** Oryzacystatin I expressed in transgenic potato induces digestive compensation in an insect natural predator via its herbivorous prey feeding on the plant. *Molec. Ecol.*, **12**: 2439-2446.
- Bougandoura, N. et Bendimerad, N., 2012.** Effet antifongique des extraits aqueux et méthanolique de *Satureja calamintha* ssp.(Nepeta) briq. *Revue des BioRessources.*, **2**(1): 1-7.

- Boulon, J.P., 2010.** Qu'est-ce que ? *Pseudomonas chlororaphis* souche MA342 bio-fongicide en traitement de semences de blé, triticales et seigle. *Phytoma Défense Végétaux.*, **632**: 10-12.
- Bouquet, A., 1972.** Plantes Médicinales du Congo Brazzaville. Ed: O.R.S.T.O.M.
- Bouziani, M., 2007.** L'usage immodéré des pesticides. De graves conséquences sanitaires. Le guide de médecine et de la santé. Santémaghreb. [consulté le, 11/12/2011]. <http://www.santetropicale.com/santemag/algerie/poivue51.htm>.
- Brar, S.K., Venna, M., Tyagi, R.D., Valéro, J.R. et Surampalli, R.Y., 2006.** Efficient centrifugal recovery of *Bacillus thuringiensis* biopesticides from fermented wastewater and wastewater sludge. *Water Research.*, **40**: 1310-1320.
- Bravo, A., Likitvivatanavong, S., Gill, S.S. et Soberón, M., 2011.** *Bacillus thuringiensis*: a story of a successful bioinsecticide. *Insect Biochemistry and Molecular Biology.*, **41**: 1-9.
- Bruneton, J., 1999.** pharmacognosy Phytochemistry medical plants Lavoisier publishing, USA, New York 2:a upplagan s. pp. 555-558.
- Brunner, K., Zeilinger, S., Ciliento, R., Woo, S.L., Lorito, M., Kubicek, C.P. et Mach, R.L., 2005.** Improvement of the fungal biocontrol agent *Trichoderma atroviride* to enhance both antagonism and induction of plant systemic disease resistance. *Appl. Environ. Microbiol.*, **71**(7): 3959-3965.
- Calderón-Alvarez, C., Causton, C.E., Hoddle, M.S., Hoddle, C.D., Driesche, R., van. et Stanek, E.J., 2012.** Monitoring the effects of *Rodolia cardinalis* on *Icerya purchasi* on the Galapagos Islands. *BioControl.*, **57**(2): 167-179.
- Calvet, R., Barriuso, E., Benoit, P., Bedos, C., Charnay M.P. et Coquet, Y., 2005.** Les pesticides dans le sol. Conséquences agronomiques et environnementales. Editions France Agricole, Paris, 637p.
- Chandler, D., Bailey, A.S., Tatchell, G.M., Davidson, G., Greaves, J. et Grant, W.P., 2011.** The development, regulation and use of biopesticides for integrated pest management. *Philos. Trans. R. Soc. London Ser. B.*, **366**(1573): 1987-98.
- Chen, X., Zhang, W.J., Wong, J., Chun, G., Lu, A., McCutchen, B.F., Presnail, J.K., Herrmann, R., Dolan, M., Tingey, S., Hu, Z.H. et Vlak, M., 2002.** Comparative analysis of the complete genome sequences of *Helicoverpa zea* and *Helicoverpa armigera* single-nucleocapsid nucleopolyhedroviruses. *J. Gen. Virol.*, **83**: 673-684.
- Chomienne, J.P., Dutartre, S., Larguier, M., Pinçonnet, D. et Tessier, R., 2017.** Les produits de biocontrôle pour la protection des cultures [en ligne]. Rapport de recherche du Ministère de l'agriculture de l'agronomie et de la forêt, Conseil général de l'alimentation de l'agriculture et des espaces ruraux n° 16055. Paris CEDEX, **15**:87.
- Chopard, L., 1943.** Orthoptéroïdes de l'Afrique du Nord. Faune de l'empire Français. Ed. Librairie Larousse. Paris, 447p.

- Chuku, A., Ogbonna, A.I., Obande, G.A., Namang, M. et Ahmad, I.R., 2016.** Antimicrobial Effects of Leaves of *Eucalyptus camaldulensis* on Some Microbial Pathogens. *European Journal of Medicinal Plants.*, **14**(2): 1-8.
- Cronquit, A., 1981.** Système intégré de classification des plantes à fleurs. Columbia Univ. Press, NY. 1268p
- Compant, S., Clément, C. et Sessitsch, A., 2010.** Plant growth promoting rhizobacteria in the rhizo and endosphere of plants: their role, colonization, mechanisms involved and prospects for utilization. *Soil Biol. Biochem.*, **42**: 669-678.
- Correia, A.A., Wanderley-Teixeira, V., Teixeira, A.A., Oliveira, J.V., Gonçalves, G.G., Cavalcanti, M.G., Brayner, F.A. et Alves, L.C., 2013.** Microscopic analysis of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) embryonic development before and after treatment with azadirachtin, lufenuron, and deltamethrin. *J. Econ. Entomol.*, **106**(2), 747-755.
- Coupe, R.H., Manning, M.A., Foreman, W.T., Goolsby, D.A. et Majjewski, M.S. 2000.** Occurrence of pesticides in rain and air in urban agricultural areas of Mississippi, 1995. *The Science of the Total Environment.*, **248**: 227-240.
- COWAN, M., 1999.** Plants products as antimicrobial agents. *Clin.Microbiol.* **12**: 564-582.
- Daferera, D.J., Ziogas, B.N. et Polissiou, M., 2003.** The effectiveness of plant essential oils on the growth of *Botrytis cinerea*, *Fusarium sp.* and *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. *Crop Protection.*, **22**(1): 39-44.
- Deravel, J., Krier, F. et Philippe-Jacques, P. 2014.** Les biopesticides, compléments et alternatives aux produits phytosanitaires chimiques (synthèse bibliographique). *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.*, **18**(2): 220-232.
- Dezsi, Ş., Bădărău, A.S., Bischin, C., Vodnar, D.C., Silaghi-Dumitrescu, R., Gheldiu, A.M., Mocan, A. et Laurian-Vlase., 2015.** Antimicrobial and Antioxidant Activities and Phenolic Profile of *Eucalyptus globulus* Labill. and *Corymbia ficifolia* (F. Muell.) K.D. Hill & L.A.S. Johnson Leaves. *Molecules.*, **20**: 4720-4734.
- Djahra, A.B., 2014.** Etude phytochimique et activité antimicrobienne, antioxydante, antihépatotoxique du Marrube blanc ou *Marrubium vulgare* L. Thèse de Doctorat, Université Annaba. 115p.
- Djeugap, J.F., Fontem, D.A et Tapondjou, A.L., 2011.** Efficacité *in vitro* et *in vivo* des extraits de plantes contre le mildiou (*Phytophthora infestans*) de la morelle noire. *Int. J. Biol. Chem. Sci.* **5**(6): 2205-2213.
- Dodd, S., Lieckfeldt, E. et Samuels G., 2003.** *Hypocrea atroviridis* sp. nov., the teleomorph of *Trichoderma atroviride*. *Mycologia*, **95**(1): 27-40.
- Domsch, K.H., Gams, W. et Traute-Heidi, A., 1980.** Compendium of soil fungi. Academic Press, London. **1**(2).

- Dong, L., Yang, J. et Zhang, K., 2007.** Cloning and phylogenetic analysis of the chitinase gene from the facultative pathogen *Paecilomyces lilacinus*. *J. Appl. Microbiol.*, **103**(6): 2476-2488.
- Doughari, J.H., El-mahmood, A.M. et Tyoyina, I., 2008.** Antimicrobial activity of leaf extracts of *Senna obtusifolia* L. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology.*, **2**: 007-013.
- Drugeon, H., Legallou, F. et Caillon, J., 1991.** Méthodes d'étude de l'activité bactéricide. Aspects théoriques et thérapeutiques. Edité par : Courvalin P, Drugeon H, Flandrois J.P et Goldstein F. Maloine Paris.
- Dunstan, H., Florentine, S.K., Calviño-Cancela, M., Westbrooke, M.E. et Palmer, G.C., 2013.** Dietary characteristics of Emus (*Dromaius novaehollandiae*) in semi-arid New South Wales, Australia, and dispersal and germination of ingested seeds. *CSIRO PUBLISHING.*, **113**: 168-176.
- Elliot, W.R. et Jones, D.L., 1984.** Encyclopaedia of Australian Plants suitable for cultivation.
- Eriksson, H. et Wikteliuss, S., 2011.** Impact of chlorpyrifos used for desert locust control on non target organisms in the vicinity of mangrove, an ecologically sensitive area. *Int J Pest Manag.*, **57**(1):23-34.
- Huq, F. et Misra, L.N., 1997.** An alkenol and c-methylated flavones from callistemon lanceolatus leaves. *Planta medica.*, **63**(4): 369-370.
- Fallah, H., Ksouri, R., Chaieb, K., Karray-Bouraoui, N., Trabelsi, N., Boulaaba, M. et Abdelly, C., 2008.** Phenolic composition of *Cynara cardunculus* L. organs, and their biological activities. *Compte Rendu de Biologie.*, **331**: 372-379.
- Fernández, H., Martin, R. et Thibaut, J., 1996.** *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* resistant to fluoroquinolones in domestic animals. *Arch Med Vet.*, **28**: 151-154.
- Ferrah, C., 2005 .** Structure d'une population de *Loboptera decipiens* (Dictyoptera : Blattellidae) dans la subéraie de Brabtia d'El-Kala. Etude du comportement sexuel en enceinte close. Mémoire d'Ingéniorat. Université de Annaba (Algérie). 40p.
- Fourati-Ben Fguira, L., Fotso, S., Ben Ameer-Mehdi, R., Mellouli, L. et Laatsch, H., 2005.** Purification and structure elucidation of antifungal and antibacterial activities of newly isolated *Streptomyces* sp. strain US80. *Res. Microbiol.*, **156**(3): 341-347.
- Gabet, S., 2004.** Remobilisation d'Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques (HAP) presents dans les sols contaminés à l'aide d'un tensioactif d'origine biologique. Thèse de doctorat de l'Université de Limoges, spécialité Chimie et Microbiologie de l'Eau. 186p.
- Gauthier, R., 1999.** La place de l'évaluation du risque dans la gestion de terrains contaminés au Québec. *Vect. Environ.*, **32**: 17-22.

- Goettel, M. et Hajek, A., 2001.** Evaluation of non-target effects of pathogens used for management for arthropods. *In: Wajnberg E., Scott J.K. & Qimby P.C., eds. Evaluating indirect ecological effects of biological control.* Wallingford, UK: CABI Publisher, pp. 81-97.
- Grewal, P., Grewal, S., Tan, L. et Adams, B., 2003.** Parasitism of molluscs by nematodes: types of associations and evolutionary trends. *J. Nematol.*, **35**(2): 146-156.
- Hamburger, M. et Hostettmann, K., 1991.** Bioactivity in plants: The link between phytochemistry and medicine. *Phytochemistry.*, **30**: 3864-3874.
- Haraguchi, K., Kitamura, E., Yamashita, T. et Kido, A., 1995.** Simultaneous determination of trace pesticides in urban precipitation. *Atmospheric Environment.*, **29**: 247-253.
- Harman, G., 2011.** *Trichoderma* not just for biocontrol anymore. *Phytoparasitica.*, **39**: 103-108.
- Harwood, C.R. et Wipat, A., 1996.** Sequencing and functional analysis of the genome of *Bacillus subtilis* strain 168. *FEBS Letters.*, **389**:84-87.
- Haslam, E., 2007.** Vegetable tannins - Lessons of a phytochemical lifetime. *Phytochemistry.*, **68**(22-24): 2713-2721.
- Hassaine, A. et Bordjiba, O., 2015.** Metabolic Capacities of Three Strains of *Pseudomonas Aeruginosa* to Biodegrade Crude Oil. *Advances in Environmental Biology.*, **9**(18): 139-146.
- Hassaine, A. et Bordjiba, O., 2017.** Biodégradation des hydrocarbures par la microflore des eaux. Edition Universitaire Européenne (EUE). ISBN 60202263571.
- Haupt, J. et Haupt, H., 1998.** Guide des milles pattes, arachnides et insectes de la région méditerranéenne. *Ed. Delachaux et Niestle.*, 357p.
- Hirata, T., Fujii, M., Akita, K., Yanaka, N., Ogawa, K., Kuroyanagi, M. et Hongo, D., 2009.** Identification and physiological evaluation of the components from Citrus fruits as potential drugs for anti-corpulence and anticancer Bioorganic & Medicinal Chemistry **17**: 25-28.
- Imatomi, M., Novaes, P., Miranda, M.A.F.M et Gualtieri, S.C.J., 2015.** Phytotoxic effects of aqueous leaf extracts of four Myrtaceae species on three weeds. *Acta Scientiarum. Agronomy.*, **37**(2): 241-248.
- Ingold, M., 1988.** Biotechnologie: quels risques?. *Revue suisse Agric.*, **20**(2): 63.
- Irace-Guigand, S., Aaron, J.J., Scribe, P. et Barceleó, D., 2004.** À compararion of the environmental impact of pesticide multiresidues and their occurrence in river waters surveyed by liquid chromatography coupled in tandem with UV diode array detection and mass spectrometry. *Chemosphere.*, **55**: 973-981.

- Iserin, P., Masson, M., Restellini, P., Ybert, E., De Laage De Meux, A., Moulard, F., Zha, E., De La Roque, R., De La Roque, O., Vican, P., Deelesalle –Feat, T., Biaujeaud, M., Ringuet, J., Bloth, J. et Botrel, A., 2001.** Toxicological evaluation of *Aristolochia longa* L. extract in mice. *Indian journal of Applied Research.*, **4**(5): 2249-555.
- Jisha, V.N., Smitha, R.B. et Benjamin, S., 2013.** An Overview on the Crystal Toxins from *Bacillus thuringiensis*. *Advances in Microbiology.*, **3**:462-472.
- Jouki, M. et Khazae, N., 2010.** Compare of extraction of phenolic compounds from *Pistacia atlantica* in different solvents. *Advances in Biomedical Research.*, pp. 361-365.
- Kalkhambkar, G., Kulkarni, M., Shivkumar, H. et Rao, N., 2007.** Synthesis of novel triheterocyclicthiazoles as anti-inflammatory and analgesic agents. *European Journal of Medicinal Chemistry.*, **42**: 1272-1276.
- Kamagate., Kone, D., Coulibaly, N.T., Brou, E. et Sixou, M., 2001.** Etude comparative de différentes méthodes d'évaluation de la sensibilité aux antibiotiques. *Oronto-Stomatologie tropical.*, 95p.
- Kanoun, K., 2011.** Contribution à l'étude phytochimique et activité antioxydante des extraits de *Myrtus communis* L. (Rayhane) de la région de Tlemcen (Honaine). Mémoire de Magister, Université de Tlemcen. 48p.
- Katsoyiannis, A. et Samara, C., 2004.** Persistent organic pollutants (POPs) in the sewage treatment plant of Thessaloniki, Northern Greece: occurrence and removal. *Water Research.*, **38**: 2685-2698.
- Kebe, I.B., Mpika, J., N'Guessan, F.K., Hebbar, P.K., Samuels, G.S. et Ake, S., 2009.** Isolement et identification de microorganismes indigènes de cacaoyères en Côte d'Ivoire et mise en évidence de leurs effets antagonistes vis-à-vis de *Phytophthora palmivora*, agent de la pourriture brune des cabosses. *Sciences & Nature.*, **6** (1): 71-82.
- Kheddam-Benadjal, N., 2012.** Enquete sur la ggestion des pesticides et recgerce d'une Méthode de lutte alternative contre *Meloidogyne incognita* (Nematoda : *Meloidogynidea*). Mémoire de Magister. Ecole National Supérieur agronomique El Harrach. Alger.
- Kirk, P.M., Cannon, P.F., Minter, D.W. et Stalpers, J.A., 2008.** Dictionary of the Mycota. 10th Edition. Cromwell Press, Trowbridge.
- Ko, W., Kang, H., Lee, J., Kim, Y., Kim, C., Sohn, H. et Lee, H., 2000.** Polymethoxyflavonoids from *Vitex rotundifolia* inhibit proliferation by inducing apoptosis in human myeloid leukemia cells. *Food and Chemical Toxicology.*, **38**: 861-865.
- Köhler, H.R. et Triebkorn, R., 2013.** Wildlife ecotoxicology of pesticides: can we track effects to the population level and beyond?. *Science.*, **341**(6147):759-65.

- Krauss, U. et Soberanis, W., 2001.** Biocontrol of cocoa pod diseases with mycoparasite mixtures. *Biol. Cont.*, **22**: 149-158.
- Kristoff, G., Guerrero, N.R.V. et Cochon, A.C., 2010.** Inhibition of cholinesterases and carboxylesterases of two invertebrate species, *Biomphalaria glabrata* and *Lumbriculus variegates* by the carbamate pesticide carbaryl. *Aquat. Toxicol.*, **96**: 115-123.
- Kumar, S., Chandra, A. et Pandey, K.C., 2008.** *Bacillus thuringiensis* (Bt) transgenic crop: an environment friendly insect-pest management strategy. *J. Environ. Biol.*, **29**(5): 641-653.
- Ladhari, A., Omezzine, F., Rinez, A. et Haouala, R., 2011.** Phytotoxicity of *Daphne Gnidium* L. Occurring in Tunisia. World Academy of Science, *Engineering and Technology.*, **5**: 1534-1537.
- Leng, P., Zhiming, Z., Guangtang, P. et Maojun, Z., 2011.** Applications and development trends in biopesticides. *Afr. J. Biotechnol.*, **10**(86): 19864-19873.
- Letouzey, R., 1982.** Manuel de botanique Forestière, Afrique tropicale. Centre de Technique forestière, Nogent S/Manne, pp. 105-106.
- Li, F., Awale, S., Tezuka, Y. et Kadota, S., 2008.** Cytotoxic constituents from Brazilian red propolis and their structure–activity relationship *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, **16**: 5434-5440.
- Lolloo, R., Maharaih, D., Görgens, J. et Gardiner, N., 2010.** A downstream process for production of a viable and stable *Bacillus cereus* aquaculture biological agent. *Applied Microbiology and Biotechnology.*, **86**: 499-508.
- Longa, C.M., Savazzini, F., Tosi, S., Elad, Y. et Pertot, I., 2009.** Evaluating the survival and environmental fate of the biocontrol agent *Trichoderma atroviride* SC1 in vineyards in northern Italy. *J. Appl. Microbiol.*, **106**(5): 1549-1557.
- Lord, J.C., 2005.** From Metchnikoff to Monsanto and beyond: The path of microbial control. *Journal of Invertebrate Pathology.*, **89**: 19-29.
- Luis, A., Neiva, D., Pereira, H., Gominho, J., Domingues, F. et Duarte, A.P., 2014.** Stumps of *Eucalyptus globulus* as a source of antioxidant and antimicrobial polyphenols. *Molecules.*, **19**: 16428-16446.
- Machado, T.B., Pinto, A.V., Pinto, M.C., Leal, I.C., Silva, M.G., Amaral, A.C., Kuster, R.M. et Netto-dos Santos, K.R., 2003.** In vitro activity of Brazilian medicinal plants, naturally occurring naphthoquinones and their analogues, against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *International Journal of Antimicrobial Agents.*, **21**: 279-284.
- Malone, L.A. et P.J. Burgess., 2000.** Interference of protease inhibitors on non-target organisms. Dans "Recombinant Protease Inhibitors in Plants". D. Michaud (éds). Eurekah, Qc. pp. 91-108.

- Mann, C.M. et Markham, J.L., 1998.** A new method for determining the minimum inhibitory concentration of essential oil. *Journal of Applied Microbiology.*, **84**: 538-544
- Marburg, W.F., 1999.** Plante thérapeutique –tradition, pratique officinale, science et thérapeutique 3^e édition technique et documentation. 636p.
- Marchal, N., Bourdon, J.L. et Richard, C.L., 1991.** Les milieux de culture pour l'isolement et l'identification biochimique des bactéries .3^eème Ed. , Doin éditeurs, Paris.
- McQuilken, M.P., Gemmell, J., Hill, R.A. et Whipps, J.M., 2003.** Production of macrospheptide A by the mycoparasite *Coniothyrium minitans*. *FEMS Microbiol. Lett.*, **2009**(1): 27-31.
- Meeusen, R.L. et Warren, G., 1989.** Insect control with genetically engineered crops. *Annu. Rev. Entomol.*, **34**: 373-381.
- Meissle, M., Romeis, J. et Bigler, F., 2011.** Bt maize and integrated pest management - a European perspective. *Pest Manage. Sci.*, **67**: 1049-1058.
- Melagraki, G., Afantitis, A., Igglessi-Markopoulou, O., Detsi, A., Koufaki, M., Kontogiorgis, C. et Hadjipavlou-Litina, D. J., 2009.** Synthesis and evaluation of the antioxidant and anti-inflammatory activity of novel coumarin-3-aminoamides and their α -lipoic acid adducts. *European Journal of Medicinal Chemistry.*, **44**(7): 3020-3026.
- Meraghni, M., Bordjiba, O., Schenee, S. et Aimeur, N., 2017.** In vitro study of the biopesticide effect of rosemary extracts on pseudomonas strains responsible of tomato diseases. *International Journal of Advances in Science Engineering and Technology.*, **5**(4): 9-13.
- Merhi, M., 2008.** Etude de l'impact de l'exposition à es mélanges de pesticides à faibles dose : caractérisation des effets sur la lignée cellulaire humaines et sur le système hématopoïtique murin. Doctorat de l'Université de Toulouse. France. 249p.
- Moser, S.E. et Obrycki., 2009.** Non-target effects of neonicotinoid seed treatments : mortality of cocci-nellid larvae related to zoophytophagy. *Biol. Control.*, **51**: 487-492.
- Mueller, G.M. et Schmit, J.P., 2007.** Fungal biodiversity: What do we know? What can we predict? *Biodivers Conserv.*, **16**(1):1-5.
- Nagpurne, V.S. et Patwari, J.M., 2016.** Studies on Antimicrobial activity of Medicinal plants against Seed-borne Pathogenic Fungi. *International Research Journal of Biological Sciences.*, **5**(6), 54-56.
- Naz, S., Siddiqi, R., Ahmad, S., Rasool, S.A. et Sayeed, S.A., 2007.** Antibacterial activity directed isolation of compounds from Punica granatum. *J Food Sci.*, **72**(9):341-345.
- Nowakowska, Z., 2007.** Mini-review a review of anti-infective and anti-inflammatory chalcones. *European Journal of Medicinal Chemistry.*, **42**: 125-137.

- Ongena, M. et Jacques, P., 2008.** *Bacillus* lipopeptides: versatile weapons for plant disease biocontrol. *Trends Microbiol.*, **16**(3): 115-125.
- Pamplona-Roger, G.D., 1999.** Encyclopedia of Medicinal Plants., 2nd ed. Education and Health Library, The European Union, U.K. , **1**(2):128-150.
- Pereira, V., Dias, C., Vasconcelos, M.C., Rosa, E. et Saavedra, M.J., 2014.** Antibacterial activity and synergistic effects between *Eucalyptus globulus* leaf residues (essential oils and extracts) and antibiotics against several isolates of respiratory tract infections (*Pseudomonas aeruginosa*). *Ind. Crops Prod.*, **52**: 1-7.
- Pérez-García, A., Romero, D. et de Vicente, A., 2011.** Plant protection and growth stimulation by microorganisms: biotechnological applications of *Bacilli* in agriculture. *Curr. Opin. Biotechnol.*, **22**(2): 187-193.
- Pérez-Pantoja, D., González, B. et Pieper, D.H., 2010.** Aerobic degradation of aromatic hydrocarbons. In: *Handbook of hydrocarbon and lipid microbiology*, Springer, pp. 799-837.
- Petit, J.L., 2014.** Des biopesticides pour remplacer les pesticides [en ligne]. Rapport de recherche. Arbo Bio Infos édito., **192**: 6.
- Pibiri, M.C., 2006.** Assainissement microbiologique de l'air et des systèmes de ventilation au moyen d'huiles essentielles PhD thesis, Federal Polytechnic Institute., Lausanne, France. 177p.
- Popp, J., Pető, K. et Nagy, J., 2013.** Pesticide productivity and food security. A review. *Agron. Sustainable Dev.*, **33**: 243-255.
- Prasad, N.R., Anandi, C., Balasubramanian, S. et Pugalendi, K.V., 2004.** Antidermatophytic activity of extracts from *Psoralea corylifolia* (Fabaceae) correlated with the presence of a flavonoid compound. *J Ethnopharmacol.*, **91**:21-24.
- Rahbani, J., 2015.** Optimisation, étude de la cinétique et dimensionnement de la production des biopesticides à base de souches de *Bacillus thuringiensis* isolée du sol libanais. Doctorat de l'université de Toulouse. France. 234p.
- Ramade., 2011.** Introduction à l'écochimie – Les substances chimiques de l'écosphère à l'homme. Edition Tec et Doc Lavoisier. Paris. 848p.
- Rana, B.K., Singh, U.P. et Taneja, V., 1997.** Anti-fungal activity and kinetics of inhibition by essential oil isolated from leaves of *Aegle marmelos*. *J. Ethnopharmacol.*, **57**: 29-34.
- Rao, S.K., Pavicevic, Z., Du, Z., Kim, J.G., Fan, M., Jiao, Y., Rosebush, M., Samant, S., Gu, W., Pfeffer, L.M., Christopher, A. et Nosrat, C.A., 2010.** Pro-inflammatory genes as biomarkers and therapeutic targets in oral squamous cell carcinoma. *J. Biol. Chem.*, **285**: 32512-32521.

- Rastrelli, L., Totaro, K. et De Simone, F., 2002.** Determination of organophosphorus pesticide residues in Cilento (Campania, Italy) virgin olive oil by capillary gas chromatography. *Food Chemistry.*, **79**: 303-305.
- Rejeki, D., Suharto. et Addy, H.S., 2017.** Antimicrobial Activity of *Tithonia diversifolia*, *Elephantopus scaber*, and *Kigelia africana* Against Plant Pathogens. *Frontiers in Environmental Microbiology.*, **3**(4): 56-61
- Rosas-Garcia, N.M., 2009.** Biopesticide production from *Bacillus thuringiensis*: an environmentally friendly alternative. *Recent Pat. Biotechnol.*, **3**(1): 28-36.
- Rouisse, L., 1999.** L'évaluation des risques toxicologiques ou écologiques: un outil judicieux pour l'établissement de critères environnementaux sécuritaires et défendables. *Vecteur environ.*, **32**: 23-27.
- Saidemberg, D. Ferreira, M.A., Takahashi, T.N., Gomes, P.C., Cesar-Tognoli, L.M., da Silva-Filho, L.C., Tormena, C.F., da Silva, G.V. et Palma, M.S., 2009.** Monoamine oxidase inhibitory activities of indolylalkaloid toxins from the venom of the colonial spider *Parawixia bistriata*: functional characterization of PwTX-I. *Toxicon.*, **54**(6): 717-724.
- Salehan, N.M., Meon, S. et Ismail, I.S., 2013.** Antifungal Activity of *Cosmos caudatus* Extracts against Seven Economically Important Plant Pathogens. *Int. J. Agric. Biol.*, **15**: 864-870.
- Sani, I., Abdulhamid, A. et Bello, F., 2014.** *Eucalyptus camaldulensis*: Phytochemical composition of ethanolic and aqueous extracts of the leaves, stem-bark, root, fruits and seeds. *Journal of Scientific and Innovative Research.*, **3**(5): 523-526.
- Santos, S.A.O., Freire, C.S.R., Domingues, M.R.M., Silvestre, A.J.D. et Neto, C.P., 2011.** Characterization of phenolic components in polar extracts of eucalyptus globulus labill. Bark by high-performance liquid chromatography-mass spectrometry. *J. Agric. Food Chem.*, **59**: 9386-9393.
- Sarni-Manchado, P. et Cheynier, V., 2006.** Les polyphénols en agroalimentaire. Ed. Tec & Doc, Paris, pp. 2-10.
- Sasikala, S. et Kalaimathi, J., 2014.** phytochemical analysis and antibacterial activity of *eucalyptus* sp leaf extract against clinical pathogens. *International Journal of Institutional Pharmacy and Life Sciences.*, **4**(6): 47-58.
- Scalbert, A., 1991.** Antimicrobial properties of tannin. *Phytochem.*, **30**: 3875-3883.
- Scheyer, A., Graeff, C., Morville, S., Mirabel, P. et Millet, M., 2005.** Analysis of some organochlorine pesticides in an urban atmosphere (Strasbourg, east of France). *Chemosphere.* **58**: 1517-1524.

- Schmutterer, H., 1990.** Properties and potential of natural pesticides from the neem tree, *Azadirachta indica*. *Annu. Rev. Entomol.*, **35**: 271-297.
- Sengul, M., Yildiz, H., Gungor, N., Cetin, B., Eser, Z. et Ercili, S., 2009.** Total phenolic content, antioxidant and antimicrobial activities of some medicinal plants. *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences.*, **22**: 102-106.
- Setia, N.D.R., Batish, D.R, Singh, H.P. et Kohli, R.K., 2007.** Phytotoxicity of volatile oil from *Eucalyptus citriodora* against some weedy species. *Journal of Environmental Biology.*, **28**(1): 63-66.
- Shah, M.D. et Iqbal, M., 2010.** Diazinon-induced oxidative stress and renal dysfunction in rats. *Food Chem Toxicol.* **48**(12): 3345-53.
- Shariff, Z.U., 2001.** Modern Herbal Therapy for Common Ailments. Nature Pharmacy Series, Spectrum Books Limited, Ibadan, Nigeria in Association with Safari Books (Export) Limited, United Kingdom, **1**: 9-84.
- Shatters, R.G. 2000.** Environmental impact of biotechnology. Dans "Biological & biotechnological control of insect pests". J.E. Rechcigl et N.A. Rechcigl (éds). Lewis Publisher. Boca Raton, Fla. pp. 281-302
- Shelton, A.M., Zhao, J.Z. et Roush, R.T., 2002.** Economic ecological, food safety, and social consequences of the deployment of BT transgenic plants. *Annu. Rev. Entomol.*, **47**: 845-881.
- Sherwood, L.M., Willey, J.M. et Woolverton, C.J., 2010.** Microbiologie. De Boeck Supérieur, 1216p.
- Shoresh, M., Harman, G. et Mastouri, F., 2010.** Induced systemic resistance and plant responses to fungal biocontrol agents. *Annual Review of Phytopathology.* **48**: 21-43.
- Silverio, F., de Alvarenga, E., Moreno, S. et Picanco, M., 2009.** Synthesis and insecticidal activity of new pyrethroids. *Pest Manage. Sci.*, **65**: 900-905.
- Singh, H., 2006.** Mycoremediation: Fungal Bioremediation, John Wiley & Sons, 592p.
- Singleton, V.L., Orthofer, R. et Lamuela-Raventós, R.M., 1999.** Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Methods in Enzymology.* Orlando Academic Press., pp. 152-178.
- Solfo, R.R., 1973.** Etude d'une Plante Médicinale Malgache *Buxus madagascariensis* Bail et ses variétés. Ed : O.R.S.T.O.M.
- Sousa, R., Rufino, M., Gaspar, M., Antunes, C. et Guilhermino, L., 2008.** Abiotic impacts on spatial and temporal distribution of *Corbicula fluminea* (Muller 1774) in the River Minho Estuary, Portugal. Aquatic Conservation. *Marine and Freshwater Ecosystems.*, **18**: 98-110.

- Srivastava, M. et Raizada, R., 2007.** Lack of toxic effect of technical azadirachtin during postnatal development of rats. *Food Chem. Toxicol.*, **45**(3): 465-471.
- Stern, J.L., Hagerman, A.E., Steinberg, P.D. et Mason, P.K., 1996.** Phlorotanninprotein interactions. *J. Chem. Ecol.*, **22**: 1887-1899.
- Stevens, M.M., Burdett, A.S., Mudford, E.M., Helliwell, S. et Doran, G., 2011.** The acute toxicity of fipronil to two non-target invertebrates associated with mosquito breeding sites in Australia. *Acta Trop.*, **117**(2):125-130.
- Sutradhar, R., Barbera, L., Seow, H., Howell, D. et Husain, A., 2017.** *Dudgeon DMultistate analysis of interval-censored longitudinal data: application to a Cohort Study on Performance Status Among Patients Diagnosed With Cancer.* *Am J Epidemiol.*, **173**(4): 468-475.
- Tabuc, C., 2007.** Flore fongique de différents substrats et conditions optimales de production des mycotoxines. Thèse de l'Institut National de Polytechnique de Toulouse et de l'Université de Bucarest. 190p.
- Taguri, T., Tanaka, T. et Kouno, I., 2006.** Antibacterial spectrum of plant polyphenols and extracts depending upon hydroxyphenyl structure. *Biol Pharm Bull.*, **29**: 2226-2235.
- Tene, M., Ndontsa, B.L. et Tane, P., 2009.** Antimicrobial diterpenoids and triterpenoids from the stem bark of *Croton macrostachys*. *Int J Biol Chem Sci.*, **3**: 538-44.
- Thakore, Y., 2006.** The biopesticide market for global agriculture use. *Ind. Biotechnol.*, **2**: 194-208.
- Tian, F., Li, B., Ji, B., Zhang, G. et Luo, Y., 2009.** Identification and structure–activity relationship of gallotannins separated from *Galla chinensis*. *LWT–Food Science and Technology.*, **42**: 1289-1295.
- Tombolini, R., Van Der Gaag, D., Cerhardson, B. et Janssoni, J., 1999.** Colonization pattern of the biocontrol strain *Pseudomonas chlororaphis* MA 342 on barley seeds visualized by using green fluorescent protein. *Appl. Environ. Microbiol.*, **65**(8): 3674-3680.
- Tripoli, E., Guardia M., L., Giammanco, S., Di Majo, D. et Giammanco, M., 2007.** Review Citrus flavonoids: Molecular structure, biological activity and nutritional properties: *Food Chemistry.*, **104**: 466-479.
- Tsuzuki, W., Yunoki, R. et Yoshimura, H., 2007.** Intestinal epithelial cells absorb γ -tocotrienol faster than α -tocopherol. *Lipids.*, **42**:163-170.
- Turner, W.R., Brandon, K., Brooks, T.M., Costanza, R., da Fonseca, G.A.B. et Portela, R., 2007.** Global conservation of biodiversity and ecosystem services. *BioScience.*, **57**: 868-873.

- Vafeiadou, K., Vauzour, D., Lee, H.Y., Rodriguez-Mateos, A., Williams, R. J. et Spencer, J. P.E., 2009.** The citrus flavanone naringenin inhibits inflammatory signalling in glial cells 3 and protects against neuroinflammatory injury Archives of Biochemistry and Biophysics. *J Food Sci.*, **484**(1):100-9.
- Vanishree, M., Thatheyus, A.J. et Ramya, D., 2014.** Biodegradation of Petrol Using the Fungus *Penicillium* sp. *Science International.*, **2**(1): 26-31.
- Wang, C.J., Yang, W., Wanaq, C., Gu, C., Ninu, D.D., Liu, H.X., Wang, Y.P. et Guo, J.H., 2012.** Induction of drought tolerance in cucumber plants by a consortium of three plant growth-promoting rhizobacterium strains. *PLoS One.*, **7**(12).
- Washburn, J., Trudeau, D., Wong, J. et Volkman, L., 2003.** Early pathogenesis of *Autographa californica* multiple nucleopolyhedrovirus and *Helicoverpa zea* single nucleopolyhedrovirus in *Heliothis virescens*: a comparison of the 'M' and 'S' strategies for establishing fatal infection. *J. Gen. Virol.*, **84**: 343-351.
- Watanabe, T., 2002.** Pictorial Atlas of Soil and Seed Fungi: Morphologies of Cultured Fungi and Key to Species. 2nd ed. CRC Press, Boca Raton, Florida, USA, 504p.
- Wichtl, M. et Anton, R., 2003.** Plantes thérapeutiques : Traditions, Pratique officinale, Sciences et Thérapeutique. 2e Ed : TEC & DOC. Paris. pp. 1-364.
- Wichtl, M., Anton, R., 2009.** Plantes thérapeutiques tradition, pratique officinale, science et thérapeutique. Édition LAVOISIR, Paris. pp. 38-41.
- Windley, M.J., Herzig, V., Dziemborowicz, S.A., Hardy, M.C., King, G.F. et Nicholson, G.M., 2012.** Spider-venom peptides as bioinsecticides. *Toxins.*, **4**(3): 191-227.
- Worrall, F. et Kolpin, D.W., 2004.** Aquifer vulnerability to pesticide pollution - combining soil, land-use and aquifer properties with molecular descriptors. *Journal of Hydrology.*, **293**: 191-204.
- Zhang, W.J. et Björn, L.O., 2009.** The effect of ultraviolet radiation on the accumulation of medicinal compounds in plants. *Elsevier B. V.*, **80**: 207-218.
- Zhang, Z., Huang, J., Yu, G. et Hong, H., 2004.** Occurrence of PAHs, PCBs and organochlorine pesticides in the Tonghui River of Beijing, China. *Environmental Pollution.*, **130**: 785-791.

Site web

<http://agriculture.gouv.fr/ecophyto>

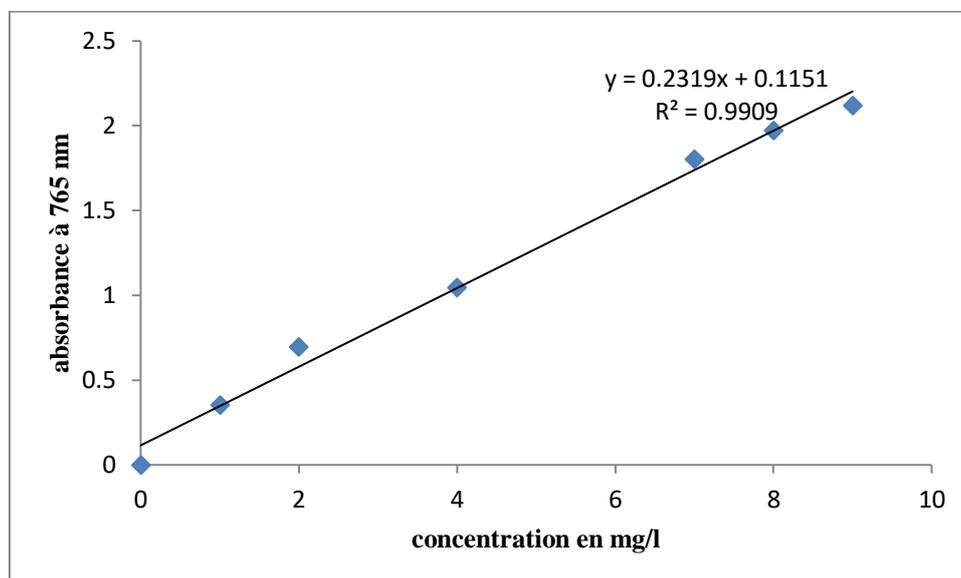
<https://www.anbg.gov.au/cpbr/cdkeys/euclid3/euclidsample/html/learn.htm>

www.prophyta.de/fr/protection-des-plantes/anti-nematicide/mode-operatoire/

www.biomemerieux.com

ANNEXES

ANNEXES

Annexes 1. Courbe d'étalonnage de l'acide gallique**Annexe 2.** Composition du milieu de culture potato dextrose agar (PDA)

- 700mL d'eau distillée
- 300mL d'eau de cuisson de pomme de terre (coupez 300g pommes de terre en morceaux moyens et faites les cuire dans 2-3L d'eau pendant 1 heure, filtrez l'eau de cuisson avant utilisation)
- 20g d'agar-agar
- 10g de dextrose
- pH: 7,4 pour les bactéries et pH: 5,5 pour les champignons

Annexes 3. Composition du milieu de culture extrait de malt (MEA)

- 1L d'eau distillée
- 30g d'extrait de malt
- 15g d'agar-agar
- pH à 5,5

Annexes 4. Composition du milieu de culture extrait de levure agar (YEA)

- 1L d'eau distillée
- 20g d'extrait de Malt
- 30g de saccharose
- 15g d'agar-agar
- pH à 7,4

Annexe 5. Composition du milieu de culture Czapek

- 3g de NaNO_3
- 1g de KH_2PO_4
- 0,5g de $\text{MgSO}_4, 7\text{H}_2\text{O}$
- 0,5g de KCl
- 0,01g de FeSO_4
- 30g de Saccharose
- 1L d'eau distillée
- pH: 6,8

Annexes 6. Composition du milieu de culture Galzy et Slonimsky (GS)

- 100ml de solution de sels minéraux
- 1ml de solution d'oligo éléments
- 1ml de solution de $\text{FeCl}_3, 6\text{H}_2\text{O}$ à 200mg/l
- 5ml de solution de vitamines
- 5g Glucose
- 1L Eau distillée
- pH: 4,1

- **Solution de sels minéraux**

60g de $(\text{NH}_4)\text{H}_2\text{PO}_4$

20g de $(\text{NH}_4)\text{H}_2\text{SO}_4$

10g de K_2HPO_4

1g de NaCl

1g de CaCl_2

5g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$

1L d'eau distillée

- **Solution d'oligo éléments**

0,5g de H_3BO_3

0,4g de MnSO_4

0,4g de ZnSO_4

0,2g de Na_2MoO_4

0,1g de KI

0,04g de CuSO_4

1L d'eau distillée

- **Solution de vitamines**

0,4g de Pantothénate de calcium

0,4g de Thiamine chlorhydrate

0,4g de Inositol

0,4g de Pyridoxine

0,1g d'Acide nicotinique

0,004g Biotine

1L d'eau distillée

Annexe 7. Production scientifique

❖ Communication internationales

Meksem N, Bordjiba O, Meraghni M, Meksem Amara L, & Djebbar M R. «Evaluation de l'effet biopesticide de l'extrait phénolique *d'Eucalyptus camaldulensis* sur quelques souches bactériennes agricoles». First International Congress of Biotoxicology and Bioactivity. 26-27 Novembre 2014. Oran, Algérie.

Meksem N, Bordjiba O, Ferfar M, Bensaid M, Meksem Amara L, Djebbar MR. «Etude du pouvoir antimicrobien de l'extrait brut de l'Eucalyptus camaldulensis issu du Nord-Est Algerien». 7ème Journées Scientifiques Internationales sur la valorisation des Bioressources. 29-30 Avril et 01 Mai 2016. Sousse, Tunisie.

❖ Publication internationale

MEKSEM Nabila, BORDJIBA Ouahiba, GRARA Nejoud, FERFAR Meriem, BENSAID Marwa, MEKSEM AMARA Leila, DJEBAR Mohamed Reda. «Study of the Antimicrobial Activity of the Extracts of the Eucalyptus camaldulensis and Eucalyptus globulus Stemming from the Algerian Northeast». International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research. Vol 39(2):1-5. 2016.

Research Article



Study of the Antimicrobial Activity of the Extracts of the *Eucalyptus camaldulensis* and *Eucalyptus globulus* Stemming from the Algerian Northeast

¹Meksem Nabila, ²Bordjiba Ouahiba, ^{1,3}Grara Nedjoud*, ¹Ferfar Meriem, ¹Bensaid Marwa, ¹Meksem Amara Leila, ¹Djebar Mohamed Reda

¹Laboratory of cellular Toxicology, Department of Biology, Faculty of Science, Badji Mokhtar University, B.P 12, Annaba, Algeria.

²Plant Biology Laboratory and Environment, Faculty of Science, Badji Mokhtar University, B.P.12, Annaba, Algeria.

³Department of Biology, SNV-STU Faculty, University 8 Mai 1945, Guelma, Algeria.

*Corresponding author's E-mail: grara120@yahoo.fr

Accepted on: 20-01-2016; Finalized on: 31-07-2016.

ABSTRACT

The misuse of Organic synthesis plant products, leads to the adverse repercussions on the environment and promote the proliferation of microbial agent resistant to the active ingredients of pesticides used. In response to this scourge and health problems related to the persistence and bioaccumulation of pesticides, a new alternative or complementary protection strategies for the sustainable development of agriculture, such as biopesticides of plant origin that attempt to emerge. The ambition of our work, frame a valorisation of vegetable substances namely *Eucalyptus camaldulensis* and *Eucalyptus globulus* in the northeastern Algerian region. This is to highlight the presence of the different secondary metabolites, extract by solvents (methanol/water) and analyze the content of total phenols from the leaves by the visible UV spectrophotometry method. A determination of the pesticide antibacterial secondary metabolites from the hydro-methanolic extract of *Eucalyptus camaldulensis* and *Eucalyptus globulus* was performed on phyto-pathogenic bacterial strains isolated from agricultural soil. The results obtained indicate that the *Eucalyptus camaldulensis* and *Eucalyptus globulus* contain high concentrations of total phenols (respectively 79, 35 and 105,31 mg GAE/gDM). These polyphenols possess a strong pesticide power or antibacterial power important facing the different bacterial strains tested. The values of inhibition zones are pretty similar if not more important than those obtained in the presence of Vidan fungicide.

Keywords: *Eucalyptus camaldulensis*, *Eucalyptus globulus*, bio-pesticide, polyphenols.

INTRODUCTION

The use of pesticides has experienced very strong growth over the past decades.

It allowed a huge progress in the matter of food resources and the improvement of public health. So pesticides have become almost indispensable to most agricultural practices. However, they are likely to be a hazard to the environment, ecosystems and man.

A socket to the seriousness of the problems of the environment prompted agencies and research institutions to develop much more biological methods, in its various forms, in order to limit the use of chemical pesticides.

One of its forms is the exploitation of secondary compounds from plants in the fight against insects, fungi, and harmful bacteria¹⁻².

The farming community and consumers of agricultural products final, often see pesticides from natural sources, as posing less risk. However, the production of biological, natural and bio-pesticides pesticides remains marginal; it represents less than 1% of the total production of pesticides.

This interest for bio-pesticides, has led us to be interested in two plant species widespread in Algeria, known for their medicinal interest and introduced in 1860³⁻⁴.

It comes from '*Eucalyptus camaldulensis*' and '*Eucalyptus globulus*'.

MATERIALS AND METHODS

Experimental Equipment

The leaves of *Eucalyptus camaldulensis* and *Eucalyptus globulus* has been harvested at the level of the forest of Bouguentass Annaba (North - East Algerian), in a period between April and the month of September⁵.

They have been dried in the open air and away from light and moisture. The bacterial strains, it was isolated from agricultural soil and from leaves of wheat, their identification is made from the Gram stain.

During this work, a fungicide is used to compare activity biopesticides of the crude ethanol extract of *E.camaldulensis* and *E.globulus*. This fungicide is part of the family of Triazole, its active ingredient is Triadimenol, the latter inhibits the synthesis of sterols.

Phyto-chemical Screening

The chemical screening is a technique used to determine the chemical groups contained in a plant body by physico-chemical reactions.

Preliminary tests to determine the major chemical groups have been performed according Solfo⁶ and Harborne⁷.

Preparation of Methanol Crude Extract

100g powder *Eucalyptus globulus* and *Eucalyptus camaldulensis* are setting steeped in 1l of water methanol mixture (7/3 v / v) for 24 hours at room temperature and with magnetic stirring; filter and the solvent is evaporated



to dryness under reduced pressure at 50° C using a rotary evaporator.

Determination of Total Polyphenols

The total polyphenol content of the extracts was determined by the Folin Ciocalteu method⁸. A quantity of 200 ml of the extract was mixed with 1ml of freshly prepared reagent Folin-Ciocalteu reagent (10 times diluted) and 0.8 ml of sodium carbonate 7.5% (Na₂CO₃). The whole is incubated at room temperature for 30 minutes and the reading is taken against a blank using a spectrophotometer at 765nm. The results are expressed in milligrams gallic acid equivalent per g dry plant material.

Antibacterial Activity

We used the diffusion technique on solid media. This is a method similar to that of the susceptibility of determining the sensitivity of a bacterial strain vis-a-vis one or more products. A sterile disc of filter paper (Whatman No. 1) of 6mm in diameter is soaked in the test products (pure methanol crude extract, crude extract ½, ¼ crude extract), the latter is then placed on the casting agar in boxes Petri standard 4mm thick and previously inoculated with the identified bacterial strains. The inoculum concentration used is on the order of 10⁶ to 10⁸ CFU/ml. The dishes are incubated at a temperature of 37° C for 18 to 24 hours.

If the product is toxic for the species, forms a zone of inhibition or clear halo around the disc. Greater is the area, more species is sensitive.

Statistical Analysis

The statistical analysis, carried out for the different results of the biopesticide effect is carried out using the MINITAB software Version 13.31 Fr.

The values obtained after 48 hours of incubation were compared pairwise using testing "t" of Student⁹.

RESULTS

Phyto-chemical Screening of *Eucalyptus camaldulensis* and *Eucalyptus globulus*

Table 1: The results of the chemical screening

Secondary Metabolites	<i>Eucalyptus camaldulensis</i>	<i>Eucalyptus globulus</i>
Saponosides	+	+
Anthocyanins	+	+
Leuco-anthocyanins	-	-
Alkaloids	-	-
Flavonoids	+	+
Tannins	+	+

+ positive result; - negative result

Determination of Total Phenols

The determination of the content in total phenolics in the hydro-methanolic of *Eucalyptus camaldulensis* and *Eucalyptus globulus* extract is made by using the colorimetric method of Folin-Ciocalteu, this content has been reported in Gallic acid equivalent mg/g of dry plant material. The results show that alcoholic extracts of two *Eucalyptus* species have a high content of total phenols (79, 35 and 105, 31 mg GAE/gDM) (Table 2).

Table 2: Total Phenolics

Hydro-methanolic extract	Yield	Total Phenolics
<i>Eucalyptus camaldulensis</i>	22%	79,35 mg GAE/gDM
<i>Eucalyptus globulus</i>	18%	105,31 mg GAE/gDM

Antibacterial Activity

Effect of extracts from *Eucalyptus camaldulensis* and *Eucalyptus globulus* on strain B1

The figure 1 represents the effect of various substances tested on the B1 strain. In a comprehensive manner, the hydro-methanolic extracts appear to be effective against bacterial strain B1. The zones of inhibitions are between 6.33 mm and 10 mm for extract of *Eucalyptus camaldulensis* and 4.5 mm and 6.33 mm for *Eucalyptus globulus* extract.

According to the Student's t test, it appears from the significant differences ($P \leq 0.05$) between the activity of the pesticide and the mother of the extract thus solution than the 1/2 of *Eucalyptus camaldulensis* dilution and dilution to 1/4 of *Eucalyptus globulus*. Any time the antibacterial power of extracts of *Eucalyptus camaldulensis* is higher than that of extracts of *Eucalyptus globulus* and the pesticide.

Statistical analysis showed no significant differences ($P > 0.05$) between the activity of the pesticide and the stock solution of the hydroalcoholic extract and dilution to 1/2 of *Eucalyptus globulus*, as well as the dilution to 1/4 of the hydroalcoholic extract of *Eucalyptus camaldulensis*, remains more active that the extract of *Eucalyptus globulus*.

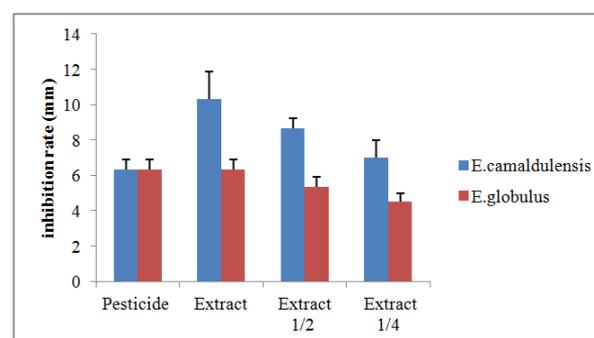


Figure 1: Activity of different substance tested on the B1 strain

Effect of extracts from *Eucalyptus camaldulensis* and *Eucalyptus globulus* on strain B2

The Figure 2 represents the effect of various substances tested strain B2, the latter seems also be inhibited by all of the tested substances (pesticides, hydroalcoholic extract SM, hydroalcoholic extract 1/2, hydroalcoholic extract 1/4), with different halos whose diameter varies between 5.66 10.83 for *Eucalyptus camaldulensis* and 4.66 mm and 7 mm for *Eucalyptus globulus*.

According to meaning P (Student's t Test), it appears from non significant differences ($P \geq 0.05$) between the activity of the pesticide and the extract diluted in 1/2 and 1/4 of *Eucalyptus camaldulensis*, the mother of *Eucalyptus globulus* extract thus solution than dilutions at 1/2 and 1/4.

However, highly significant differences were found ($P \leq 0.01$) between the pesticide and the stock solution of the extract of *Eucalyptus camaldulensis*.

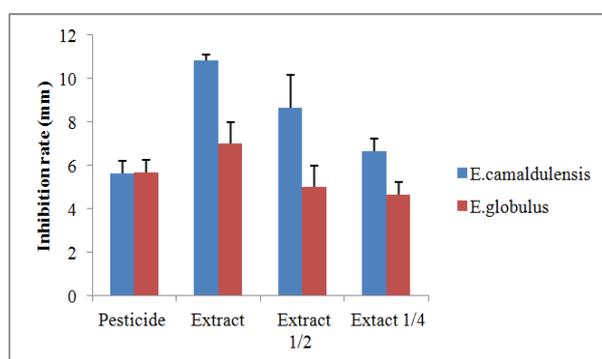


Figure 2: Activity of different substance tested strain B2

Effect of extracts from *Eucalyptus camaldulensis* and *Eucalyptus globulus* on strain B3

Natural extracts are a disruption of the development of the bacterial strain B3 (figure3).

According to statistical analysis, there appears to be no significant differences ($P \geq 0.05$) between the effect of the fungicide and that of natural extracts they appear to be more effective.

However, we noted significant differences ($P \leq 0.05$) between the effect of the pesticide and the effect of the hydro-methanolic extract diluted to 1/2.

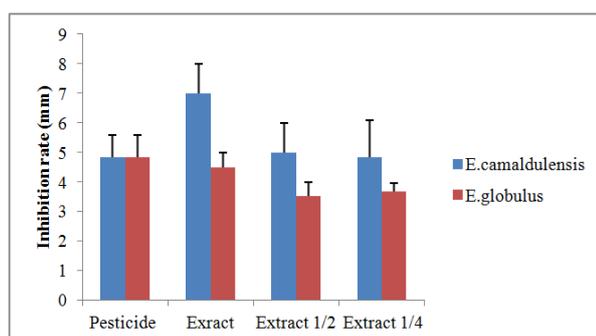


Figure 3: Activity of different substance tested on the B3 strain

Effect of extracts from *Eucalyptus camaldulensis* and *Eucalyptus globulus* on strain B4

The 3 bacterial strain seems to be inhibited by experienced solutions namely pesticides, extract SM, 1/2 and 1/4, with zones of inhibition between 7.16 and 18 mm for *Eucalyptus camaldulensis* and 7.16 and 12 mm for *Eucalyptus globulus*. (figure4)

Non significant differences ($P \geq 0.05$) were observed between the activity of the pesticide and the 1/2 of *Eucalyptus camaldulensis* extract as well as 1/2 and 1/4 of *Eucalyptus globulus* extracts.

Also, we perceive significant differences between the pesticide and the extract of *Eucalyptus camaldulensis* diluted 1/2.

Nevertheless, we find highly significant differences ($P \leq 0.01$) between the activity of the stock solution of the extract of *Eucalyptus globulus* and the pesticide.

However, very highly significant differences ($P < 0.001$) were noted between the pesticide and the crude extract of *Eucalyptus camaldulensis*.

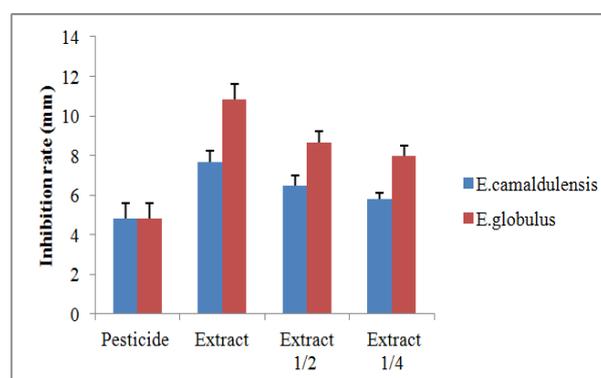


Figure 4: Activity of different substance tested on strain B4

It is worth noting that the different extracts of *Eucalyptus camaldulensis*, are much more efficient than the pesticides and the extracts of *Eucalyptus globulus* on strains B1, B2, B3, B4 and they remain less active than this pesticide.

Effect of extracts from *Eucalyptus camaldulensis* and *Eucalyptus globulus* on strain B5

The natural substances tested appear to have an inhibitory effect on strain B5 in a comprehensive manner with halos between 4.83 and 7.66 mm for *Eucalyptus camaldulensis* and 4.83 and 10.83 mm for *Eucalyptus globulus* (Figure 5).

The statistical study shows (test student's T-distribution) shows the differences very highly significant ($P < 0.01$) between the mother solution of extract from *Eucalyptus globulus* and the pesticide.

The T-test reveals highly significant differences ($P \leq 0.1$) between the pesticide and the effect of the *Eucalyptus globulus* extract diluted to 1:2 and 1:4.

Significant differences ($P \leq 0.05$) were found between the extract concentrated of *Eucalyptus camaldulensis* and pesticide.

Nevertheless, we observe no significant differences ($P \geq 0.05$) between the inhibitory effect of extracts of *Eucalyptus camaldulensis* diluted to 1/2 and 1/4 and the effect of the pesticide.

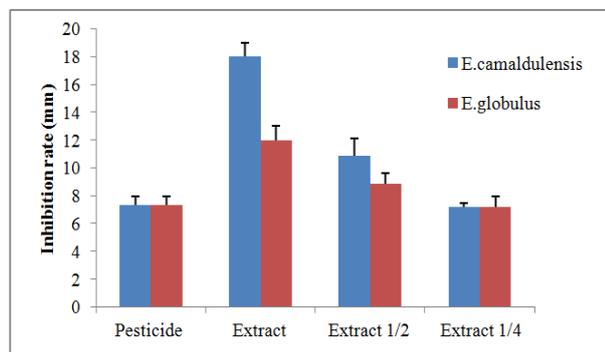


Figure 5: Activity of different substance tested on strain B5

DISCUSSION

Chemical screening has highlighted the presence of some secondary metabolites including anthocyanins, flavonoids and tannins saponins. Other researchers¹⁰⁻¹⁴ have reported the presence of these metabolites in the Myrtaceae; family which *Eucalyptus camaldulensis* and *globulus* belong.

Overall, the testing of the bio-pesticide effect of extracts of *Eucalyptus camaldulensis* show that they have an inhibition activity on the bacterial growth that varies depending on the strain. These inhibitions are greater than those observed with the pesticide.

However the extracts of *Eucalyptus globulus* are less effective on the strains tested except for the bacterial strain B4, where there is a significant inhibition of growth of the latter.

The results obtained confirm the efficiency of natural substances extracted from plants against the development of different microbial agents.

These results seem to be agreed as reported by many authors. A study by Saikhanillate¹⁵ confirms that the essential oils derived from *Citrus medica* have bacteriostatic and bactericidal activities against many bacteria.

Furthermore, investigations carried out by many authors¹⁶⁻¹⁸ affirm that the essential oil of *Eucalyptus camaldulensis* and *Eucalyptus globulus*, has antibacterial power against some bacteria. Many works highlight this antibacterial power, in effect Damjanović-Vratnica¹⁹ and Bachir Raho & Benali²⁰ indicate that *Eucalyptus globulus* essential oil has antibacterial power that varies from one strain to another and one concentration to another.

Other works carried out by Ayepola & Jacks¹¹; Babayi²¹ and Enciso-diaz²² attests that the hydro-methanolic extract of *Eucalyptus camaldulensis* and *Eucalyptus globulus* has an inhibitory effect against several bacterial strains.

CONCLUSION

In this work, we have tried to contribute to the recovery of the species plant *Eucalyptus camaldulensis* and *Eucalyptus globulus*. Through the study of the antibacterial effect of extracts hydro-methanolic of these two species with a few strains isolated from agricultural soil, it appears that these substances have strong inhibitory power on tested germs, this inhibition varies depending on the bacterial species and the concentration of the product tested.

Generally, compounds isolated from *Eucalyptus camaldulensis* appear to be effective at all concentrations used, registered inhibitions zones are larger than those caused by the pesticide. Extracts of *Eucalyptus globulus* seem to be less effective than *E. camaldulensis*. However, the diameters of recorded halos are often close than those of the pesticide except for bacterial strain B4 where zones of inhibitions of all concentrations are higher than those recorded by the extracts of *Eucalyptus camaldulensis* and pesticide;

This antibacterial power is due to the richness of extract of *Eucalyptus camaldulensis* and *globulus* in inhibitory substances; it's probably the phenols, which are endowed with strong bactericidal activity.

These results indicate that extracts of *Eucalyptus camaldulensis* and *Eucalyptus globulus* are promising for their power bio-pesticide, phenolic extract raises some phyto-pesticide effect against microbial strains that they may present an interesting alternative to the use of plant protection products.

However, in our opinion, it would be interesting to test other concentrations on a wider panel of fungal and bacterial strains currently become multi-resistant.

Langue source

Face à ce fléau et aux problèmes de santé liés à la rémanence et la bioaccumulation des pesticides, de nouvelles stratégies de protection alternatives ou complémentaires pour le développement durable de l'agriculture, tel que les bio-pesticides d'origine végétale qui tentent d'émerger.

REFERENCES

- Ozanda P. Flora and vegetation of the Sahara, 3rd enlarged edition, Ed CNRS, Paris, 1991, 662 p.
- MacKay K, Brac De La Perrière R A, Ham V. Saharan traditional Pharmacopoeia: North Western Sahara, Acts of the 2nd Symposium of European Ethnopharmacologie and the 11th International Conference of Ethnomedicine, Heidelberg, 1993, 169-171.

3. Poupon H. Description of household air and underground of *Eucalyptus camaldulensis* Dehn. Introduced in Northern Tunisia, Co H, ORSTOM, 17, 1972, 47-59.
4. Mathew H. *Eucalyptus* in Algeria: A tree controversial, Rev, The Algerian forest, n, 1, 1996, 5-10.
5. Pellecuer J. Know find, identify, use medicinal plants of the Mediterranean regions, Edition S.A.E.P, Colmar, France, 2000, 96 p.
6. Solfo R R. Study of a plant medicinal Malagasy *Buxus madagascariensis* lease and Sesvarietes. Ed: O.R.S.T.O.M, Paris, 1973, 98 p.
7. Harborne J B. General procedures and measurement of total phenolics. Methods in plant biochemistry, Volume 1, Plant Phenolics, Academic Press, London, 1989, 1-28.
8. Singleton V L, Rossi JA. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. American Journal of Technology and Viticulture, 16, 1965, 144-153.
9. Dagnelie P. Statistiques théoriques et appliquées. Tome 2 : références statistiques à une et à deux dimensions. Bruxelles. Univ De boeck et Larcier, 1999, 659 p.
10. Ahmad I, Mehomood Z, Mohammed F. Screening of some Indian medicinal plants for their antimicrobial properties, Journal of Ethnopharmacology, 62(2), 1998, 183-193.
11. Ayepola O O, Abdulkareem BA. The Antibacterial Activity of Leaf Extracts of *Eucalyptus camaldulensis* (Myrtaceae), Journal of Applied Sciences Research, 4(11), 2008, 1410-1413.
12. Jaradat M, Khazaei N. The Antimicrobial Activities of Methanolic Extracts of *Eucalyptus camaldulensis* Against *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. Journal of Research in Agricultural Science, 6, 2010, 63-67.
13. Pamplona-Roger G D. Encyclopedia of Medicinal Plants. Vol. 1 and 2, 2nd ed. Education and Health Library, The European Union, U.K, 1999, 128-150.
14. Shariff Z U. Modern Herbal Therapy for Common Ailments. Nature Pharmacy Series, Spectrum Books Limited, Ibadan, Nigeria in Association with Safari Books (Export) Limited, United Kingdom, 1, 2001, 9-84.
15. Saikhanllate V., Panicker Beng, Etoa F X, Modjo S L, Blue P, Assob J V, Bailey D B. Antimicrobial activities of total extract and fractions of juice of fruit of citrus medica lin. (rutaceae). Pharm. Méd. Trad. Afr, 3, 2004, 91-101.
16. Bashir R G, Benali M. Antibacterial activity of leaf essential oils of *Eucalyptus globulus* and *Eucalyptus camaldulensis*. African Journal of Pharmacy and Pharmacology, 2(10), 2008, 211-215.
17. Akin M, Aktumsek A, Nostro A. Antibacterial activity and composition of the essential oils of *Eucalyptus camaldulensis* Dehn. And *Myrtus communis* L. growing in Northern Cyprus. African Journal of Biotechnology, 9(4), 2010, 531-535.
18. Farah A, Satrani B, Fechtal M, Robert A, Taha M. Composition essential data extracted from the leaves of *Eucalyptus camaldulensis* and imique and antibacterial and antifungal oils natural hybrid sound activities (clone 583). Acta Bot. Gallica, 148(3), 2001, 183-190.
19. Damjanović-Vratnica B, Đakov T, Šuković D, Damjanović J. Antimicrobial Effect of Essential Oil Isolated from *Eucalyptus globulus* Labill. from Montenegro. Czech J. Food Sci, 29(3), 2011, 277-284.
20. Bashir R G, Benali M. Antibacterial activity of the essential oils from the leaves of *Eucalyptus globulus* against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. Asian Pac J too Biomed, 2(9), 2012, 739-742.
21. Babayi H, Koloj, Okogun J I, Ijah mathematician. The antimicrobial activities of methanolic extracts of *Eucalyptus camaldulensis* and *Terminalia catappa* against some pathogenic microorganisms. Biokemistri, 16(2), 2004, 106-11.
22. Enciso-diaz O J, Méndez-Gutiérrez A, Jesus L H, Sharma A, Villarreal M L, Taketa A C. Harmacology & Pharmacy, 3, 2012, 433-438.

Source of Support: Nil, Conflict of Interest: None.

