



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

جامعة باجي مختار عنابة

UNIVERSITE BADJI MOUKHTAR ANNABA

FACULTE DES SCIENCES
DEPARTEMENT DE BIOLOGIE

THESE PRESENTEE EN VUE DE L'OBTENTION DU DIPLOME DE DOCTORAT

Spécialité : Biologie Végétale et Environnement

Intitulé

Etude de l'effet biopesticide de quelques extraits naturels d'une plante appartenant à la famille des Lamiacées

Par : M^{elle} MERAGHNI Messaouda

Membres de Jury :

Pr. BEDDIAR Arifa	Président	Université de Annaba
Pr. BORDJIBA Ouahiba	Directeur de thèse	Université de Annaba
Pr. GRARA Nedjoud	Examineur	Université de Guelma
Pr. GHEID Abdelhak	Examineur	Université de Souk Ahras

Année universitaire: 2018 - 2019

Table des matières

Remerciement	
Dédicace	
Résumé	
Abstract	
المخلص	
Liste des figures	
Liste des tableaux	
Liste des abréviations	
Introduction générale	1
Chapitre I : Etude phytochimique de <i>Rosmarinus eriocalyx</i> Jord & Fourr	
Introduction.....	7
1. Matériel et Méthodes.....	9
1. 1. Présentation de l'espèce végétale étudiée	9
1.1.1. Site d'échantillonnage	10
1.1.2. Réalisation des prélèvements	11
1.2. Préparation des extraits bruts foliaires	12
1. 2.1. Préparation de l'extrait méthanolique.....	12
1.2.2. Préparation de l'extrait aqueux.....	12
1.2.3. Préparation l'extrait méthanolique par ultrasons (EMS).....	13
□ Protocole expérimental de l'extraction par ultra-sons.....	14
1.2.4. Rendement des extraits secs de <i>Rosmarinus eriocalyx</i>	15
1.3. Mise en évidence des composés du métabolisme secondaire	15
1.4. Identification préliminaire par Chromatographie sur couche mince (CCM) des produits du métabolisme secondaire mis en évidence	16
1.4.1. Mode opératoire.....	16
1.5. Dosage des composés phénoliques	17
1.5.1. Dosage des polyphénols totaux.....	17
1.5.2. Dosage des flavonoïdes totaux	18
1.5.3. Dosage des tannins totaux	19
1.6. Identification par UHPLC-DAD-ESI / MS (Ultra-High-Performance Liquid Chromatography Electro spray Ionization Mass Spectrometry with Diode Array Detection) des extraits de <i>Rosmarinus eriocalyx</i>	19
2. Résultats et discussion.....	21
2.1 Rendements des trois extraits, aqueux (EA), méthanolique (EM) et méthanolique soumis aux ultrasons (EMS).	21
2.2. Mise en évidence des composés du métabolisme secondaire	21

2.3. Identification préliminaire par Chromatographie sur couche mince (CCM) des produits du métabolisme secondaire mis en évidence	22
2.4. Estimation quantitative des extraits de <i>Rosmarinus eriocalyx</i>	25
2.4.1. Dosage des polyphénols totaux.....	25
2.4.2. Le dosage des flavonoïdes totaux	25
2.4.3. Le dosage des tanins totaux	25
2.5. Identification des composés de l'extrait de <i>Rosmarinus eriocalyx</i> par UHPLC-DAD-ESI / MS	26
Conclusion	37

Chapitre II : Etude de l'activité antimicrobienne

Introduction.....	40
1. Matériel et méthodes	43
1.1 Pesticides naturels (extraits végétaux)	43
1.2. Pesticides conventionnels	43
1.3. Isolement des souches fongiques et bactériennes	43
1.3.1. A partir du sol.....	44
1.3.2. Isolement des souches fongiques et bactériennes à partir des cultures infectées	45
1.3.2.1. Isolement par lavage	45
1.3.2.2. Isolement par broyage	46
1.3.3. Ensemencement.....	46
1.3.4. Comptage et expression des résultats.....	48
1.3.5. Purification et conservation des isolats	48
1.3.6. Identification des isolats fongiques.....	48
1.3.6.1. Examen macroscopique	48
1.3.6.2. Examen microscopique.....	49
1.3.7. Identification des isolats bactériens	49
1.3.7.1. Observation macroscopique.....	49
1.3.7.2. Observation microscopique	50
1.3.7.3. Coloration de Gram	50
1.3.7.4. Test de l'oxydase	50
1.3.7.5. Test de la catalase	50
1.3.7.6. Identifications à l'aide de galeries API 20 E	51
1.3.7.7. Identifications à l'aide de galeries API 20 NE.....	52
1.3.7.8. Test de pathogénécité sur feuilles de tabac (<i>Nicotiana tabaccum</i>).....	54
1.4. Etude <i>in vitro</i> de l'activité antimicrobienne des extraits de <i>Rosmarinus eriocalyx</i>	54
1.4.1. Méthode de diffusion en milieu solide.....	54
1.4.2. Technique de l'incorporation de l'extrait dans le milieu de culture	55
1.4.3. Evaluation de l'effet fongistatique ou fongicide/ bactériostatique ou bactéricide par la détermination des CMI, CMF, CMB	56

1.4.4. Détermination des cinétiques de croissance des souches microbiennes en mode batch sur milieu discontinu non renouvelé.....	57
1.4.4.1. Mesure du pH.....	58
1.4.4.2. Détermination de la densité optique (D.O).....	59
1.4.4.3. Calcul du poids sec de l'inoculum.....	59
1.5. Etude <i>in vivo</i> de l'extrait méthanolique de <i>Rosmarinus eriocalyx</i> sur <i>Citrus sinensis</i> L. inoculé ex situ par les différentes souches microbiennes.....	59
1.5.1. Biotest sur les fruits de <i>Citrus sinensis</i> L.....	60
3. Résultats et Discussion.....	61
3. 1. Dénombrement de la microflore à partir des sols et des feuilles infectées.....	61
3.2. Identifications des souches microbiennes isolées.....	64
3.3. Détermination de l'hypersensibilité des <i>Pseudomonas</i>	67
3.4. Etude <i>in vitro</i> de l'activité des extraits de <i>Rosmarinus eriocalyx</i> sur les souches antifongiques et antibactériennes.....	67
3.4.1. La méthode de diffusion en milieu solide.....	67
Sur le genre <i>Aspergillus</i>	67
Sur le genre <i>Fusarium</i>	69
Sur le genre <i>Alternaria</i>	70
Sur les autres genres.....	71
Sur le genre <i>Pseudomonas</i>	72
3.4.2. Activité antimicrobienne par la méthode de l'incorporation de l'extrait dans le milieu de culture.....	73
Sur le genre <i>Aspergillus</i>	73
Sur le genre <i>Fusarium</i>	74
Sur le genre <i>Alternaria</i>	74
Sur les autres genres.....	75
Sur le genre <i>Pseudomonas</i>	76
3.4.3. Evaluation de l'effet fongistatique/fongicide et bactériostatique/bactéricide par la détermination des CMI, CMF, CMB.....	77
Sur le genre <i>Aspergillus</i>	78
Sur le genre <i>Fusarium</i>	79
Sur le genre <i>Alternaria</i>	80
Sur les autres genres.....	81
Sur le genre <i>Pseudomonas</i>	82
3.4.4. Détermination des cinétiques de croissance des souches microbiennes en mode batch sur milieu discontinu non renouvelé.....	83
Sur le genre <i>Aspergillus</i>	83
Sur le genre <i>Fusarium</i>	87
Sur le genre <i>Alternaria</i>	92

<i>Sur les autres genres</i>	96
Sur le genre <i>Pseudomonas</i>	101
3.5. Résultats de l'étude <i>in vivo</i> de l'extrait méthanolique de <i>Rosmarinus eriocalyx</i> sur <i>Citrus sinensis</i> L. inoculé ex situ par les différentes souches microbiennes	105
Sur le genre <i>Aspergillus</i>	105
Sur le genre <i>Fusarium</i>	106
Sur le genre <i>Alternaria</i>	107
Sur les autres genres	107
Sur le genre <i>Pseudomonas</i>	108
Conclusion	119

Chapitre III : Etude de l'effet herbicide

Introduction.....	120
1. Matériels et Méthodes	121
1.1. Fractions SPE de l'extrait méthanolique	121
1.2. Les Graines de Cresson alénois (<i>Lepidium sativum</i> L.)	121
1.3. Etude de l'effet herbicide de l'extrait méthanolique et de ses fractions SPE sur le cresson (<i>Lepidium sativum</i> L.)	122
2. Résultats et discussion.....	123
2.1. Evaluation du rendement des fractions SPE	123
2.2. Effet de l'EM et des fractions SPE sur la germination des graines de <i>Lepidium sativum</i> L.....	123
2.3. Effet de l'extrait méthanolique et des fractions SPE sur la longueur des racines de <i>Lepidium sativum</i> L.....	124
2.4. Effet de l'EM et les fractions SPE sur la croissance des plantules de <i>Lepidium sativum</i> L.	125
Conclusion	129

Chapitre IV : Etude de la toxicité des extraits sur les organismes animaux non cibles

Introduction.....	131
1. Matériel et Méthodes.....	133
1.1. Extrait méthanolique de <i>Rosmarinus eriocalyx</i>	133
1.2. Fongicide Hymexazole	133
1.3. Organismes non cibles.....	133
1.3.1. L'abeille <i>Apis mellifera intermissa</i>	133
1.3.2. <i>Lumbricus terrestris</i> L.	134
1.3.3. <i>Nesidiocoris tenuis</i>	135
1.4. Méthodes suivies	136
1.4.1. Toxicité de l'extrait méthanolique sur <i>Apis mellifera intermissa</i>	136
1.4.2. Toxicité de l'extrait méthanolique sur <i>Lumbricus terrestris</i> L.	137

1.4.3. Toxicité de l'extrait méthanolique sur <i>Nesidiocori tenuis</i>	137
2. Résultats et discussion.....	138
2.1. Toxicité sur <i>Apis mellifera intermissa</i>	138
2.2. Toxicité sur <i>Lumbricus terrestris</i> L.	139
2.3. Toxicité sur <i>Nesidiocoris tenuis</i>	140
Conclusion.....	145
Conclusion générale et perspectives	147
Référence bibliographique.....	152
Annexes	

Remerciements

Je tiens tout d'abord remercier Allah de m'avoir donné la force, la patience, le courage et la persévérance d'aller jusqu'au bout pour terminer ma thèse.

*Mes remerciements vont en premier lieu à ma directrice de thèse **Professeur BORDJIBA Ouahiba** qui a voulu diriger cette thèse avec beaucoup de compétence et de professionnalisme. J'ai eu le privilège de bénéficier de son enseignement, de son savoir et de sa grande expérience qui, alliés à ses qualités humaines resteront pour moi un modèle.*

*J'exprime ma gratitude au **Professeur BEDDIAR Arifa**, pour l'intérêt qu'elle a porté à mon travail et je la remercie également pour l'honneur qu'elle me fait pour présider le jury de cette thèse malgré ses nombreuses préoccupations.*

*Mes remerciements et mes respects vont également au **Professeur GRARA Nedjoud** ainsi qu'au **Professeur GHEID Abdelhak** d'avoir pris la peine de sacrifier de leur précieux temps pour évaluer le travail de ma thèse*

J'exprime ma reconnaissance et mes profonds respects à tous ceux qui m'ont aidé pour réaliser cette thèse :

Mon amie Nécibe Asma qui m'a porté son aide précieuse aux moments difficiles et son soutien moral durant toutes ses années.

Mon amie Benaliouche Fouzia et ses collègues, le personnel de l'institut national de protection des végétaux de m'avoir procuré le matériel végétal et animal.

Mes chers amis du laboratoire de Biologie Végétales et Environnement : Faten, Billel, Fahima, Asma, Wafa, om Anes (Imen), Hana, Amina, Meriem, Ahlem, Nadjjet, Marwa, Samia, Fatima Zohra, Imen, Rachid, Salah.

Les techniciennes et le personnel du département de Biologie : Wafa, Chahira, Wafa, Sihem, Ibtissem, Sabriana, Chahira, Dalila ainsi que les techniciennes du département de chimie.

A madame Hajira et Kahina, Hadjer, Nedjwa , Mme Salha et Molka.

Dédicaces

Cette thèse est dédiée

A la mémoire de ma maman,

Toutes les lettres ne sauraient trouver les mots qu'il faut pour exprimer ma gratitude et mon amour à toi maman pour tous les sacrifices que tu as fait pour nous. Tu es la personne la plus chère au monde qui a été mon soutien, ma source éternelle d'amour et de tendresse. J'aurais voulu que tu sois parmi nous pour voir la naissance de ce travail mais tu sais que tu es toujours dans mon cœur et dans mon esprit.

A la mémoire de mon frère Djamel

A ma famille

A mon père, mes frères, mes sœurs, mes nièces et mes neveux pour votre présence, votre soutien, votre affection et patience durant toutes ces années. Vous avez rendu possible la réalisation de cette thèse.

Résumé

Des extraits méthanolique, methanolique soumis à ultrasons et aqueux de *Rosmarinus eriocalyx* ont été investigués dans un premier temps, par une étude phytochimique et antimicrobienne afin de déterminer leur pouvoir biopesticide vis-à-vis de plusieurs espèces phytopathogènes responsables de la baisse de la production des cultures maraichères. Le criblage phytochimique a mis en évidence une multitude de métabolites secondaires confirmés par une chromatographie sur couche mince. L'analyse quantitative des groupes de métabolites secondaires les plus abondants (polyphénols totaux, flavonoïdes totaux, tanins totaux) effectuée par spectrophotométrie a fait ressortir des teneurs relativement importantes en polyphénols totaux et en flavonoïdes totaux. L'identification par UHPLC-DAD-ESI/MS a déterminé la présence d'une trentaine de molécules dans l'extrait méthanolique appartenant à des acides phénoliques simples, flavonoïdes et tanins avec un chémotype constitué de l'acide rosmarinique (acide phénol simple) comme étant le composé majoritaire, et de dix-huit composés dont la luteolin-3'-glucuronide (flavone) est majoritairement représentée dans l'extrait aqueux. Plusieurs techniques ont été employées pour déterminer le pouvoir antifongique et antibactérien dont la plus importante est celle de la croissance en mode batch sur milieu discontinu non renouvelé. L'évaluation de l'effet antimicrobien a été effectuée au travers de trois paramètres importants de croissance : le pH, le poids sec de l'inoculum et la densité optique. Les cinétiques obtenues des différents paramètres analysés ont montré une inhibition importante de la plupart des souches et une biomasse microbienne assez faible en présence de l'extrait végétal méthanolique par comparaison à celles notées en présence de l'extrait aqueux et du pesticide chimique conventionnel Hyméxazole. Les souches de *Pseudomonas* se sont avérées encore plus sensibles en particulier *Pseudomonas sp 3* et *Pseudomonas sp 5* qui ont été inhibées par l'EM. Ces résultats témoignent de l'efficacité des extraits et de la haute sensibilité de la plupart des souches fongiques ou bactériennes. Ce résultat pourrait être à l'origine de la composition de l'extrait de la plante (EM en particulier) qui renferme une large gamme de molécules d'acides phénols simples dont l'acide rosmarinique qui sont réputées quant à leur pouvoir inhibiteur. En second lieu, l'effet herbicide de l'extrait méthanolique et de ses fractions SPE a été testé sur le Cresson *Lepidium sativum* L. Les deux types d'extrait n'ont pas affectée la germination. Par contre, on dénote une toxicité de la SPE 5 sur les racines des plantules. Pour finir, nous avons essayé d'estimer la toxicité de l'extrait méthanolique sur les organismes animaux utiles et non ciblés par le biopesticide ou l'extrait de la plante de notre plante par des tests *in vivo*. A partir de ces biotests, on dénote une toxicité élevée de l'EM sur les abeilles (*Apis mellifera intermissa*) et les punaises (*Nesidiocoris tenuis*) mais moindre sur les vers de terre (*Lumbricus terrestris* L.). Les doses utilisées ont provoqué des effets létaux à fort pourcentage à savoir que les doses testées sont extrêmes et de très loin supérieures à celles utilisées pour l'activité antimicrobienne et herbicide. Au vu, de ces résultats, les extraits de notre plante semblent à posteriori prometteurs quant à leur pouvoir antifongique et antibactérien et notamment contre les genres phytopathogènes : *Aspergillus*, *Fusarium*, *Alternaria*, *Colletotrichum*, *Helminthosporium*, *Penicillium* et *Pseudomonas*.

Mots clés : *Rosmarinus eriocalyx*, extrait méthanolique, extrait aqueux, fractions, effet biopesticide, toxicité, organismes non cibles.

Abstract

The methanolic extract, methanolic extract prepared under ultrasound and the aqueous extract of *Rosmarinus eriocalyx* were first investigated by a phytochemical and antimicrobial study to determine their biopesticide potency against several phytopathogenic species responsible for the decline in the production of crops. Phytochemical screening revealed a multitude of secondary metabolites confirmed by thin layer chromatography. Quantitative analysis of the most abundant secondary metabolite groups (total polyphenols, total flavonoids, total tannins) by spectrophotometry revealed relatively high levels of total polyphenols and total flavonoids. The identification by UHPLC-DAD-ESI/MS made it possible to determine the presence of about thirty molecules in the methanolic extract belonging to simple phenolic acids, flavonoids and tannins with a chemotype composed of rosmarinic acid (acid single phenol) as the major compound and eighteen compounds. Luteolin-3'-glucuronide (flavone) is the major product in the aqueous extract. Several techniques have been used to determine the antifungal and antibacterial power, the most important of which is that of growth in batch mode on non-renewed discontinuous medium. The evaluation of the antimicrobial effect was performed through three important growth parameters: pH, dry weight of the inoculum and optical density. The kinetics obtained from the various parameters analyzed showed a significant inhibition of most of the strains and a relatively low microbial biomass in the presence of the methanolic plant extract compared to those noted in the presence of the aqueous extract and the conventional chemical pesticide Hymexazole. *Pseudomonas* strains were found to be even more sensitive especially *Pseudomonas* sp 3 and *Pseudomonas* sp 5 which were inhibited by EM. These results demonstrate the efficiency of the extracts and the high sensitivity of most fungal or bacterial strains. This result could be at the origin of the composition of the plant extract (EM in particular) which contains a wide range of simple phenolic acid molecules including rosmarinic acid which are known for their inhibitory power. Secondly, the herbicidal effect of the methanolic extract and its SPE fractions was tested on the Cresson *Lepidium sativum* L. The two types of extract did not affect germination. On the other hand, there is evidence of SPE 5 toxicity on seedling roots. Finally, we tried to estimate the toxicity of the methanolic extract on the animal organisms useful and not targeted by the biopesticide or the extract of the plant of our plant by tests in vivo. From these biotests, we note a high toxicity of the EM on the bees (*Apis mellifera intermissa*) and the *Nesidiocoris tenuis* but less on the earthworms (*Lumbricus terrestris* L.). The doses used caused lethal high percentage that the doses tested were extreme and far higher than those used for antimicrobial activity and herbicide. In view of these results, the extracts of our plant seem a posteriori promising as to their antifungal and antibacterial power and especially against the phytopathogenic genera: *Aspergillus*, *Fusarium*, *Alternaria*, *Colletotrichum*, *Helminthosporium*, *Penicillium* and *Pseudomonas*.

Key words: *Rosmarinus eriocalyx*, methanolic extract, aqueous extract, fractions, biopesticide effect, toxicity, non-target organisms.

ملخص

تم فحص مستخلص الميثانول ومستخلص الميثانول المتحصل عليه بتأثير موجات فوق صوتية والمستخلص المائي لنبات *Rosmarinus eriocalyx* لأول مرة من خلال دراسة خصائصه الكيميائية ونشاطه كمضاد للميكروبات لاكتشاف فاعليته كمبيد حيوي ضد العديد من أنواع الميكروبات المسؤولة عن امراض النباتات، المتسببة في اتلاف وانخفاض إنتاج المحاصيل الزراعية. كشف الفحص الكيميائي النباتي عن عدد كبير من المستقلبات الثانوية التي أكتتها كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة. وكشف التحليل الكمي لمجموعات الأيض الثانوية الأكثر وفرة (البوليفينول الكلي، والفلافونويد الكلي، العفص الكلي) بواسطة الطيف الضوئي مستويات عالية نسبيا من مجموع البوليفينول والفلافونويد الكلي. حدد استخدام تقنية UHPLC-DAD-ESI / MS وجود حوالي ثلاثين جزيئة في مستخلص الميثانول الذي ينتمي إلى الأحماض الفينولية البسيطة والفلافونويدات والعضات ذات نمط كيميائي يتكون من حمض روزماريني (حمض الفينول البسيط) كما مركب الأغلبية، وثمانية عشر من المركبات. حيث يمثل luteolin-3'-glucuronide (فلافون) المركب الرئيسي في المستخلص المائي. تم استخدام العديد من التقنيات لتحديد القدرة المضادة للفطريات والبكتيريا، وأهمها النمو في وضع الدفعات على وسط غير متجدد. تم إجراء تقييم تأثير مضادات الميكروبات من خلال ثلاث معايير نمو مهمة: الرقم الهيدروجيني (pH)، والوزن الجاف للإلحاق والكثافة البصرية (D.O) وأظهرت الحركية التي تم الحصول عليها من مختلف المعلمات التي تم تحليلها تثبيطاً كبيراً لمعظم السلالات والحصول على كتلة حيوية ميكروبية منخفضة نسبياً في وجود مستخلص نبات الميثانول مقارنةً بتلك التي لوحظت في وجود المستخلص المائي والمبيد الكيميائي Hyméxazole. تم الحصول على تثبيط نمو سلالات *Pseudomonas* خاصة *Pseudomonas sp3* و *Pseudomonas sp5* تحت تأثير EM. توضح هذه النتائج كفاءة المستخلصات والحساسية العالية لمعظم السلالات الفطرية أو البكتيرية. يمكن أن تكون هذه النتيجة في أصل تكوين المستخلصات النباتية (EM على وجه الخصوص) التي تحتوي على مجموعة واسعة من جزيئات حمض الفينول البسيط بما في ذلك حمض روزماريني المعروف بقدرته المثبطة ثانياً، تم اختبار تأثير مبيدات الأعشاب لمستخلص الميثانول وجزيئات SPE على *Cresson Lepidium sativum* L. ولم يؤثر كلا النوعين من المستخلص على الإنبات. من ناحية أخرى، هناك دليل على سمية SPE5 على جذور الشتلات. أخيراً، حاولنا تقدير سمية المستخلص الميثانولي على الكائنات الحيوانية المفيدة وغير المستهدفة بالمبيدات الحيوية أو مستخلص نبات نباتنا عن طريق الاختبارات في الجسم الحي. من هذه التجارب الحيوية، هناك سمية عالية ل EM على النحل (*Apis mellifera intermissa*) وحشرة (*Nesidiocoris tenuis*) ولكن أقل على ديدان الأرض (*Lumbricus terrestris* L.). تسببت الجرعات المستخدمة في حدوث آثار مميته عالية، أي أن الجرعات التي تم اختبارها كانت شديدة ومتفوقة على تلك الجرعات المستخدمة في نشاط مضادات الميكروبات ومبيدات الأعشاب. في ضوء هذه النتائج، يبدو أن مستخلصات نباتنا واعدة في قوتها المضادة للفطريات والبكتيريا وخاصة ضد الأجناس المسببة للأمراض النباتية:

Pseudomonas، *Penicillium*، *Helminthosporium*، *Colletotrichum*، *Alternaria*، *Aspergillus*، *Fusarium*

الكلمات المفتاحية: *Rosmarinus eriocalyx*، المستخلص الميثانولي، المستخلص المائي، الكسور، تأثير المبيدات الحيوية، السمية، الكائنات غير المستهدفة.

Liste des figures

Fig. 1 : <i>Rosmarinus eriocalyx</i> dans son site naturel	10
Fig. 2 : La fleur de <i>Rosmarinus eriocalyx</i>	10
Fig. 3 : La situation géographique de la zone d'étude (El-Haddada, Souk-Ahras).....	11
Fig. 4 : Schéma des différentes étapes d'extraction de l'extrait aqueux et l'extrait méthanolique.....	13
Fig. 5 : Schéma des différentes étapes d'extraction extrait méthanolique par ultra-sons.....	15
Fig. 6 : Les plaques CCM après révélations par les révélateurs	24
Fig. 7: Chromatogramme de l'extrait méthanolique de <i>Rosmarinus eriocalyx</i> par UHPLC-DAD-ESI / MS en mode d'ionisation négative.....	30
Fig. 8: Chromatogramme de l'extrait aqueux de <i>Rosmarinus eriocalyx</i> par UHPLC-DAD-ESI / MS en mode d'ionisation négative.....	30
Fig. 9 : Structure chimique de l'Hymexazole.....	43
Fig. 10 : Les différentes étapes d'isolement des bactéries et des champignons à partir des sols agricoles.....	45
Fig. 11 : Schéma d'isolement des souches microbiennes à partir des feuilles infectées.....	47
Fig. 12 : test de d'hypersensibilité sur feuilles de <i>Nicotiana tabacum</i>	54
Fig. 13 : Les étapes de l'évaluation de l'effet antimicrobienne des extraits naturels et le pesticide par la méthode batch sur milieu discontinu non renouvelé.....	58
Fig. 14 : Schéma présentant les différentes étapes du test <i>in vivo ex situ</i> des activités antimicrobiennes des extraits de <i>Rosmarinus eriocalyx</i> sur <i>Citrus sinensis</i> L.....	61
Fig.15 : La microflore totale du sol.....	62
Fig. 16 : La microflore totale du sol.....	63
Fig. 17 : La microflore des feuilles infectées.....	63
Fig. 18 : La microflore des bactéries et des champignons des feuilles infectées.....	64
Fig. 19 : La zone d'inhibition provoquées par les extraits de <i>Rosmarinus eriocalyx</i> sur les souches du genre <i>Aspergillus</i>	68
Fig.20 : Effet de l'extrait méthanolique et l'extrait aqueux sur <i>Aspergillus ochracue</i>	68
Fig 21 : Effet de l'extrait méthanolique et l'extrait aqueux sur <i>Aspergillus terreus</i>	68
Fig. 22 : l'effet de l'extrait méthanolique sur <i>Aspergillus flavus</i>	69
Fig. 23 : Les zones d'inhibition provoquées par les extraits de <i>Rosmarinus eriocalyx</i> sur les souches du genre <i>Fusarium</i>	70
Fig. 24 : Les zones d'inhibition provoquées par les extraits de <i>Rosmarinus eriocalyx</i> sur les souches du genre <i>Alternaria</i>	71
Fig. 25 : Les zones d'inhibition provoquées par les extraits de <i>Rosmarinus eriocalyx</i> sur les souches des autres genres.....	71
Fig. 26 : les zones d'inhibition provoquées par les extraits de <i>Rosmarinus eriocalyx</i>	

sur les souches du genre <i>Pseudomonas</i>	72
Fig. 27 : Taux d'inhibition provoqués par les extraits de <i>Rosmarinus eriocalyx</i> sur les souches du genre <i>Aspergillus</i>	73
Fig. 28 : Taux d'inhibition provoqués par les extraits de <i>Rosmarinus eriocalyx</i> sur les souches du genre <i>Fusarium</i>	74
Fig. 29 : Taux d'inhibition provoqués par les extraits de <i>Rosmarinus eriocalyx</i> sur les souches du genre <i>Alternaria</i>	75
Fig. 30 : Taux d'inhibition provoqués par les extraits de <i>Rosmarinus eriocalyx</i> sur les souches des autres genres.....	76
Fig. 31 : Cinétique de croissance d' <i>Aspergillus terreus</i> provoqué par les extraits de <i>Rosmarinus eriocalyx</i>	84
Fig. 32 : Cinétique du pH d' <i>Aspergillus terreus</i> provoqué par les extraits de <i>Rosmarinus eriocalyx</i>	84
Fig. 33 : Cinétique de croissance d' <i>Aspergillus ochraceus</i> provoqué par les extraits de <i>Rosmarinus eriocalyx</i>	85
Fig. 34 : Cinétique du pH d' <i>Aspergillus ochraceus</i> provoqué par les extraits de <i>Rosmarinus eriocalyx</i>	85
Fig. 35 : Cinétique de croissance d' <i>Aspergillus nidulans</i> provoqué par les extraits de <i>Rosmarinus eriocalyx</i>	86
Fig. 36 : Cinétique du pH d' <i>Aspergillus nidulans</i> provoqué par les extraits de <i>Rosmarinus eriocalyx</i>	86
Fig. 37 : Cinétique de croissance d' <i>Aspergillus flavus</i> provoqué par les extraits de <i>Rosmarinus eriocalyx</i>	86
Fig. 38 : Cinétique du pH d' <i>Aspergillus flavus</i> provoqué par les extraits de <i>Rosmarinus eriocalyx</i>	87
Fig. 39 : le poids de l'inoculum des cultures des souches d' <i>Aspergillus</i> provoqué par les extraits de <i>Rosmarinus eriocalyx</i>	87
Fig. 40 : Cinétique de croissance de <i>Fusarium verticilloides</i> provoqué par les extraits de <i>Rosmarinus eriocalyx</i>	89
Fig. 41 : cinétique du pH de <i>Fusarium verticilloides</i> sous l'effet des extraits et de l'Hymexazole	89
Fig.42 : Cinétique de croissance de <i>Fusarium oxysporum</i> sous l'effet des extraits et de l'Hymexazole.....	89
Fig. 43 : Cinétique de pH de <i>Fusarium oxysporum</i> provoqué par les extraits de <i>Rosmarinus eriocalyx</i>	90
Fig. 44 : Cinétique de croissance et du pH de <i>Fusarium graminearum</i> provoqué par les extraits de <i>Rosmarinus eriocalyx</i>	90
Fig. 45 : Cinétique du pH de <i>Fusarium graminearum</i> provoqué par les extraits de	

<i>Rosmarinus eriocalyx</i>	90
Fig. 46 : Cinétique de croissance de <i>Fusarium proliferatum</i> provoqué par les extraits de <i>Rosmarinus eriocalyx</i>	91
Fig. 47 : Cinétique du pH de <i>Fusarium proliferatum</i> provoqué par les extraits de <i>Rosmarinus eriocalyx</i>	91
Fig. 48 : le poids de l'inoculum des cultures des souches du genre <i>Fusarium</i> provoqué par les extraits de <i>Rosmarinus eriocalyx</i>	91
Fig. 49 : Cinétique de croissance d' <i>Alternaria alternata</i> 1 provoqué par les extraits de <i>Rosmarinus eriocalyx</i>	93
Fig. 50 : Cinétique du pH d' <i>Alternaria alternata</i> 1 provoqué par les extraits de <i>Rosmarinus eriocalyx</i>	93
Fig. 51 : Cinétique de croissance d' <i>Alternaria alternata</i> 2 provoqué par les extraits de <i>Rosmarinus eriocalyx</i>	94
Fig. 52 : Cinétique du pH d' <i>Alternaria alternata</i> 2 provoqué par les extraits de <i>Rosmarinus eriocalyx</i>	94
Fig. 53 : Cinétique de croissance d' <i>Alternaria tenuissima</i> provoqué par les extraits de <i>Rosmarinus eriocalyx</i>	94
Fig. 54 : Cinétique du pH d' <i>Alternaria tenuissima</i> provoqué par les extraits de <i>Rosmarinus eriocalyx</i>	95
Fig. 55 : Cinétique de croissance d' <i>Alternaria arborescens</i> provoqué par les extraits de <i>Rosmarinus eriocalyx</i>	95
Fig. 56 : la cinétique de croissance d' <i>Alternaria arborescens</i> provoqué par les extraits de <i>Rosmarinus eriocalyx</i>	96
Fig. 57 : le poids de l'inoculum des cultures des souches du genre <i>Alternaria</i> provoqué par les extraits de <i>Rosmarinus eriocalyx</i>	96
Fig. 58 : la cinétique de croissance de <i>Penicillium sp</i> sous provoqué par les extraits de <i>Rosmarinus eriocalyx</i>	98
Fig. 59 : Cinétique de pH de <i>Penicillium sp</i> provoqué par les extraits de <i>Rosmarinus eriocalyx</i>	98
Fig. 60 : Cinétique de croissance de <i>Colletotrichum coccodes</i> provoqué par les extraits de par les extraits de <i>Rosmarinus eriocalyx</i>	99
Fig. 61 : Cinétique du pH de <i>Colletotrichum coccodes</i> provoqué par les extraits de <i>Rosmarinus eriocalyx</i>	99
Fig. 62 : Cinétique de croissance d' <i>Helminthosporium sp</i> provoqué par les extraits de <i>Rosmarinus eriocalyx</i>	100
Fig. 63 : Cinétique du pH d' <i>Helminthosporium sp</i> sous provoqué par les extraits de	

<i>Rosmarinus eriocalyx</i>	100
Fig. 64 : le poids de l'inoculum des cultures des souches des autres genres provoqué par les extraits de <i>Rosmarinus eriocalyx</i>	100
Fig. 65 : Cinétique de croissance de <i>Pseudomonas sp 1</i> provoqué par les extraits de <i>Rosmarinus eriocalyx</i>	101
Fig. 66 : Cinétique du pH de <i>Pseudomonas sp 1</i> provoqué par les extraits de <i>Rosmarinus eriocalyx</i>	101
Fig. 67 : Cinétique de croissance <i>Pseudomonas sp 2</i> provoqué par les extraits de <i>Rosmarinus eriocalyx</i>	102
Fig. 68 : Cinétique de pH <i>Pseudomonas sp 2</i> provoqué par les extraits de <i>Rosmarinus eriocalyx</i>	102
Fig. 69 : Cinétique de croissance <i>Pseudomonas sp 3</i> provoqué par les extraits de <i>Rosmarinus eriocalyx</i>	102
Fig. 70 : Cinétique de pH de <i>Pseudomonas sp 3</i> provoqué par les extraits de <i>Rosmarinus eriocalyx</i>	103
Fig. 71 : Cinétique de croissance <i>Pseudomonas sp 4</i> provoqué par les extraits de <i>Rosmarinus eriocalyx</i>	103
Fig. 72 : Cinétique de pH de <i>Pseudomonas sp 4</i> provoqué par les extraits de <i>Rosmarinus eriocalyx</i>	104
Fig. 73 : Cinétique de croissance <i>Pseudomonas sp 5</i> provoqué par les extraits de <i>Rosmarinus eriocalyx</i>	104
Fig. 74 : Cinétique de pH <i>Pseudomonas sp 5</i> provoqué par les extraits de <i>Rosmarinus eriocalyx</i>	104
Fig. 75 : Le poids de l'inoculum des cultures des souches du genre <i>Pseudomonas</i> provoqué par les extraits de <i>Rosmarinus eriocalyx</i>	105
Fig. 76 : l'effet toxique provoqué de l'extrait de <i>Rosmarinus eriocalyx</i> sur les fruits de <i>Citrus sinensis</i> inoculés des <i>Aspergillus</i>	106
Fig. 77 : L'effet toxique provoqué de l'extrait de <i>Rosmarinus eriocalyx</i> sur les fruits de <i>Citrus sinensis</i> inoculés de <i>Fusarium</i>	106
Fig. 78 : l'effet toxique provoqué de l'extrait de <i>Rosmarinus eriocalyx</i> sur les fruits de <i>Citrus sinensis</i> inoculés des <i>Alternaria</i>	107
Fig. 79 : l'effet toxique de l'EM de <i>Rosmarinus eriocalyx</i> sur les fruits de <i>Citrus sinensis</i> inoculés des autres genres.....	108
Fig. 80 : l'effet toxique provoqué de l'extrait de <i>Rosmarinus eriocalyx</i> sur les fruits de <i>Citrus sinensis</i> inoculés des <i>Pseudomonas</i>	109
Fig. 81 : Cresson alénois <i>Lepidium sativum</i> L.....	122

Fig. 82: Taux de germination des graines de <i>Lepidium sativum</i> L sousn l'effet des fractions SPE et l'extrait méthanolique de <i>Rosmarinus eriocalyx</i>	124
Fig.83 : Histogramme représentant la longueur des racines de <i>Lepidium sativum</i> L. sous l'effet des fractions SPE et l'extrait méthanolique de <i>Rosmarinus eriocalyx</i>	125
Fig. 84 : Figure représentant l'effet herbicide de l'extrait méthanolique et de ses fractions SPE sur la croissance des plantules de <i>Lepidium sativum</i> L.....	126
Fig. 85 : Histogramme représentant la longueur des plantules de <i>Lepidium sativum</i> L. sous l'effet de l'extrait methanolique et des fractions SPE I de <i>Rosmarinus eriocalyx</i>	126
Fig. 86 : <i>Apis millefera intermissa</i>	134
Fig.87 : <i>Lumbricus terrestris</i> L.....	135
Fig. 88: <i>Nesidiocoris tenuis</i>	136
Fig. 89 : Elevage <i>Nesidiocoris tenuis</i> sur feuille de <i>Nicotiana tabaccum</i> (INPV, 2016).....	136
Fig.90 : Taux de mortalité d' <i>Apis mellifera intermissa</i> (les abeilles) sous l'effet de l'extrait de <i>Rosmarinus eriocalyx</i>	139
Fig. 91: Taux de mortalité <i>Lumbricus terrestris</i> L sous l'effet de l'extrait de <i>Rosmarinus eriocalyx</i>	140
Fig. 92: Taux de mortalité des vers de terre <i>Nesidiocoris tenuis</i> sous l'effet de l'extarit méthanolique de <i>Rosmarinus eriocalyx</i>	141

Liste des tableaux

Tab. 1 : La systématique de <i>Rosmarinus eriocalyx</i>	10
Tab. 2 : Les systèmes de migration sélectionnés.....	17
Tab. 3 : les rendements (Rdt %) des trois extraits de <i>Rosmarinus eriocalyx</i>	21
Tab. 4. Composés du métabolisme secondaire mis en évidence par le criblage phytochimique.....	22
Tab. 5 : Les spots et les Rf calculés pour chaque système.....	24
Tab. 6 : l'estimation quantitative des polyphénols totaux, flavonoïdes totaux et des tanins totaux dans l'EM et l'EA de <i>Rosmarinus eriocalyx</i>	25
Tab. 7 : Les composés identifiés dans l'extrait méthanolique de <i>Rosmarinus eriocalyx</i> par UHPLC-DAD-ESI / MS.....	27
Tab. 8 : Les composés identifiés dans l'extrait aqueux de <i>Rosmarinus eriocalyx</i> par UHPLC-DAD-ESI / MS.....	29
Tab. 9 : Caractérisation des acides phénoliques identifiés dans l'extrait méthanolique de <i>Rosmarinus eriocalyx</i>	31
Tab. 10 : Caractérisation des flavonoïdes identifiés dans l'extrait méthanolique de <i>Rosmarinus eriocalyx</i>	32
Tab. 11 : Caractérisation des acides phénoliques identifiés dans l'extrait aqueux de <i>Rosmarinus eriocalyx</i>	33
Tab. 12 : Caractérisation des flavoloïdes identifiés dans l'extrait aqueux de <i>Rosmarinus eriocalyx</i>	33
Tab. 13. Tableau de lecture des tests du système API 20 E.....	52
Tab. 14. Tableau de lecture des tests du système API 20 NE.....	53
Tab. 15 : Le dénombrement de la microflore microbienne isolée des sols.....	62
Tab. 16 : le dénombrement total des isolats bactériennes et fongiques isolés à partir des feuilles infectées.....	62
Tab. 17 : Les isolats bactériennes et fongiques dénombrés par lavage et broyage.....	63
Tab. 18 : La liste des espèces fongiques isolées.....	64
Tab. 19 : La taxonomie des espèces bactériennes isolées.....	65
Tab. 20: La taxonomie des espèces fongiques isolées.....	66
Tab. 21 : Test de l'hypersensibilité des souches de <i>Pseudomonas</i> sur feuilles de tabac.....	67
Tab. 22 : L'inhibition de la croissance provoquée par les extraits de <i>Rosmarinus eriocalyx</i> sur les souches genre <i>Pseudomonas</i>	76
Tab 23 : La densité optique (D.O) de l'activité en milieu liquide sur les souches d' <i>Aspergillus</i>	78
Tab. 24 : Les CMI/ CMF des souches d' <i>Aspergillus</i>	78

Tab. 25 : La densité optique (D.O) de l'activité en milieu liquide sur les souches de <i>Fusarium sp.</i>	79
Tab.26 : Les CMI/ CMF des souches de <i>Fusarium sp.</i>	79
Tab. 27 : La densité optique (D.O) de l'activité en milieu liquide sur les souches de <i>Fusarium</i>	80
Tab. 28 : Les CMI/ CMF des souches d' <i>Alternaria</i>	80
Tab. 29 : La densité optique (D.O) de l'activité en milieu liquide sur les souches des autres genres.....	81
Tab. 30 : Les CMI/ CMF des souches des autres genres.....	81
Tab. 31 : La densité optique (D.O) de l'activité en milieu liquide sur les souches de <i>Pseudomonas</i>	82
Tab. 32 : Les CMI/ CMF des souches de <i>Pseudomonas</i>	82
Tab. 33 : Les diamètres des nécroses provoqués par l'extrait méthanolique de <i>Rosmarinus eriocalyx</i> sur les fruits de <i>Citrus sinensis</i> inoculés des souches phytopathogènes.....	109
Tab. 34 : La systématique de <i>Lepidium sativum</i>	122
Tab. 35 : Le rendement (RDT) des Fractions SPE et de l'EM de <i>Rosmarinus eriocalyx</i>	123
Tab. 36 : Taux de germination (TG%) des graines de <i>Lepidium sativum</i> L sous l'effet des fractions SPE et de l'extrait méthanolique de <i>Rosmarinus eriocalyx</i>	124
Tab. 37 : Longueur des racines de <i>Lepidium sativum</i> L. sous l'effet des fractions SPE et l'extrait méthanolique de <i>Rosmarinus eriocalyx</i>	125
Tab.38. Longueur des plantules de <i>Lepidium sativum</i> L sous l'effet des fractions SPE et de l'extrait méthanolique de <i>Rosmarinus eriocalyx</i>	126
Tab. 39 : La systématique d' <i>Apis mellifera intermissa</i> d'après (Buttel-Reepen ,1906 ; Marchenay et Laurence, 2007).....	134
Tab. 40 : La systématique de <i>Lumbricusterrestris</i> L., 1758).....	135
Tab. 41 : La systématique de <i>Nesidiocoris tenuis</i> (Reuter, 1895).....	136
Tab. 42 : Protocole expérimental du test de toxicité sur <i>Apis mellifera intermissa</i>	137
Tab. 43 : Protocole expérimentale du test de toxicité sur <i>Lumbricus terrestris</i> L.....	137
Tab. 44 : Protocole expérimental du test de toxicité sur <i>Nesidiocoris tenuis</i>	138
Tab.45 : Taux de mortalité d' <i>Apis mellifera intermissa</i> soumises à l'effet de l'extrait méthanolique de <i>Rosmarinus eriocalyx</i>	138

Tab.46 : Taux de mortalité de <i>Lumbricusterrestris</i> L. Soumises à l'effet de l'extrait méthanolique de <i>Rosmarinus eriocalyx</i>	139
Tab. 47 : Taux de mortalité de <i>Nesidiocoris tenuis</i> soumises à l'effet de l'extrait méthanolique de <i>Rosmarinus eriocalyx</i>	140
Tab. 48 : DL 50 et DL 100 des organismes animaux non cibles.....	141

Liste des abréviations

μ EqQ/g : microgramme d'équivalent de quercétine par milligramme d'extrait

CCM : Chromatographie sur couche mince

CMB : Concentration minimale bactéricide

CMF : Concentration minimale fongicide

CMI : Concentration minimale inhibitrice

DL 50 : la dose létale nécessaire qui tue 50% de la population animale testée

DMSO : Diméthylsulfoxyde

DL 100 : la dose létale nécessaire qui tue 100% de la population animale testée

EA : extrait aqueux

EDS : eau distillée stérile

EL : extrait de levure

EM : extrait méthanolique

EMS : extrait méthanolique soumis à une sonication

INPV : institut national de la protection des végétaux

MEA : extrait de malt-agar

mg eq AG/g : milligramme d'équivalent d'acide gallique par gramme d'extrait

mg Eq C/g : milligramme d'équivalent de catéchine par gramme d'extrait

MH : Mueller-Hinton

PDA : Pomme de terre-dextrose-agar

Rf : le rapport frontal

SM : solution mère

SPE : solide phase extraction

UHPLC-DAD-ESI / MS : Ultra-High-Performance Liquid Chromatography Electrospray Ionization Mass Spectrometry with Diode Array Detection

UFC : Unités Formant Colonies

INTRODUCTION GENERALE

Introduction générale

Les deux tiers de la population mondiale d'aujourd'hui dépendent de l'agriculture pour leur subsistance, mais de nos jours, la croissance et la production des cultures agricoles sont de plus en plus entravées chaque jour (**Elumalai et Rengasamy, 2012 ; Mishra et al., 2012**). Animaux ravageurs, plantes parasites, micro-organismes pathogènes (bactéries, champignons, mycoplasmes, virus), insectes et nématodes sont responsables, chaque année, de la perte de 20 à 40% du rendement des cultures avant récolte et entre 1 et 20% après récolte (**Janisiewicz et Korsten, 2002 ; Adam, 2008**) dont le pourcentage le plus élevé est dû aux maladies cryptogamiques (85%). **Popp et al. (2013)** signalent que les pertes de production avant récolte, des cultures mondiales sont estimées à 85% et sont dues aux ravageurs (insectes, micro-organismes). Pendant que les maladies provoquées par les adventices sont estimées à 35 %. À en croire les tenants de l'industrie, la diminution de la production mondiale de denrées alimentaires causée par la non-utilisation des produits phytosanitaires pourrait être à l'origine de famines chez les populations déjà fragilisées. En conséquence, la seconde moitié du XXème siècle a été le témoin d'une utilisation progressive et massive des produits phytosanitaires dans le monde. Les agriculteurs pour sauver leurs cultures de ces problèmes dans le but d'augmenter la production, ils ont recours aux pesticides de synthèse. Ces produits chimiques sont considérés comme l'arme la plus efficace pour faire face à ces ravageurs (**Kouassi, 2001 ; Thakore, 2006**).

Par ailleurs, les pesticides peuvent avoir plusieurs impacts négatifs lorsqu'ils sont appliqués sans raison ou au mauvais moment (**Hershman et al., 2011**). En effet, les champignons responsables des maladies fongiques peuvent développer des résistances à certains fongicides (strobilurines et triazoles), insecticides et herbicides. De même, les bactéricides peuvent également modifier les réponses des réactions des bactéries face à différentes molécules de pesticides en entraînant des résistances. Libérés dans l'environnement, les pesticides vont évidemment éliminer les organismes contre lesquels ils sont utilisés. Cependant, la plupart de ces produits vont également toucher d'autres organismes que ceux visés au départ, de manière directe (absorption, ingestion, respiration, etc.) ou indirecte (via un autre organisme contaminé, de l'eau pollué, etc.), les effets sur la biodiversité et notamment la flore et la faune terrestres et aquatiques, sont donc indéniables.

La publication en 1962 du livre ``Silent Springs´´ printemps silencieux, écrit par Rachel Carson a suscité une prise de conscience des problèmes liés aux produits phytosanitaires sur l'environnement. Elle fut la première à dénoncer les effets nocifs de ces produits chimiques sur les organismes non cibles comme les oiseaux. Cet ouvrage a entraîné l'interdiction du DDT aux

Introduction générale

Etats-Unis en 1972 (**Louat, 2013**). Ces substances ont entraîné la dégradation des sols par la pollution et l'accumulation des résidus, l'apparition et la généralisation des mécanismes de résistance chez les pathogènes, le déséquilibre écologique, dû au fait que beaucoup de ces composés de synthèse ont un large spectre d'action, détruisant non seulement les agents nuisibles, mais également les autres populations de l'écosystème. (**Adam, 2008**). Certains pesticides comme les organochlorés (le DDT ou le lindane par exemple) sont peu ou pas dégradés dans le sol et les eaux, etc. De ce fait, ces pesticides vont s'accumuler dans les plantes, voire dans les graisses animales, et donc se concentrer tout au long de la chaîne alimentaire.

Les préoccupations mondiales en matière de santé et d'impact environnemental des pesticides synthétiques, tant des consommateurs que des agences gouvernementales, se sont traduites par une action politique sous la forme de restrictions sur l'utilisation de ces produits, en particulier dans les cultures vivrières et une prise de conscience accrue des problèmes environnementaux associés aux pesticides. En conséquence, il est logique de trouver des moyens biologiques alternatifs pour répondre à ces préoccupations qui permettront ainsi de lutter contre les agents pathogènes mais en parallèle de réduire l'utilisation des pesticides de synthèse. Ainsi depuis déjà très longtemps, les scientifiques ont essayé de mener leurs recherches sur les biopesticides d'origine naturels comportant moins de risques pour l'environnement. Cependant la découverte de nouvelles molécules de synthèse antimicrobiennes efficaces à action rapide et leur utilisation généralisée au siècle dernier ont entraîné un manque d'intérêt pour les plantes et les microorganismes en tant que sources naturelles de produits phytopharmaceutiques d'agents antimicrobiens (**Cowan, 1999**).

Fort heureusement, la situation a changé ces dernières années et la sensibilisation accrue du public aux effets négatifs de la surexposition aux produits chimiques de synthèse a conduit à rechercher des « solutions vertes », telles que les produits alimentaires sans produits chimiques organiques et synthétiques (**Moreno et al., 2006**). De nouvelles stratégies de contrôle des maladies sont donc nécessaires de toute urgence. La mise au point de nouvelles stratégies de lutte contre les maladies des plantes est particulièrement importante pour les agents pathogènes difficiles à maîtriser avec les méthodes existantes. L'utilisation des extraits de plantes revêt une importance considérable pour la réduction des produits conventionnels et la recherche des solutions alternatives pour une meilleure production agricole et écologique à moindres effets secondaires.

Introduction générale

Les pesticides naturels ou biopesticides sont facilement accessibles et relativement rentables, dans la perspective de méthodes de production durables. La révolution verte issue de toutes ces préoccupations que nous venons de citer a développé la recherche dans ce domaine. Cette révolution a commencé initialement dans une direction de confirmation plus probable du potentiel antimicrobien, avec des plantes médicinales utilisées empiriquement dans le médicament populaire à traiter diverses maladies. Par la suite, la portée de travail élargi à des applications de l'utilisation de produits obtenus à partir de ces plantes dans le domaine de la lutte biologique ou dans l'élimination des maladies des plantes provoquées par les agents phytopathogènes. De ce fait, l'avenir n'est probablement plus aux pesticides de synthèse. Certes, ceux-ci ne disparaîtront évidemment pas du jour au lendemain de l'arsenal des cultivateurs mais 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...

Retrouvés sous plusieurs appellations, la lutte biologique, la lutte alternative ou l'agroécologie à base de produits naturels ou de biomolécules actives non toxiques est l'application de concepts et principes écologiques pour la réalisation de systèmes agricoles durables. Elle intègre les connaissances de l'agronomie, l'écologie, en les appliquant et en les adaptant aux conditions locales et environnementales en minimisant les intrants chimiques et en favorisant les pesticides d'origine naturel (**Dalgaard *et al.*, 2003**). Cette dernière approche n'est pas si récente puisque les espèces végétales sont parmi les premiers pesticides naturels connus depuis l'Antiquité. Cette action phytosanitaire des plantes est appelée à se développer et fait l'objet de nombreux travaux. En effet, la demande en biopesticides est de plus en plus forte compte tenu de la conjoncture actuelle visant à éliminer les produits chimiques conventionnels considérés comme polluants et impactant sur la santé (**Regnault-Roger *et al.*, 2002**). Avec l'avènement de nouvelles techniques telles que le génie génétique moléculaire et le génie des protéines, la production de biopesticides s'est améliorée (**Leng *et al.*, 2011**). L'amélioration progressive de la production de biopesticides a permis de développer d'excellentes perspectives d'application avec d'importants avantages sociaux et économiques.

À cet égard, l'utilisation de végétaux ou de matières végétales comme biopesticides revêt une grande importance et mérite une plus grande attention (**Bodde, 1982**). En Amérique du Nord, diverses études ont montré l'efficacité fongicide des extraits de plantes et dont certains ont fait l'objet d'une formulation biologique efficace contre le mildiou de la pomme de terre. C'est le cas de l'extrait à base de thé de compost commercial (Jolly Farmer) et du Varech (100% à base

Introduction générale

d'algue) (**Sturz et al., 2006**). En outre, plusieurs chercheurs ont étudié l'effet de divers extraits de plantes sur des microorganismes pathogènes. **Kumer et Tripathi (1991)** ont mentionné que des extraits d'*Eupartrium cannabinum* inhibaient complètement la croissance mycélienne de *Pythium debaryanum*, *Sclerotium rolfsii* et *Rhizoctonia solani*. Également, **Karapinar, (1985)**, **Nanir et Kadu (1987)** ont signalé que certains extraits de plantes présentaient des propriétés antifongiques. Dans les études agricoles, ces composés ont des activités à large spectre contre les champignons, les nématodes et les insectes (**Lee et al. 1997 ; Wilson et al. 1997 ; Calvet, 2001**).

Les phénols synthétisés par les plantes sont considérés comme potentiellement toxiques pour la croissance et le développement d'agents pathogènes fongiques, réduisant ainsi les maladies des plantes (**Okwu et Okwu, 2004**). Les travaux de **Girijashankar et Thayumanava (2005)** ont caractérisé les composés phénoliques à l'aide de la chromatographie liquide à haute pression en phase inverse à partir d'extraits aqueux de *Lawsonia inermis*. Ces derniers ont fait référence à l'effet antimicrobien sur la croissance d'agents pathogènes du sol comme *Macrophomina phaseolina*, *Pythium aphanidermatum* et *Rhizoctonia solani*.

Outre les composés phénoliques, les flavonoïdes et en particulier les flavones ont été testés *in vitro* par **Harborne, (1973)**, **Cotoras et al. (2001)** et **Akila et al. (2011)** contre une gamme d'agents phytopathogènes tels que *Botrytis cinerea* et *Fusarium oxysporum*. Les tanins possèdent également une activité antimicrobienne très intéressante en inhibant la croissance et le développement des agents microbiens en précipitant les protéines et en limitant la disponibilité des protéines nutritionnelles (**Sodipo et al., 1991**).

Parmi les familles riches en substance actives, nous citons celle des Lamiacées à laquelle appartient l'espèce végétale étudiée dans cette thèse. La famille possède environ 233 genres et 6000 espèces. Les espèces les plus réputées qui ont fait l'objet de nombreuses investigations sont notamment, *Rosmarinus officinalis*, *Thymus vulgaris*, *Melissa officinalis*. Ces espèces sont riches en composés terpéniques et phénoliques, l'acide caféique, l'acide férulique, l'acide chlorogénique, la lutéine, l'apigénine, la génkwanine, la quercétine, la rutine, l'épicatéchine et la catéchine (**Moreno et al., 2006 ; Ben Farhat et al., 2009 ; Castro-Vázquez et al., 2009**).

Pour notre part, nous nous sommes intéressés à une espèce végétale qui a fait l'objet de très peu d'investigations et notamment dans le domaine agricole et dans la recherche des alternatives aux produits conventionnels. Il s'agit de *Rosmarinus eriocalyx* Jord. & Fourr. C'est une plante

Introduction générale

endémique qui pousse largement sur les sols rocheux et les pâturages dans les montagnes des régions de l'est algérien (Arnold et al., 1997 ; Benbelaïd et al., 2016). Le peu d'étude concernant cette espèce a été mené principalement sur la composition chimique de ses huiles essentielles (Soriano Cano et al., 1993 ; Arnold et al., 1997 ; Dahmane et al., 2010 ; Fadel et al., 2011 ; Bendeddouche et al., 2011 ; Benbelaïd et al. 2016 ; Bendif, 2017). Les extraits bruts de *Rosmarinus eriocalyx* ont été négligés par les auteurs ; un nombre très limité de scientifiques tels que Gaamoune et Nouioua (2018), Bendif et al. (2017), Benbelaïd et al. (2016) Menaceur et Hazzit (2014) et Bendeddouche et al. (2011) a essayé de vérifier quelques activités biologiques de ses extraits.

Pour ce qui nous concerne, nos recherches se sont concentrées sur le pouvoir biopesticide de ses extraits foliaires bruts méthanoliques et aqueux ainsi que de ses fractions en phase solide (SPE) vis-à-vis des espèces phytopathogène fongiques et bactériennes. Ces agents pathogènes sont les plus réputées dans la contamination des grandes cultures maraichères qui ont pour conséquence principale la baisse de la production agricole. Pour ce faire, le travail présenté a été structuré comme suit :

- Une introduction générale faisant le point de la question.
- Le premier chapitre a été consacré à une étude phytochimique de la plante de *Rosmarinus eriocalyx*. Une évaluation quantitative et qualitative a été réalisée à partir de ses extraits bruts.
- Dans un deuxième chapitre, nous avons réalisé une étude antimicrobienne détaillée dans des conditions *in vitro* et *in vivo* (effets des extraits sur les agents pathogènes bactériens et fongiques)
- L'effet herbicide des extraits a été également entrepris dans un troisième chapitre sur une espèce végétale de mauvaise herbe en tenant compte des paramètres : taux de germination des graines, longueur des racines et taille des plantules.
- Enfin et dans un quatrième chapitre, nous avons testé la toxicité des extraits sur les organismes animaux utiles non cibles qui peuvent être affectés indirectement par l'emploi des extraits de la plante.

CHAPITRE I

ETUDE PHTYTOCHIQUE DES

EXTRAITS DE ROSMARINUS

ERIOCALYX JORD & FOURR

Introduction

Le terme métabolite est généralement limité aux petites molécules. Ces dernières ont diverses fonctions, notamment la structure, la signalisation, la défense et les interactions avec d'autres organismes. Les plantes produisent un vaste assortiment de composés organiques dont la grande majorité ne semble pas participer directement à la croissance et au développement. Ces substances, appelées traditionnellement métabolites secondaires, sont souvent réparties de manière différentielle entre des groupes taxonomiques limités dans le règne végétal (**Zhaoa et al., 2005**). Le métabolisme secondaire, remplit de multiples fonctions tout au long de leur cycle de vie. Le métabolisme secondaire des plantes utilise des composés et des enzymes issus du métabolisme primaire. Actuellement, des dizaines de milliers de métabolites secondaires ont été décrits, notamment des terpénoïdes (isoprénoïdes), des phénylpropanoïdes, des alcaloïdes, etc. (**Kennedy et Wightman, 2011 ; Kroymann, 2011**). Ces produits naturels végétaux jouent un rôle important dans l'interaction des plantes avec leur environnement biotique et abiotique ; par exemple, ils servent d'attracteurs pour les pollinisateurs (**Dixon, 2001 ; Verpoorte et Memelink, 2002**). Certains métabolites secondaires servent également de composés antioxydants et de protecteurs contre les rayons UV.

Du point de vue de la pharmacologie, les métabolites secondaires des plantes représentent une bibliothèque passionnante de composés bioactifs filtrés par la sélection naturelle, qui ont été utilisés par les humains pour traiter les infections et les troubles de la santé. D'un point de vue chimique, les métabolites secondaires sont intéressants pour diverses raisons, par exemple : leur diversité structurale, leur potentiel en tant que candidats médicaments. La diversité structurale de ces substances est étonnante, il existe des exemples de composés produits dans la nature avec des structures si complexes qu'aucun chimiste ne pourrait les inventer, encore moins les synthétiser (**Andersson, 2012**). Les plantes, en raison de leur teneur en protéines et en glucides, constituent une source de nourriture importante pour de nombreux animaux, tels que les insectes, les escargots et de nombreux vertébrés, comme les plantes ne peuvent pas fuir, elles ont dû élaborer des stratégies qui les rendent indigestes ou toxiques pour les protéger de la consommation. De nombreuses plantes se protègent en produisant des protéines toxiques (par exemple, l'amylase, des inhibiteurs de protéinase ou des lectines), qui altèrent la digestion des herbivores. En réponse à l'alimentation des chenilles, les plantes de maïs mobilisent une protéase qui détruit l'intestin de la chenille. Les métabolites secondaires sont les alcaloïdes, les isoprénoïdes et les phénylpropanoïdes qui comprennent tous des pesticides naturels qui

Chapitre I : Etude phytochimique

protègent les plantes contre les herbivores et les microorganismes pathogènes. Chez certaines plantes, ces pesticides naturels représentent 10% de la matière sèche (**Heldt, 2011**). En outre, les plantes produisent une grande variété de produits polyphénoliques contenant une ou plusieurs fonctions hydroxyles sur un ou plusieurs cycles aromatiques. Ces produits pourraient constituer une partie importante du système de défense des plantes contre les parasites et les maladies, notamment les nématodes parasites des racines (**Wuyts et al., 2006**). Les coumarines font partie de ces composés phénoliques répandus dans les plantes vasculaires et qui semblent fonctionner à des capacités différentes dans divers mécanismes de défense des plantes contre les insectes, herbivores et champignons. Ils dérivent de la voie de l'acide shikimique, commune chez les bactéries, les champignons et les plantes mais absente chez les animaux. Les tanins constituent également un groupe de substances phénoliques polymères, formés par la condensation de dérivés de flavan, qui sont transportés dans des tissus ligneux des plantes (**Omojate et al., 2014**). La plupart des tanins ont des masses moléculaires comprises entre 600 et 3 000. Les tanins sont des toxines générales qui réduisent considérablement la croissance et la survie de nombreux herbivores et agissent également comme répulsifs pour l'alimentation d'une grande diversité d'animaux. Chez les herbivores de mammifères, ils provoquent une sensation aiguë et astringente dans la bouche du fait de leur liaison aux protéines salivaires.). Les propriétés défensives des tanins sont généralement attribuées à leur capacité à lier des protéines. Les acides chlorogéniques ont probablement une fonction particulière dans la résistance aux maladies de certaines plantes. Ils empêchent le maculage des oignons, une maladie causée par le champignon *Colletotrichum circinans*, ainsi que la germination des spores et la croissance d'autres champignons (**Vickery, 1981 ; Butt et Lamb, 1981 ; Mayer, 1987**). Certains pensent que l'acide chlorogénique et certains autres composés apparentés peuvent être facilement formés et oxydés en quinones fongistatiques puissantes par certains cultivars résistants aux maladies, mais moins facilement par les cultivars sensibles (**Mazid et al., 2011**). Tous ces composés naturels faisant partie du métabolisme secondaire sont présents dans la plupart des espèces végétales et en particulier chez les plantes médicinales aromatique.

Dans ce contexte, notre présente étude consiste en une contribution à la valorisation phytochimique d'une espèce endémique des régions méditerranéennes (Algérie, Maroc, Tunisie, France, Espagne, etc...), il s'agit de l'espèce, *Rosmarinus eriocalyx* Jord. & Fourr. Cette plante est mal connue à cause de son immense ressemblance avec le *Rosmarinus officinalis*, la plus connue en Algérie à cause de son utilisation en phytothérapie par la population. L'étude phytochimique de la plante étudiée dans cette thèse va nous permettre

d'avoir un aperçu détaillé sur sa composition et en particulier en métabolites secondaires et la caractérisation du contenu de ses extraits méthanoliques et aqueux.

1. Matériel et Méthodes

1. 1. Présentation de l'espèce végétale étudiée

Notre travail a été entrepris sur l'espèce *Rosmarinus eriocalyx*, plante aromatique appartenant au genre *Rosmarinus* très réputé pour ses nombreuses utilisations (Jordán *et al.*, 2013). C'est une plante aromatique et médicinale de la famille des Lamiacées, Cette dernière a été utilisée depuis l'Antiquité partout dans le monde, elle est rencontrée dans diverses origines géographiques. Il existe dans la littérature jusqu'à 14 noms spécifiques au *Rosmarinus* et plus de 50 combinaisons sous spécifiques, qui ont été réduites à trois espèces, *Rosmarinus officinalis* L, *Rosmarinus tomentosus* Hub. Mor. & Maire, *Rosmarinus eriocalyx* Jord. & Fourr anciennement appelée *Rosmarinus tournefortii* Noë ex Jord. & Fourr.) Jahand. & Maire. (Menaceur, 2014).

La plante pousse largement sur des terrains rocheux et des pâturages dans les zones montagneuses de l'est de l'Algérie (Arnold *et al.*, 1997 ; Benbelaïd, 2016). *Rosmarinus eriocalyx* se distingue de *Rosmarinus officinalis* par ses feuilles plus petites, de seulement 5–15 mm de long et de moins de 2 mm de large, et par une tige à la chevelure plus dense. En effet, sous la loupe binoculaire, l'inflorescence et le calice de *Rosmarinus eriocalyx* possèdent des poils glanduleux caractéristiques (Fig.1, Fig.2), alors que *Rosmarinus officinalis* possède plutôt des poils ordinaires, c'est le caractère le plus distinctif (Quézel et Santa, 1962). À cet égard, l'épithète « eriocalyx » désigne un calice laineux. Une autre différence par rapport à *Rosmarinus officinalis* est sa croissance prostrée et sa hauteur inférieure (souvent inférieure à 25 cm et ne dépassant jamais 1 m de hauteur) (Fadel, 2011). Sa taxonomie est présentée dans le tableau suivant (tab.1).

Tab. 1 : La systématique de *Rosmarinus eriocalyx*

Règne	Plantae
Division	Magnoliophyta
Classe	Magnoliopsida
Ordre	Lamiales
Famille	Lamiaceae
Genre	<i>Rosmarinus</i>
Espèce	<i>Rosmarinus eriocalyx</i> Jord. &Fourr. 1866



Fig. 1 : *Rosmarinus eriocalyx*
dans son site naturel



Fig. 2 : La fleur de *Rosmarinus eriocalyx*

1.1.1. Site d'échantillonnage

Le site d'échantillonnage de notre plante est la commune de Haddada (Machtat Debidiba), il se situe à l'Est de la wilaya de Souk-Ahras (**Fig. 3**). Haddada est limitée par les communes de : Khedara, Sidi Fradj, Merahna et la commune de Sakiet Sidi Youcef Tunisie. La commune se caractérise par un relief accidenté constitué essentiellement de deux alignements de crêtes distincts, l'un au Nord l'autre au Sud. Elle est caractérisée par deux périodes : La première, froide et humide s'étend de l'automne à l'hiver alors que la deuxième sèche et chaude et s'étend du printemps à l'été. Un été sec et chaud avec des températures comprises entre 24°C et 32° C en juillet et août et un hiver froid et humide avec des températures s'échelonnant entre 2°C et

14° C en janvier et février. Ce site se caractérise par des espèces dominantes comme : le pin d'Alep le romarin et le genévrier. La couverture végétale de la région est diversifiée et comprend plusieurs familles, les espèces les plus abondantes sont les Eucalyptus, le Chêne liège, le Pin d'Alep et le Cyprès et un cortège floristique composé de Bruyère, Lentisque, et Romarin.

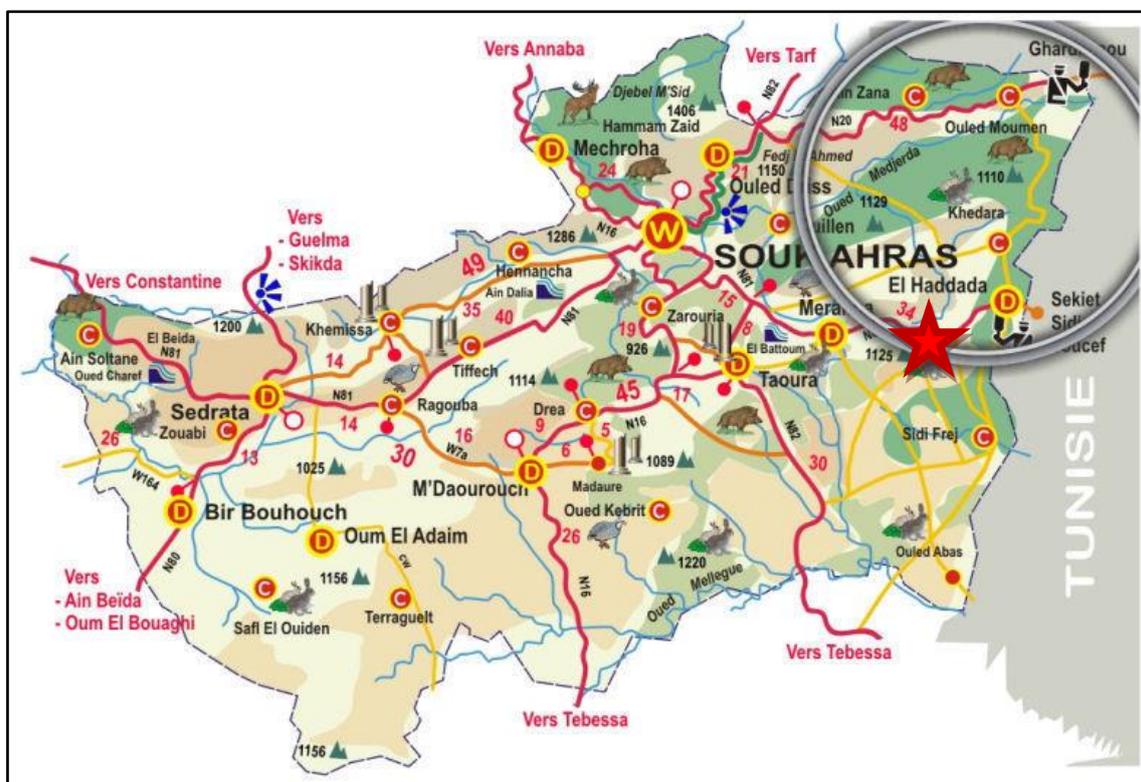


Fig. 3 : La situation géographique de la zone d'étude (El-Haddada, Souk-Ahras).

1.1.2. Réalisation des prélèvements

Les feuilles de *Rosmarinus erioalyx* ont été récoltées pendant la période de la floraison. Les feuilles saines ont été prélevées à partir de plusieurs points de prélèvement sur toute la superficie du site étudié. Les feuilles recueillies 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 plusieurs jours. Une fois séchées, les feuilles sont finement broyées à vitesse modérée. La drogue obtenue est conservée dans des flacons en verre ambré et hermétiquement fermés en vue des expérimentations et analyses.

1.2. Préparation des extraits bruts foliaires

Trois sortes d'extraits ont été préparées. Un extrait méthanolique, un extrait aqueux et un extrait méthanolique soumis à des ultrasons (extraction par sonication).

1. 2.1. Préparation de l'extrait méthanolique

30g de poudre, sont macérés dans 600ml de méthanol absolu sous agitation douce pendant une nuit à température ambiante. Le macérât est récupéré puis filtré une première fois à travers une membrane de filtration millipores. Le résidu est remis une 2^{ème} fois pendant 24h dans du méthanol sous les mêmes conditions. Après 24 h, elle est filtrée de nouveau de la même façon puis le résidu est remis encore une 3^{ème} fois dans du méthanol mais seulement pour une période de 12h. Après la dernière filtration, le méthanol est éliminé du filtrat par évaporation sous vide dans un rotavapeur (BÜCHI) à 40°C, permettant ainsi d'obtenir un résidu qui est ensuite repris dans l'eau. Le résidu ainsi obtenu a été ensuite lyophilisé puis conservé par congélation (**Fig. 4**). (**Fellah et al., 2008**).

1.2.2. Préparation de l'extrait aqueux

30g de poudre, sont macérés dans 600ml de l'eau bidistillée sous agitation douce pendant une nuit à température ambiante. Le macérât aqueux est soumis aux mêmes étapes d'extraction que celles réalisées pour l'extrait méthanolique. Après la dernière filtration, l'eau est éliminée du filtrat par évaporation sous vide dans un rotavapeur (BÜCHI) à 40°C, permettant ainsi d'obtenir un résidu qui est ensuite repris dans de l'eau bidistillée, lyophilisé puis conservé par congélation (**Fig. 4**).

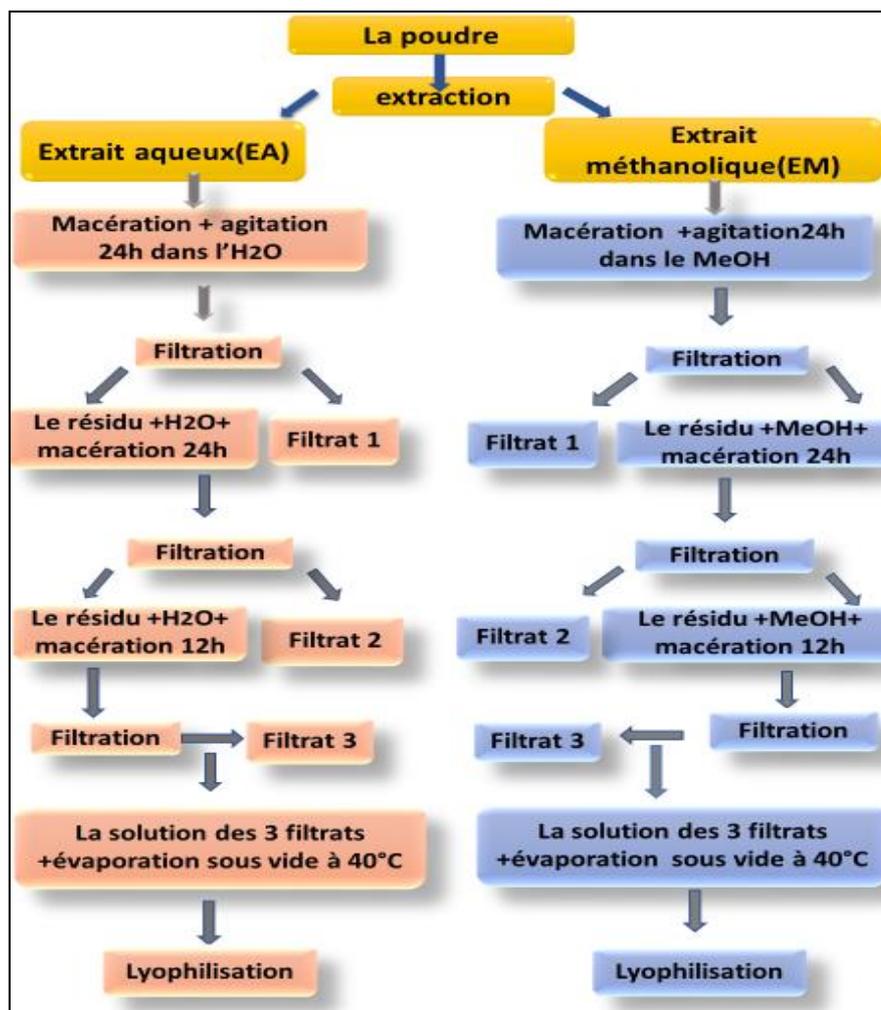


Fig. 4 : Schéma des différentes étapes d'extraction de l'extrait aqueux et l'extrait méthanolique

1.2.3. Préparation l'extrait méthanolique par ultrasons (EMS)

L'extraction par ultrasons est une méthode non thermique basée sur le principe de cavitation, des forces de cisaillement élevées et des microturbulences qui cassent mécaniquement les parois cellulaires, facilitant simultanément la libération des constituants cellulaires du matériel végétal dans le solvant sans dégradation chimique. Les températures de procédé douces permettent d'économiser les extraits désirés (par exemple les antioxydants, les polyphénols, etc.) de la dégradation thermique. De plus, l'extraction assistée par ultrasons peut souvent être réalisée dans des solvants aqueux (eau). L'évitement des solvants organiques (par exemple l'acétone, l'hexane) est particulièrement important pour l'extraction des composés qui sont ensuite incorporés dans les produits alimentaires et pharmaceutiques (Takeuchi *et al.*, 2009).

La sonication est utilisée pour extraire des composants fonctionnels de nombreuses matrices végétales et tissulaires différentes. Il s'est avéré qu'elle est plus rapide que les techniques d'extraction conventionnelles. L'extraction par ultrasons peut être effectuée par lot ou en ligne à l'aide d'une Flow Cell. Les forces ultrasoniques intenses perforent ou cassent la matrice cellulaire de sorte que tout le matériel intracellulaire est rapidement et facilement libéré, de sorte qu'un rendement maximum soit extrait. Dans la méthode d'extraction par ultrasons, les ondes sonores de fréquences supérieures à 20 KHz sont utilisées pour provoquer la rupture de la paroi cellulaire et la diffusion du solvant à l'intérieur de la cellule, entraînant l'extraction de composés bioactifs (Takeuchi *et al.*, 2009, Chemat *et al.*, 2011). Cette technique a été largement utilisée pour l'extraction de matières nutritionnelles, telles que les lipides (Metherel *et al.*, 2009), les protéines (Zhu *et al.*, 2009), les composants aromatisants (Chen *et al.*, 2007; Da Porto *et al.*, 2009), huiles essentielles (Kimbaris *et al.*, 2006) et composés bioactifs, par exemple flavonoïdes (Ma *et al.*, 2008), caroténoïdes (Sun *et al.*, 2006; Yue *et al.*, 2006) et les polysaccharides (Iida *et al.*, 2008; Chen *et al.*, 2010; Wei *et al.*, 2010; Yan *et al.*, 2011).

Les avantages de l'extraction par ultrasons doux est un processus rapide à haut rendement. Par rapport aux méthodes d'extraction par solvant traditionnelles, l'extraction par ultrasons peut améliorer l'efficacité de l'extraction, le taux d'extraction, réduire la température d'extraction et augmenter les plages de sélection des solvants (Vilkhu *et al.*, 2008). Les ultrasons permettent la pénétration de solvants à de plus grandes profondeurs dans les matrices d'échantillons pour faciliter le transfert de masse accru des solutés au solvant d'extraction.

➤ Protocole expérimental de l'extraction par ultra-sons

L'extrait brut a été préparé à partir de 30 g de la drogue séchée qui sont macérés dans 600 ml de solvant pendant 3h à l'abri de la lumière. Le macérat a été ensuite centrifugé pendant 10min à une température de 20°C et sous une vitesse de 4000t/min. La solution obtenue a été filtrée sous-vide par des membranes de cellulose 589/3 de 9 cm de diamètre. Le filtrat récupéré a été vaporisé à une température de 40°C puis repris dans 5ml d'eau bidistillée. L'extrait obtenu est soumis dans un bain à ultrasons pendant 15 min à 40 °C puis lyophilisé et conservé dans des conditions adéquates dans des flacons conçus pour le stockage de ce genre de produits (Fig. 5). (Schnee *et al.*, 2013).

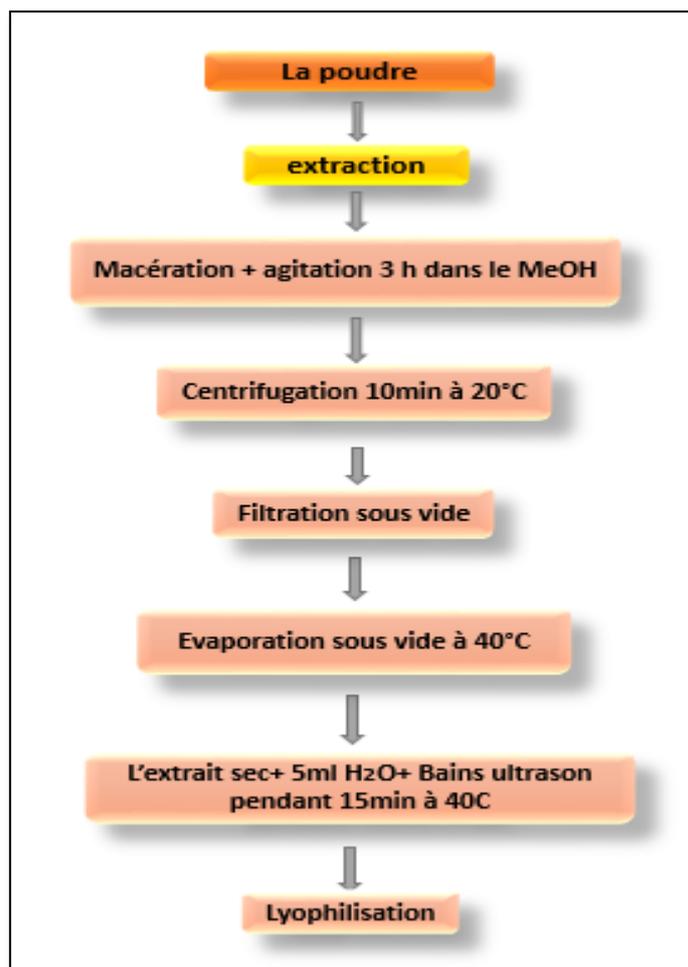


Fig. 5 : Schéma des différentes étapes d'extraction d'un extrait méthanolique par ultra-sons

1.2.4. Rendement des extraits secs de *Rosmarinus eriocalyx*

Les différentes extractions brutes de la partie foliaire de l'espèce nous ont permis de calculer le rendement qui a été déterminé en g de matière végétale sèche et exprimé en pourcentage selon la formule suivante : $\text{Rdt (\%)} = (\text{PEB} / \text{PMV}) \times 100$

Rdt (%) : rendement en %

PEB : poids de l'extrait brut

PMV : poids de matière végétale

1.3. Mise en évidence des composés du métabolisme secondaire

Le criblage chimique d'une plante est indispensable dans toute étude visant à déterminer les potentialités biologiques d'une espèce végétale. Pour cela, nous avons procédé à la mise en évidence des grands groupes et sous-groupes biochimiques des produits du métabolisme secondaire les plus importants. Les tests ont été réalisés selon des méthodes standardisées,

(Trease et Evans ,1987) pour les flavonoïdes, les stérols, les terpènes, les cardinolides et les tanins. La méthode de Brain et Turner (1975) pour les saponines et la méthode de Wome (1985) pour mettre en évidence les coumarines. La présence des quinones a été détectée par la technique de Ribérreau (1969), la méthode de Solfo (1973) a été utilisée pour les anthocyanes et les leuco-anthocyanes. Enfin les polyphénols ont été mis en évidence par N'Guessan (2009). Les détails de tous les protocoles expérimentaux en question sont mentionnés dans l'Annexe I.

1.4. Identification préliminaire par Chromatographie sur couche mince (CCM) des produits du métabolisme secondaire mis en évidence

La chromatographie sur couche mince est une technique analytique qualitative et très rapide simple à faible contrainte. Elle repose principalement sur des phénomènes d'adsorption. Son principe est de séparer les différents constituants d'un mélange complexe. La CCM a été uniquement effectuée pour la détermination des composés des deux extraits : Extrait méthanolique et extrait aqueux.

1.4.1. Mode opératoire

Des plaques du gel de silice (60 GF254) et (Rp C18) ont été utilisées pour déterminer la composition non exhaustive des extraits à étudier.

➤ La phase mobile

Lors d'une étude préliminaire, différents systèmes de migration (solvant ou éluant) ont été testés dans le but de trouver le système de séparation le plus performant pour les extraits à analyser. Les systèmes de migration adoptés sont mentionnés dans le **Tab. 2**. 10 mg de chaque extrait sont solubilisés dans 1ml de solvant adéquat (l'un dans du méthanol et l'autre dans l'eau distillée). 3µl de chaque extrait est déposé à l'aide d'un tube capillaire d'une manière perpendiculaire sur la ligne de dépôt. En chromatographie sur couche mince, les substances de faible polarité migrent plus rapidement que les composants polaires (Stahl, 1969). Une fois les plaques sont séchées, elles sont ensuite déposées délicatement dans la cuve de CCM préparée préalablement avec le système de migration choisi. Le rapport frontal ou Rf est déterminé par la division de la distance parcourue par le soluté (h) et la distance parcourue par le front du solvant (H).

Tab. 2 : Les systèmes de migration sélectionnés

Système de migration (phase mobile)	Les proportions
Toluène/MeOH	17/3/ (V/V)
Butanol/acide acétique/ H ₂ O (BAW)	4/3/3 (V/V/V)
Butanol/acide acétique/ H ₂ O (BAW)	6/1.5/3.5 (V/V/V)
MeOH/ H ₂ O	9.5/0,5 (V/V) phase inverse

➤ Observation et Révélation

Après migration, évaporation du mélange de solvant, et séparation des constituants, les spots ont été observés et révélés sous ultraviolets en utilisant deux longueurs d'onde de 254 nm et 366 nm. La confirmation de certaines familles de composés a été réalisée par ajout des réactifs, celui de la vanilline sulfurique et l'acide sulfurique.

1.5. Dosage des composés phénoliques

Parmi les composés mis en évidence, les polyphénols totaux qui constituent le groupe des métabolites secondaires le plus important ont été quantifiés. Parmi les constituants divers de ces polyphénols, les flavonoïdes, les tanins ont été également dosés. Les flavonoïdes et les tanins sont les deux classes les plus réputés puisqu'elles influent au niveau des différentes activités biologiques.

1.5.1. Dosage des polyphénols totaux

Ce dosage est basé sur la quantification de la concentration totale des composés à noyaux aromatiques portant un ou plusieurs groupements hydroxyles présents dans les extraits bruts des organes végétaux.

➤ Principe

La détermination de la teneur en polyphénols totaux est estimée par la méthode de Folin-Ciocalteu (**Singleton et al., 1999**) qui est basée sur la réduction en milieu alcalin du mélange de l'acide phosphotungstique (WO₄²⁻) et de l'acide phosphomolybdique (MoO₄²⁻) du réactif de Folin par les groupements oxydables des composés phénoliques, conduisant à la formation de produits de réduction de couleur bleue. Ces derniers présentent un maximum d'absorption à 760 nm dont l'intensité est proportionnelle à la quantité de polyphénols présents dans l'échantillon (**Georgé et al., 2005**)

➤ Protocole expérimental

0.2 ml des extraits a été ajouté à 0.8 ml de la solution de Na_2CO_3 à 7.5%. Après agitation, 1ml de la solution de Folin-Ciocalteu diluée au 1/10ème est additionné au mélange. Après 2h d'incubation à la température ambiante. L'absorbance est mesurée à 760 nm contre un témoin sans extrait. Les valeurs ont été déterminées à partir d'une courbe d'étalonnage, établie avec des concentrations précises de l'acide gallique (0-200mg/ml), comme standard de référence, dans les mêmes conditions que l'échantillon. Les résultats sont exprimés en milligramme d'équivalent d'acide gallique par gramme d'extrait (mg eq AG/g).

1.5.2. Dosage des flavonoïdes totaux

Les flavonoïdes sont une classe de métabolites secondaires de plantes et de champignons. Ils sont formés de deux noyaux aromatiques benzéniques en C6 séparés par une chaîne latérale en C3. Selon la nomenclature de l'IUICPA (Union Internationale de Chimie Pure et Appliquée), les flavonoïdes se divisent en plusieurs classes basées sur des dérivés de structure : flavanones, flavonones, flavanols, etc.

Les flavonoïdes sont largement distribués dans les plantes et remplissent de nombreuses fonctions. Ce sont notamment les pigments végétaux les plus importants réputés pour leurs activités antioxydantes et antimicrobiennes. Les flavonoïdes sont actuellement quantifiés selon des techniques analytiques : extraction/dérivatisation par spectrophotométrie et peuvent être analysés par GC-MS et HPLC.

➤ Principe

La méthode que nous avons utilisée est celle du trichlorure d'aluminium (Yi *et al.*, 2008). Elle a pour but de quantifier les flavonoïdes dans les extraits des espèces végétales. Elle repose sur la coloration jaunâtre qui est due à la formation d'un complexe entre le chlorure d'aluminium et les atomes d'oxygènes présents sur les carbones 4 et 5 des molécules flavonoidiques.

➤ Protocole expérimental

1ml de l'extrait est ajouté à 1ml de la solution d' AlCl_3 à 2%. Le mélange est vigoureusement agité. Après une incubation de 10 min, la densité optique est lue à une longueur d'onde de 415 nm. La concentration des flavonoïdes est déduite à partir d'une gamme d'étalonnage établie avec la quercétine (0-40 μ g/ml). La courbe d'étalonnage obtenue servira à la quantification des flavonoïdes qui sont exprimés en microgramme d'équivalent de quercétine par milligramme d'extrait (μ EqQ/g d'extrait).

1.5.3. Dosage des tannins totaux

Les tanins constituent une variété de polyphénols végétaux utilisés dans le tannage des peaux brutes pour produire du cuir. Les tanins sont largement répandus dans les plantes et sont présents en quantités particulièrement élevées dans l'écorce de certains arbres. Les tanins sont classés en tant que tanins condensés et hydrolysables. Les tanins condensés sont des polymères de flavanols et de flavan - 3-ol. Les tanins hydrolysables sont constitués d'acides galliques. Beaucoup de ces acides galliques sont liés aux molécules d'hexoses. L'acide gallique dans les plantes est synthétisé à partir de la voie de shikimate (**Heldt et Piechulla, 2011**).

➤ Principe

Les tanins condensés sont déterminés par la méthode de la vanilline en milieu acide décrite par **Hagerman (2002)**. La vanilline réagit avec les flavan 3-ols libre et les unités terminales des proanthocyanidines donnant une coloration rouge dont l'intensité est proportionnelle aux taux de polymères formant les tanins présents dans le milieu et qui présente un maximum d'absorption à 500nm de longueur d'onde.

➤ Protocole expérimental

Le réactif de vanilline a été préparé en mélangeant à volume égal, (2.5ml de la solution de vanilline à 1% et la solution du HCl à 8%). 1ml de l'échantillon est ajouté à 5ml du réactif d'analyse, puis vigoureusement agité. Après 1minute de repos, un volume de 5ml de la solution HCl à 4% est additionné. La densité optique est mesurée à une longueur d'onde de de 500 nm par un spectrophotomètre UV (Beckman Coulter Du 730) aussi bien pour la solution contenant l'extrait que pour la solution témoin sans extrait. Une courbe d'étalonnage est établie par la catéchine à partir d'une gamme de 6 concentrations de catéchine allant de 0à 0.3mg/ml a été préparée à partir de la solution mère à 0.3mg/ml pour servir à la quantification des tanins. La teneur est exprimée en milligramme d'équivalent de catéchine par g d'extrait (mg Eq C/g d'extrait).

1.6. Identification par UHPLC-DAD-ESI / MS (Ultra-High-Performance Liquid Chromatography Electrospray Ionization Mass Spectrometry with Diode Array Detection) des extraits de *Rosmarinus eriocalyx*

La séparation et l'identification des extraits aqueux et méthanolique ont été réalisés par **UHPLC-DAD-ESI / MS**. Une concentration de 10 mg / ml de EM et EA filtrée en utilisant une membrane de 0,2 ml (Whatman). Trois répétitions d'analyses ont été réalisées séparément pour la confirmation. Les analyses ont été réalisées à l'aide d'un Thermo Scientific Ultimate

Chapitre I : Etude phytochimique

3000RSLC (Dionex) équipé d'un détecteur à barrette de diodes Dionex UltiMate 3000 RS et couplé à un spectromètre de masse de marque. La colonne utilisée est une colonne thermo-scientifique en or et en hypersil (1000 mm x 20 mm) avec une taille de pièce de 1,9 μm à une température maintenue à 30°C.

La phase mobile (A) est constituée d'acétonitrile et la phase mobile (B) est à base de 0,1% d'acide formique (v / v) ; un dégazage et un filtrage sont faits avant utilisation. Le débit est de 0,2 ml / min. Un gradient de 5% pour le solvant B pendant 14 min suivi de 40% de solvant B pendant 2 min, de 100% sur 7 min et finalement de 5% sur 10 min avec un volume de 2 μl d'injection sont utilisés. Les données du spectre UV-vis sont collectées dans une gamme de 250 à 500 nm et les profils chromatographiques sont réalisés à 280 nm. Le spectromètre de masse utilisé est un piège à ions linéaire LTQ XL équipé d'une source d'ions à électro nébulisation orthogonale (ESI).

L'équipement fonctionne en mode ions négatifs avec une source d'ionisation par électro pulvérisation de 5,00 kV et une température de capillarité ESI de 275°C. Le balayage complet couvre une plage de masse de 50 à 2000 m/z. Les expériences MS / MS et MS_n de dissociation induite par collision sont acquises simultanément pour les ions précurseurs.

2. Résultats et discussion

2.1 Rendements des trois extraits, aqueux (EA), méthanolique (EM) et méthanolique soumis aux ultrasons (EMS).

Le calcul de pourcentage des rendements des trois extraits de *Rosmarinus eriocalyx* a révélé des valeurs respectives de 17,06% (EM), 17,66 (EA) et 18,8% (EMS). Cette légère hausse concernant l'EMS pourrait être due à l'effet des ultrasons employés lors de la sonication. Cette dernière a permis d'augmenter l'efficacité de l'extraction.

Tab. 3 : Les rendements (Rdt %) des trois extraits de *Rosmarinus eriocalyx*

Extrait	EM	EMS	EA
Le poids sec (g)	5,118±0,136	5,64±0,15	5,298±0,144
Rdt %	17,06±0,45	18,8±0,5	17,66±0,48

2.2. Mise en évidence des composés du métabolisme secondaire

La mise en évidence des composés du métabolisme secondaires consiste en un criblage qui permet de détecter la présence ou l'absence des différents groupes de composés chimiques existants dans la plante par les réactions qualitatives de caractérisation. Ces réactions sont basées sur des phénomènes de précipitation ou de coloration par des réactifs spécifiques.

Les résultats du criblage sont présentés dans le **Tab. 4**.

Les différentes réactions ont révélé l'abondance de sept grands groupes chimiques importants ; il s'agit du vaste groupe des polyphénols qui est constitué de plusieurs classes de métabolites secondaires. Parmi ces composés polyphénoliques, les flavonoïdes, les tanins, les coumarines. Tous ces composés font partie des polyphénols synthétisés par les espèces végétales et sont présents dans leurs organes à des taux plus ou moins importants. D'autres produits, ont été également détectés, les terpènes et les stérols qui font partie d'un autre grand groupe très important (terpènes ou isoprénoides) et les saponosides. Dans ce criblage chimique, les tanins catéchiques, les anthocyanes et les leuco-anthocyanes, les cardinolides et les alcaloïdes n'ont pas été détectés.

Tab. 4. Composés du métabolisme secondaire mis en évidence par le criblage phytochimique

Principes actifs	<i>Rosmarinus eriocalyx</i>
Polyphénols	+
Flavonoïdes	+
Tanins gallique	+
Tanins catéchique	-
Saponosides	+
Terpènes	+
Stérols	+
Les coumarines	+
Alcaloïdes	-
Les quinones	-
Les cardinolides	-
Les anthocyanes	-
Les leuco-anthocyanes	-

(+) : présence

(-) : absence

2.3. Identification préliminaire par Chromatographie sur couche mince (CCM) des produits du métabolisme secondaire mis en évidence

L'analyse chromatographique sur couche mince a démontré que les extraits bruts de *Rosmarinus eriocalyx* contiennent plusieurs molécules différentes (**Tab. 5**). Les différents systèmes de migrations sélectionnés nous ont permis chacun d'obtenir plusieurs spots. Le système d'élution (1) Toluène /MeOH, a détecté 12 spots qui correspondent à des composés chimiques de polarité différente ayant différentes couleurs (marron, bleu clair, mauve, jaune, violet et rose). Les rapports frontaux sont très variés et s'échelonnent entre la ligne de dépôt et 0,84 (**Tab. 5**).

Le système (2) BAW a donné une bonne séparation de l'extrait méthanolique (b) Nous avons pu détecter également 12 spots de coloration différente (jaune, bleu, mauve et rose). Plusieurs tâches portent la même couleur. La révélation par la vanilline sulfurique a permis de visualiser

Chapitre I : Etude phytochimique

plusieurs produits (b) de ce système, de couleurs proches que celles révélées sur la plaque du système précédent, mais dont la polarité est différente avec des rapports frontaux enregistrés de la ligne de dépôt à 0,97.

Le système (3) BAW a révélé l'apparition de huit spots uniquement. Ce système de séparation semble moins performant que le système précédent. Plusieurs couleurs sont apparentes avec cependant une tache plus grande de couleur jaune qui pourrait constituer le composé le plus abondant. Les rapports frontaux semblent avoir des valeurs plus ou moins similaires que celles retrouvées avec les autres systèmes.

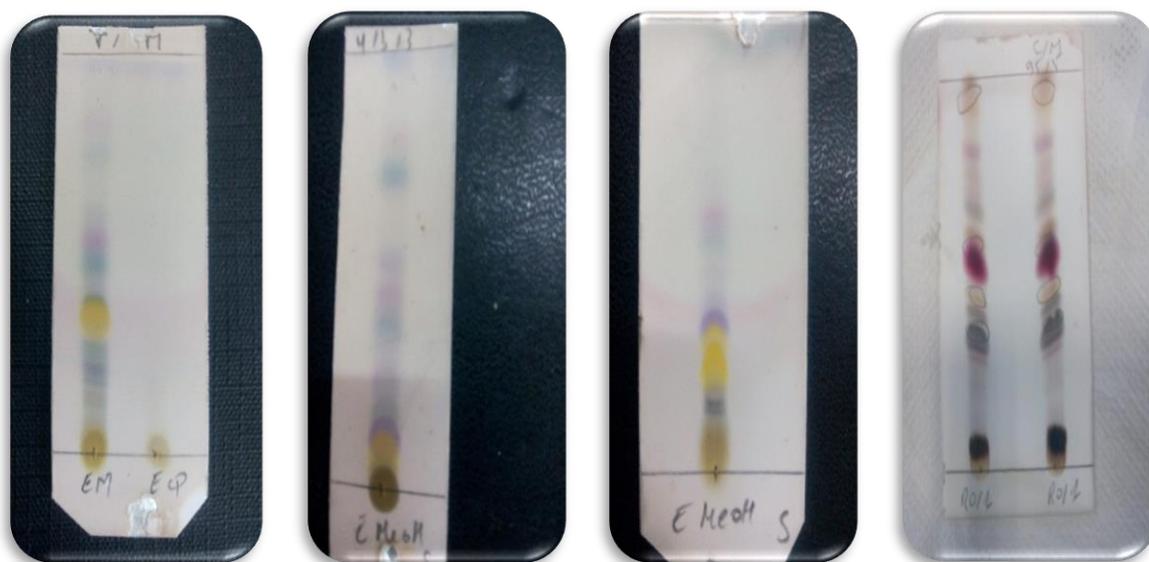
Le quatrième système utilisé est le MeOH/H₂O (la phase inverse) paraît le plus performant puisqu'il a mis en évidence un nombre de spot plus important. 13 spots sont visualisés avec cependant moins de variation dans la couleur. Après la pulvérisation de l'acide sulfurique et séchage à une température 200°C, les taches apparaissent en noir, marron, gris rouge ou rose clair. Les rapports frontaux calculés varient entre 0,08 et 0,98.

Remarque : Aucun des systèmes choisis n'a pu séparer, sur CCM, les constituants de la fraction aqueuse.

Chapitre I : Etude phytochimique

Tab. 5 : Les spots et les Rf calculés pour chaque système

Toluène/MeOH 7 : 3 (v/v)		BAW 4 : 3 : 3 (v/v/v)		BAW 6,5 :1,5 :1 (v/v/v)		MeOH/H ₂ O 95/5 (v/v)	
Spot	Rf	Spot	Rf	Spot	Rf	Spot	Rf
Marron	Ligne de dépôt	Marron	Ligne de dépôt	Marron	0,06	Noir	0,08
Marron clair	0,13	Jaune	0,07	Mauve	0,15	Mauve claire	0,3
Mauve claire	0,17	Orangé	0,13	Gris	0,18	Gris foncé	0,32
Mauve	0,2	Mauve fonce	0,16	Jaune foncé	0,29	Gris foncé	0,36
Bleu clair	0,26	Gris	0,19	Jaune clair	0,36	Rouge	0,51
Jaune	0,34	Mauve claire	0,26	Mauve	0,41	Mauve	0,57
Vert clair	0,4	Bleu clair	0,37	Bleu	0,58	Marron clair	0,62
Mauve	0,42	mauve	0,42	Rose	0,68	Mauve clair	0,66
Bleu clair	0,48	Mauve clair	0,51			Rose clair	0,79
Mauve rose	0,54	Bleu	0,72			Mauve	0,82
Bleu clair	0,77	Rose	0,8			Marron	0,93
Rose clair	0,84	Bleu clair	0,97			Mauve	0,96
						Marron clair	0,98



Plaque (a)

Plaque (b)

Plaque (c)

Plaque (d)

Fig. 6 : Les plaques CCM après révélations par les produits révélateurs.

2.4. Estimation quantitative des extraits de *Rosmarinus eriocalyx*

Tab. 6 : Evaluation quantitative des polyphénols totaux, flavonoïdes totaux et des tanins totaux dans l'EM et l'EA de *Rosmarinus eriocalyx*

Extrait	Polyphénols totaux (mg EAG/g)	Flavonoïdes totaux (mg EQ/g)	Tanins totaux (mgEC/g)
EM	21,65±1,08	6,17±1,06	0,67 ±0,08
EA	16,94±1,00	4,95±0,34	0,39±0,02

2.4.1. Dosage des polyphénols totaux

À partir de la courbe d'étalonnage de l'acide gallique (**Annexe 1**) les résultats obtenus (**Tab .6**) indiquent une forte teneur des polyphénols dans l'extrait méthanolique (EM) avec une valeur de 21.65 mg EAG/g par rapport à celle obtenue à partir de l'extrait aqueux (EA) qui n'est que de l'ordre de 16.94 mg. L'extrait aqueux contient une teneur diminuée par rapport à celle de l'extrait méthanolique.

2.4.2. Le dosage des flavonoïdes totaux

Les teneurs des flavonoïdes totaux qui ont été calculées à partir de la courbe d'étalonnage de la quercétine (**Annexe 1**) sont mentionnés dans le **Tab. 6**, elles indiquent une teneur non négligeable des flavonoïdes dans les deux extraits du romarin. L'EM a affiché une quantité de flavonoïdes de l'ordre de 6,17mg EQ/gE, supérieure à celle contenue dans l'EA qui est uniquement de l'ordre de 4,95 mg EQ/gE.

2.4.3. Le dosage des tanins totaux

Selon la courbe d'étalonnage (**Annexe 1**) de la catéchine, une quantité égale à 0.67 mg EC/g E a été calculée à partir de l'EM et une valeur de 0.39 mg EC/g a été déterminée dans l'EA. On remarque que la plante est moins riche en tanins si l'on compare les chiffres avec ceux des flavonoïdes (6,17 mg EC/g E, 4,95 mg EC/g E de flavonoïdes pour un poids de 5,118g détectés dans l'EM et 5,298g dans l'EA pour la même concentration) (**Tab. 6**).

2.5. Identification des composés de l'extrait de *Rosmarinus eriocalyx* par UHPLC-DAD-ESI / MS

Le criblage des extraits méthanolique et aqueux de *Rosmarinus eriocalyx* par UHPLC-DAD-ESI / MS a révélé un Chromatogramme UV enregistré à 305 nm (**Fig. 7, Fig. 8**), présentant des pics majeurs et plusieurs autres pics mineurs. Comme indiqué dans les **Tab.7 et Tab.8**.

Trente et dix-huit composés phénoliques individuels ont été identifiés dans l'EM et l'EA respectivement. Quatorze dérivés d'acide phénoliques et douze dérivés de flavonoïdes ont été caractérisés dans l'EM (voir **Tab.9 et 10**) et treize dérivés de flavonoïdes et deux dérivés d'acide phénoliques ont été détectés dans l'EA (voir **Tab.11 et 12**). Les acides phénoliques sont particulièrement les plus abondants dans l'extrait méthanolique. Selon les tableaux d'identification (**Tab.7 et Tab.8**), il s'agit de l'acide caféique ($[M-H]^-$ à m/z 179) et ses monodérivés, Acide 5-caffeoylquinique et l'acide Chlorogénique ($[M-H]^-$ à m/z 353), élué aux 2.56min, 4.25min et 5.35min respectivement avec les acides; Quinique, citrique ($[M-H]^-$ à m/z 191), Protocatechique ($[M-H]^-$ à m/z 153), l'acide Isochlorogénique A ($[M-H]^-$ à m/z 517), l'acide Coumarique -O-hexoside ($[M-H]^-$ à m/z 325) et acide sagerinique ($[M-H]^-$ à m/z 719→359), déterminés aux 1.38 min, 1.64 min, 2.75 min, 2.78 min, 4.41 min et 13.23 min. Ces composés ont été rencontrés seulement dans l'EM. L'acide Rosmarinique ($[M-H]^-$ à m/z 359) et son dérivé glucosé (acide Rosmarinique di-O-hexoside) détecté à 14.50 min et 10.88 min. L'acide Rosmarinique est le composé majeur de l'extrait méthanolique tandis qu'il est mineur dans l'extrait aqueux. Luteolin substituée sont rencontrées dans les deux extraits avec des temps de rétention de 11.08 min, 11.31 min, $[M-H]^-$ à m/z 461→285. Par contre la luteolin-3-O-glucuronide est le composé majeur dans l'EA avec un temps de rétention de 14.39min. Un autre isomère de la lutéolin (Luteolin-3-O-acetyl-O-glucuronide) a été identifié à un temps de rétention de 16.12 min. La Lutéoline et ses dérivés sont abondants dans l'extrait aqueux. Les autres flavonoïdes sont principalement des dérivés de quercétine ($[M-H]^-$ à m/z 477→301, 609→301), Apigénine ($[M-H]^-$ à m/z 431→281) Diosmétine ($[M-H]^-$ à m/z 431→299). Un acide gras a été détecté également dans l'EA, il s'agit de l'acide Trihydroxy-octadécanoïque. Ainsi, la variabilité dans la composition des extraits pourrait être due à la nature des solvants utilisés pour l'extraction.

Chapitre I : Etude phytochimique

Tab. 7 : Les composés identifiés dans l'extrait méthanolique de *Rosmarinus eriocalyx* par UHPLC-DAD-ESI / MS

RT (min)	[M-H] ⁻ (m/z)	Main fragment ESI MS ⁿ	Identification
1.38	191	MS ² [191] : 127, 173, 85,	Acide quinique
1.64	191	MS ² [191] : 111, 173	Acide citrique
2.03	359	MS ² [359] : 197, 179	Acide rosmarinique
2.56	353	MS ² [353] : 191, 179	Acide 5-cafféoylquinique
2.75	153	MS ² [153] : 109, 123,	Acide protocatéchique
2.78	517	MS ² [517] : 499, MS ³ :267	Acide isochlorogénique
3.02	475	MS ² [475] : 301, 357	Chrysoeriol-7-O-glycuronyl
3.63	431	MS ² [431] : 281, 251, 179, 279	Apigénine-7-O-glucoside
4.05	355	MS ² [355] : 311, MS ³ 293, 283	ND
4.25	353	MS ² [353] : 173, 179, 191	Acide Chlorogénique
4.41	325	MS ² [325] : 163	Acide Coumarique -O-hexoside
5.33	305	MS ² [305] : 225, 97	Gallocatechin
	179	MS ² [179] : 135	Acide caféique
6.3	387	MS ² [387] : 207, 163, 369 MS ³ 163, 145	Medioresinol
8.09	355	MS ² [355] :327, 337	6-formyl-isoophiopogonanone A
8.58	477	MS ² [477] : 301	Acide quercétinuronique
10.00	597	MS ² [579]: 459	Neoferiocitrin
10,49	555	MS ² [555] : 538,512, 392, 259, 193	Isoaloesin D
10.88	683	MS ² [683] : 521	Acide rosmarinique di-O- hexoside
11.08	461	MS ² [461] : 285, 179	Luteolin-3-O-glucuronide
11.31	461	MS ² [461] : 285,	Luteolin-3'-glucuronide
12.13	477	MS ² [477] :315, MS ³ :300, 153	Isorhamnetin-3-O-hexoside
12.53	571	MS ³ [571] : 553, 527, MS ³ :311, 169	NI
13.23	719	719 : 359, 539, 521	Acide Sagerinique
14.10	461	MS ² [461] : 299, 446	Diosmetin 7-O-hexose
14.25	461	MS ² [461] : 285	Luteolin-3'-glucuronide
14.50	359	MS ² [359] : 197, 179	Acide rosmarinique

Chapitre I : Etude phytochimique

Tab. 7 (suite) : Les composés identifiés dans l'extrait méthanolique de *Rosmarinus eriocalyx* par UHPLC-DAD-ESI / MS

16.99	637	MS ² [637] : 537, 538, 555, MS ³ :493, 255	NI
17.35	285	MS ² [285] : 267	Luteolin
17.69	503	MS ² [503] : 443, 285, 461, --MS ³ 285, 381	Luteolin 3'-O-(O-acetyl)-β-D-glucuronide Isomer II
18.04	727	MS ² [727] : 717, 718,627, MS ³ 519, 359	NI

NI : non identifié

Chapitre I : Etude phytochimique

Tab. 8 : Les composés identifiés dans l'extrait aqueux de *Rosmarinus eriocalyx* par UHPLC-DAD-ESI / MS.

RT (min)	[M-H] ⁻ (m/z)	Main fragment ESI ⁻ MS ⁿ	Identification
10.00	579	MS ² [579]: 459	Neoericiotrin
10,50	555	MS ² [555] : 538,512, 392, 259, 193	Isoaloesin D
10.87	683	MS ² [683] : 521	Acide rosmarinic di-O-hexoside
11.09	461	MS ² [461]: 285 , MS ³ :241	Luteolin-7- α -O-glucuronide
11.31	461	MS ² [461] : 285	Luteolin-3'-glucuronide
12.12	477	MS ² [477] :315, MS ³ :300, 153	Isorhamnetin-3-O-hexoside
12.54	571	MS ² [571] : 553, 527, MS ³ :311, 169	NI
13.75	579	MS ² [579] : 429, 449, MS ³ :329, 309	2'' -O-pentosyl-8-C-hexosyl-luteolin
14.07	609	MS ² [609] : 301	Quercetin dihexose
14.10	461	MS ² [461] : 299, 446	Diosmetin 7-O-hexose
14.39	461	MS ² [461] : 285	Luteolin-3'-glucuronide
14.59	359	MS ² [359] : 197 , 179	Acide rosmarinique
16.12	503	MS ² [503] : 285 , 443, 461	Luteolin-O-acetyl-O-hexose
16. 52	503	MS ² [503] : 399, 443, 461	Luteolin-O-acetyl-O-hexose (isomer)
17.71	503	MS ² [503]: 443, 461 MS ³ : 285	Luteolin-3O-acetyl-O-glucuronide
20.84	313	MS ² [313]: 298 MS ³ : 285	Dihydroxy-dimethoxyflavone
21.24	285	MS ² [285] : 267	Luteolin
21.94	329	MS ² [329] : 299	Trihydroxy-octadecanoic acid

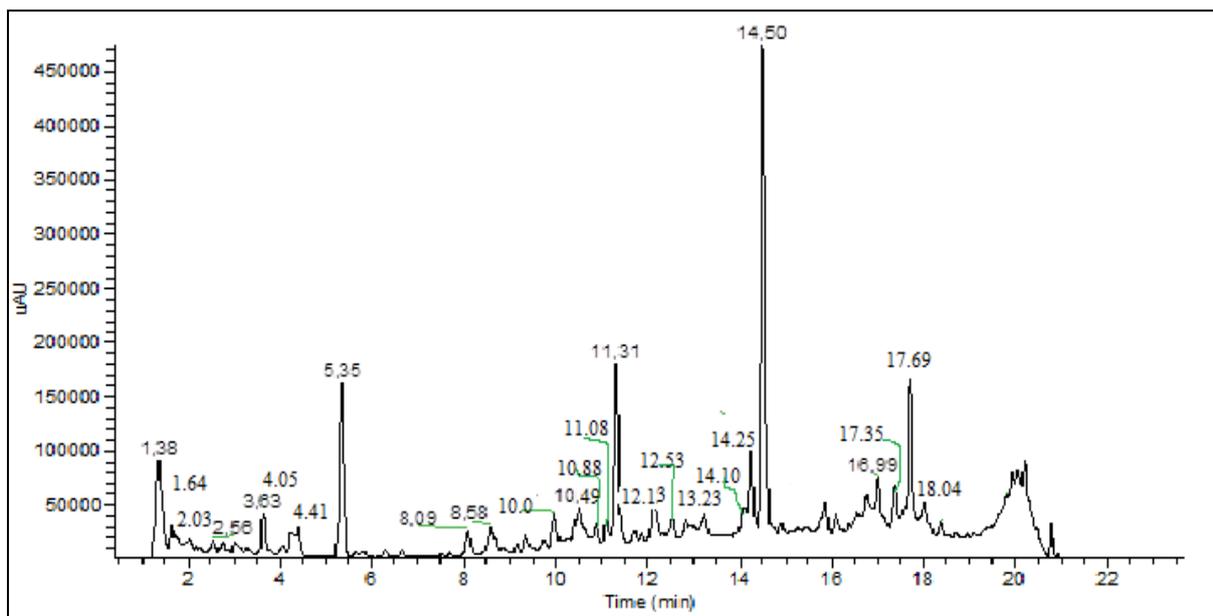


Fig. 7: Chromatogramme de l'extrait méthanolique de *Rosmarinus eriocalyx* par UHPLC-DAD-ESI / MS en mode d'ionisation négative

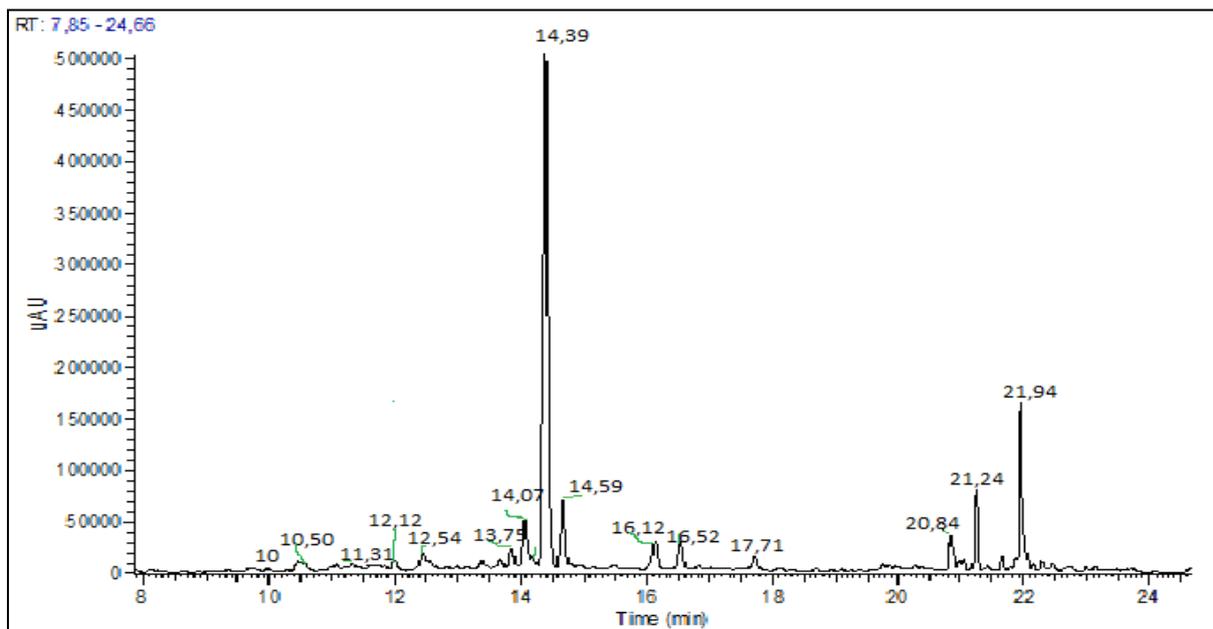
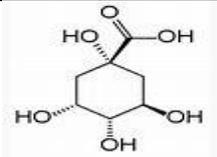
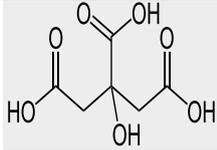
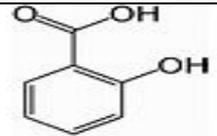
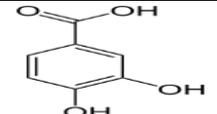
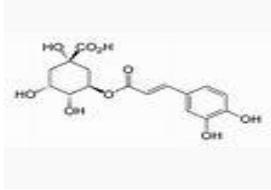
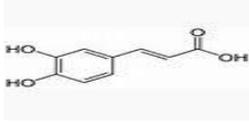
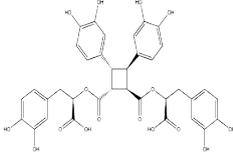
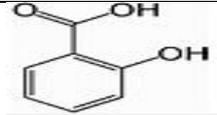


Fig. 8: Chromatogramme de l'extrait aqueux de *Rosmarinus eriocalyx* par UHPLC-DAD-ESI / MS en mode d'ionisation négative

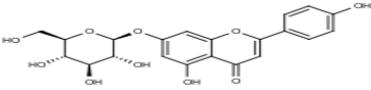
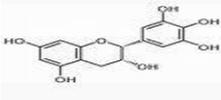
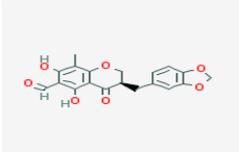
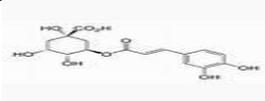
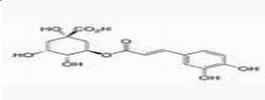
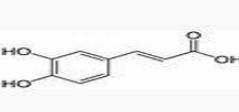
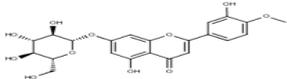
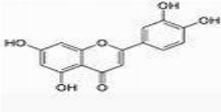
Chapitre I : Etude phytochimique

Tab. 9 : Caractérisation des acides phénoliques identifiés dans l'extrait méthanolique de *Rosmarinus eriocalyx*

L'acide phénolique	[M-H] (m/z)	Structure chimique
Acide quinique	191	
Acide citrique	191	
Acide rosmarinique	359	
Acide 5caffeoylquinique (isomère de l'acide chlorogénique)	353	
Acide protocatéchique (Isomère de l'acide dihydroxybenzoïque)	153	
acid A isochlorogénique	517	
acid chlorogénique	353	
Acide Coumarique -O-hexoside	325	
Acide caffeique	179	
Acide Quercetin uronique	477	
Isoaloesin D	555	
Acide rosmarinique di-O-hexoside	683	
Acide Sagerinique	719	
Acide rosmarinique (Dérivé)	359	

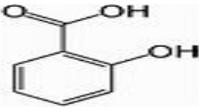
Chapitre I : Etude phytochimique

Tab. 10 : Caractérisation des flavonoïdes identifiés dans l'extrait méthanolique de *Rosmarinus eriocalyx*

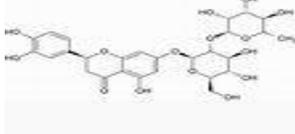
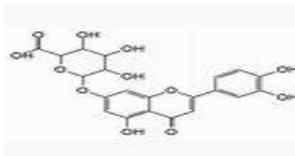
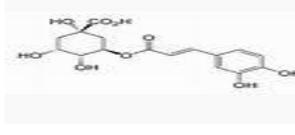
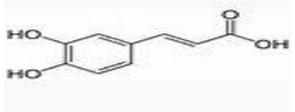
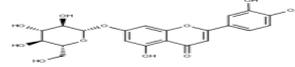
Flavonoïdes	[M-H] (m/z)	Structure chimique
Chrysoeriol-7-O-glycuronyl (flavone)	475	
Apigénine-7-O-glucoside (flavone)	431	
Gallocatechin (flavonol)	305	
6-formyl-isoophiopogonanone A (isoflavonoïde)	355	
Neoeriocitrin flavanone	597	
Luteolin-3-O-glucuronide	461	
Luteolin-3'-glucuronide	461	
Isorhamnetin-3-O-hexoside	477	
Diosmetin 7-O-hexose (flavone)	461	
Luteolin-3'-glucuronide	461	
Luteolin (flavone)	285	
Luteolin 3'-O-(O-acetyl)-β-D-glucuronide Isomer II	503	

Chapitre I : Etude phytochimique

Tab. 11 : Caractérisation des acides phénoliques identifiés dans l'extrait aqueux de *Rosmarinus eriocalyx*

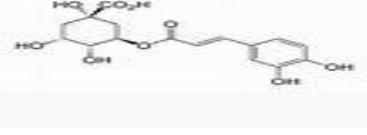
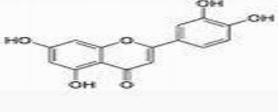
L'acide phénolique	[M-H] (m/z)	Structure chimique
Isoaloeresin D	555	
Acide rosmarinique di-O-hexoside	683	
Acide rosmarinique	359	

Tab. 12 : Caractérisation des flavonoïdes identifiés dans l'extrait aqueux de *Rosmarinus eriocalyx*

Flavonoïdes	[M-H] (m/z)	Structure chimique
Neeriocitrin standart flavanones	579	
Luteolin-7- <i>alpha</i> -O-glucuronide (flavone)	461	
Luteolin-3'-glucuronide (flavone)	461	
Isorhamnetin-3-O-hexoside	477	
2'' -O-pentosyl-8-C-hexosyl-luteolin	579	
Quercetin dihexose	609	
Diosmetin 7-O-hexose (flavone)	461	

Chapitre I : Etude phytochimique

Tab. 12 (suite) : Caractérisation des flavonoïdes identifiés dans l'extrait aqueux de *Rosmarinus eriocalyx*

Luteolin-3'-glucuronide	461	
Luteolin-O-acetyl-O-hexose	503	
Luteolin-O-acetyl-O-hexose	503	
Luteolin-3O-acetyl-O glucuronide	503	
Dihydroxy-dimethoxyflavone	313	
Luteolin (flavone)	285	

L'étude phytochimique de l'espèce *Rosmarinus eriocalyx* nous a permis d'avoir un aperçu global sur quelques-uns de ses composants chimiques et notamment les substances spécifiques du métabolisme secondaire. Tout d'abord, nous nous permettons d'avancer que cette espèce est riche en composés phénoliques et en particulier en flavonoïdes qui sont réputés dans les activités antioxydantes avec des teneurs assez importantes par rapport à celles des tanins qui sont de loin plus faible si l'on se réfère à des études antérieures.

Du point de vue rendement des extraits bruts, l'extrait méthanolique soniqué de notre plante a donné un rendement supérieur par rapport à l'extrait aqueux. Comme déjà signalé auparavant dans l'introduction, les travaux sur la même espèce ne sont pas nombreux ; parmi ceux-ci, nous tenons à signaler une étude entreprise par **Menacer (2011)** qui montre que l'extraction éthanolique et aqueuse à partir des feuilles a donné un meilleur résultat que celle des fleurs et des tiges. Une différence notable en termes de rendement en extrait éthanolique est observée dans ses échantillons (30.59%).

Nos résultats ne sont pas en parfaite concordance avec ceux qui ont été signalés récemment par **Bendif (2017)** qui signalent un rendement de l'extrait éthanolique des feuilles de *Rosmarinus eriocalyx* supérieur (19,6%) à celui de l'EA (14,46%). De même cet auteur confirme que les extraits éthanoliques issus des feuilles ont un rendement meilleur que celui des tiges et des fleurs de la même espèce. Le rendement de l'EMS est assez similaire à celui obtenu par

Bourgou et al. (2016). En outre, dans la même étude, l'auteur a constaté une amélioration du rendement en utilisant des extraits soumis à ultrasons

D'autre part le rendement dépend probablement de la nature et la polarité du solvant, le pH, la température, le temps d'extraction et la composition. (**Do et al., 2014 ; Azmir et al., 2013, Bendif, 2017**). Au contraire, selon **Hayouni et al. (2007)**, il semble que la variation entre les rendements obtenus par deux méthodes d'extraction différentes, dépend de la nature de la matière première utilisée et non pas du solvant choisi. Pour cela, le rendement de l'extraction reste instable au sein de la même espèce et dépend entre autres des facteurs chimiques, environnementaux et les techniques d'extraction employées (**Lee et al., 2003**).

Par ailleurs, Bien que cette espèce de *Rosmarinus* soit réputée pour ses activités biologiques, on dénote à partir du screening chimique, une absence totale des alcaloïdes dans tous les extraits. Ce qui nous laisse penser que les réactions et les techniques utilisées jusqu'à ce jour dans notre laboratoire en ce qui concerne le criblage phytochimique ne sont pas très fiables et ne permettent pas d'établir une liste exhaustive des composants contenus dans la drogue végétale (communication personnelle). Ceci a été d'ailleurs confirmé à plusieurs reprises par les identifications réalisées à l'aide de techniques de hautes performances (HPLC couplée, CPG couplée, LC-MS/MS, etc....).

Sur l'optique des résultats obtenus, on constate que la révélation par la vanilline sulfurique a donné des composés de coloration différentes avec des rapports frontaux variés ce qui explique qu'il existe une multitude de produits de nature chimique différente. Selon le **Tab. 4** et **Fig. 6**, on remarque l'abondance de spots de la couleur mauve, bleu et rose, respectivement. Selon **N'Guessan (2009)**, les colorations violette, rose et oranges révélés par la vanilline sulfurique correspondent aux terpènes. Les composés séparés de couleur mauve et bleue aux nombres respectifs de 10 et de 7 ont été détectés dans les trois premiers systèmes. Différents spots de couleur jaune ont été décelés par le système BAW avec des rapports frontaux de l'ordre 0,07, 0,29, 0,35, 0,36 respectivement. Ces produits pourraient être des flavonoïdes selon **Paris et Moysse (1971)** qui ont mentionné les spots séparés par le système BAW, dont les Rf sont inférieurs à 0.5. Alors que d'autre auteurs ont mentionné que les stéroïdes, monoterpènes peuvent avoir une coloration jaune à violette (**Matthews, 1963 ; Pieman et al., 1980**). D'autre part, les spots de couleurs grises font allusion soit à des acides gras soit à des flavonoïdes puisque certaines couleurs changent sur une période de 24 h, exceptionnellement plus de 48 h (polyoléfinés) selon **Pieman et al., 1980**.

Chapitre I : Etude phytochimique

Dans les quatre systèmes utilisés, on a eu des produits apolaires caractérisé par la couleur marron qui pourrait être de l'acide gallique (**Dehimat, 2014**). Par ailleurs le spot en rouge séparé par le système MeOH/ H₂O semble être la catéchine en se référant aux résultats de **Bouزيد (2009)**. Selon **Tvihak (1963)**. Les triterpènes et stéroïdes ont été révélés par de la vanilline sulfurique avec la vanilline sulfurique en formant des spots de couleur bleue, bleue violet et jaune. Ce résultat est en parfaite concordance avec celui de (**Waksmundzka-Hajnos et al., 2008**)

Si nous évoquons maintenant les rendements des polyphénols totaux issus des dosages, nous pouvons affirmer que nos résultats semblent interpréter des quantités non négligeables. Cependant, elles sont plus basses que celles obtenus dans d'autres travaux à partir de la même espèce végétale et nous faisons allusion ici, aux doses signalées par **Bendif (2017)** avec 57.96 mg EAG/g pour l'extrait éthanolique, 33,12mg EAG/g pour EA. Nos résultats ne concordent également pas avec ceux de **Menaceur (2014)** dont les valeurs enregistrées étaient de l'ordre de 221,4 mg EAG/g dans l'EM de *Rosmarinus eriocalyx*.

Cette divergence au niveau des quantités de polyphénols totaux dans les différentes études de (**Celiktas et al., 2007 ; Muchuweti et al., 2007 ; Bettaieb et al., 2012 ; Rezaire, 2012**) à partir d'une autre espèce, *Rosmarinus officinalis* expriment nettement l'effet de certains facteurs qui déterminent cette variation, comme la provenance du matériel végétal, le mode d'extraction, le solvant choisi (la période de la récolte, le stade végétatif ainsi que la nature du biotope de la plante. Pour notre part, et afin d'expliquer cette divergence dans les résultats, nous rejoignons l'hypothèse avancée par certains auteurs tels que (**Gomez-Caravaca et al., 2006 ; Vuorela, 2005 ; Djerridane et al., 2007 ; Harrare, 2012**). Selon ces derniers, cette variabilité au niveau des polyphénols semble être liée à la faible spécificité du réactif de Folin-Ciocalteu qui représente un inconvénient principal de ce type de dosage qui réside dans sa sensibilité à la réduction de tous les groupes d'hydroxyles des composés phénoliques et celles de certains sucres et protéines qui leurs sont associés.

En ce qui concerne les métabolites spécifiques quantifiés, les flavonoïdes et les tanins, les quantités enregistrées à partir de nos échantillons sont très différentes et ne sont pas en parfaite concordance par comparaison avec les travaux antérieurs de **Menaceur (2011)** et **Benbelaid (2016)** réalisées sur la même espèce. Les teneurs des flavonoïdes obtenues dans notre cas sont inférieures à celles de **Menacer (2011)** et de **Benbelaid (2016)**.

Chapitre I : Etude phytochimique

Les teneurs que nous avons déterminé pour les tanins sont également de loin inférieures des doses détectées par **Bettaieb et al., 2012** (1.37mgEC/g.). Là aussi, nous pourrions évoquer les conditions climatiques et environnementales du biotope de la plante car La distribution des métabolites secondaires pourrait changer pendant les différents stades de développement.

Les conditions climatiques du biotope de la plante entraînent une stimulation de la biosynthèse des métabolites secondaires (**Falleh et al., 2008**). Là aussi, comme pour les polyphénols, les techniques d'extraction, les facteurs expérimentaux in vitro, la température d'extraction, la nature du solvant, le pH, le mode de conservation de l'extrait, etc.... entrent en jeu et pourraient modifier les résultats

Conclusion

Dans cette partie phytochimique, les différents aspects chimiques des extraits de *Rosmarinus eriocalyx* ont été déterminés. Suite à l'analyse qualitative de l'EM et l'EA, nous avons pu mettre en évidence la présence des différents grands groupes de métabolites secondaires (polyphénols totaux, coumarines, flavonoïdes, tannins, terpènes coumarines, saponosides, stérols).

Les tests de caractérisation ont également décelé, une absence totale des anthocyanes, leuco-anthocyanes, alcaloïdes, cardenolides et quinones. Ceci a été confirmé par une étude chromatographique sur couche mince à partir de plusieurs systèmes d'éluant. Par ailleurs, l'analyse quantitative des composés polyphénoliques (Polyphénols totaux, flavonoïdes totaux, tanins totaux) effectuée spectrophotométrie a dévoilé que les extraits de notre plante *Rosmarinus eriocalyx* contiennent des teneurs relativement importantes en polyphénols totaux (EM=21,65 mgEAG/gE, EA=16,94 EAG/mE) et en flavonoïdes totaux (EM=6,17EA/gE, EA=4,95EQ/gE) cependant, les teneurs en tanins sont assez faibles (0.67 mg EC/g E, 039 mg EC/g E).

La composition de cette espèce végétale a été poursuivie et déterminée par une méthode d'identification de grande performance. Il s'agit d'une identification effectuée par UHPLC-DAD-ESI / MS. Ainsi, une multitude de composés constitutifs des deux extraits ont été évaluées. D'une manière globale, un nombre de trente biomolécules a été détecté dans l'EM avec une abondance des acides phénoliques en particulier, avec l'acide rosmarinique ($[M-H]^-$ à m/z 359) comme étant le produit majoritaire tandis que dix-huit composés ont été détectés dans l'EA avec une prédominance des flavonoïdes avec un pic majoritaire de la luteolin-3'-glucuronide ($[M-H]^-$ à m/z 461) et l'acide rosmarinique vient en deuxième position.

Chapitre I : Etude phytochimique

L'extrait brut méthanolique et l'extrait brut aqueux des feuilles possèdent des chémotypes différents. Ceci nous laisse affirmer que l'identification par UHPLC-DAD-ESI/MS fait ressortir l'intérêt de travailler à la fois sur l'extrait alcoolique et l'extrait aqueux qui semblent être souvent négligés par la plupart des chercheurs.

CHAPITRE II
ETUDE DE L'ACTIVITE
ANTIMICROBIENNE

Introduction

La découverte des antimicrobiens synthétiques et leurs utilisations généralisées au siècle dernier a entraîné un manque d'intérêt pour les plantes en tant que sources naturelles de médicaments d'agents antimicrobiens (**Cowan, 1999**). Cependant, la situation a changé ces dernières années et le dépistage systématique de l'interaction biologique entre microorganismes et produits végétaux a été reconnu comme une source précieuse de plusieurs composés, capables de contrôler la survie des microorganismes pathogènes (**Al-Fatimi et al., 2007**). Plus de 1300 espèces de plantes sont connues pour être des sources potentielles de composants antimicrobiens, mais seulement certaines d'entre elles ont été étudiées scientifiquement (**Wilkins et Board, 1989 ; Paster et al., 1990**).

La rareté des maladies chez les plantes sauvages s'explique par l'élaboration d'un système de défense naturelle, qui leur permet de lutter efficacement contre les pathogènes. Pour se protéger contre les bactéries, les champignons et les virus, les plantes synthétisent de manière constitutive ou induite une multitude de molécules antimicrobiennes (**Jones et Dangl, 2006 ; Gibbons, 2008**). L'originalité de ce système de défense réside dans l'exceptionnelle variabilité chimique des molécules produites (**Cowan, 1999 ; Gibbons, 2008**). Ces dernières constituent, de par la diversité des groupements structuraux et fonctionnels qu'elles arborent, un vaste réservoir de substances actives (**Guinoiseau, 2011**). Les métabolites secondaires ne participent pas directement à la croissance des plantes, mais jouent un rôle majeur dans les interactions de la plante avec son environnement, ils la protègent donc contre les attaques des champignons, des bactéries, d'insectes et des animaux. C'est dans ce groupe de métabolites que se sont retrouvées les molécules actives.

Les maladies antimicrobiennes entraînent chaque année, une perte importante de la production agricole mondiale qui ont un impact majeur sur la sécurité alimentaire. De nombreuses stratégies ont été développées pour tenter de minimiser les pertes causées par les agents phytopathogènes. Les approches traditionnelles sont basées sur la prévention des sources d'infection, la gestion des vecteurs, la modification des pratiques de culture, l'utilisation de variétés résistantes obtenues par la sélection classique, la protection croisée et le contrôle chimique. Bien que ces méthodes aient réussi dans certains cas, de nouvelles approches sont en effet nécessaires.

Actuellement, certains pesticides sont retirés du marché en raison de leurs effets indésirables sur l'environnement (**Soković et al., 2013**). La sensibilisation accrue du public aux effets

négatifs de la surexposition aux produits chimiques de synthèse a conduit à rechercher des « solutions vertes », telles que des produits alimentaires sans produits chimiques organiques et synthétiques (**Moreno et al., 2006**). La mise au point de nouvelles stratégies de lutte contre les maladies des plantes est particulièrement importante pour les agents pathogènes difficiles à maîtriser avec les méthodes existantes. L'exploitation de produits chimiques naturellement disponibles dans les végétaux, qui retarde la reproduction de microorganismes indésirables, constituerait une méthode plus réaliste et plus écologique pour la protection des végétaux et jouerait un rôle de premier plan dans la mise au point de futurs pesticides commerciaux pour des méthodes de protection des cultures (**Gottlieb et al., 2002**). Ainsi, la communauté scientifique s'est intéressée aux métabolites secondaires des plantes (**Soković et al., 2013**) comme alternatifs naturels aux pesticides conventionnels. Les chercheurs se sont de plus en plus engagés dans ce domaine en quête de nouveaux biopesticides.

Les biopesticides d'origine végétales les plus couramment utilisés pour la gestion des maladies des plantes sont plus particulièrement les huiles essentielles et les extraits bruts polyphénoliques. Ces deux types de produits à base de plantes présentent de nombreuses similitudes mais diffèrent également pour certaines caractéristiques. Les huiles essentielles sont des liquides huileux obtenus à partir de plantes par fermentation, enflourage et distillation à la vapeur (**Burt, 2004**), tandis que les extraits de plantes sont obtenus à partir de produits végétaux séchés par filtration et évaporation à l'aide de divers solvants (**Wang et al., 2004**).

Les principales substances étudiées à ce jour sont les phénols, les coumarines, les stilbènes, les flavonoïdes, les quinones, les terpènes, les tanins, les alcaloïdes, les saponines et les stérols (**Halama et Van Haluwin, 2004**). Ces produits peuvent avoir une activité fongicide ou bactéricide sur des agents phytopathogènes ou peuvent créer des conditions défavorables à l'établissement et à la multiplication de microorganismes pathogènes sur les plantes hôtes (**Scheuerell et Mahaffee, 2002**). Les espèces de certaines familles de plantes telles que les *Solanaceae* pour leurs teneurs élevées en alcaloïdes, les *Mimosaceae* pour leurs teneurs élevées en tanins et les *Lamiaceae* et *Meliaceae* pour leur grande diversité de terpénoïdes pourraient être de bons réservoirs en composés antimicrobiens et en principes actifs.

Un vaste corpus de recherches a démontré que les huiles essentielles et leurs composants principaux possèdent un large spectre d'activité biologique, qui peut revêtir d'une grande importance dans plusieurs domaines, de la chimie alimentaire, la pharmacie et l'agriculture (**Knowles et al., 2005 ; Cristani et al., 2007**). **Boulogne (2011)** a fait un recensement des

Chapitre II : Etude de l'activité antimicrobienne

différents produits détectés au niveau de nombreuses espèces végétales et a distingué qu'il existe 284 molécules présentant une activité antimicrobienne importante. L'auteur a signalé également que les trois types de groupes les plus souvent responsables de cette activité sont respectivement les composés phénoliques, les terpenoïdes et les alcaloïdes.

Il a été signalé par ailleurs, que l'huile essentielle du genre *Rosmarinus* figure parmi les composés les plus actifs contre un certain nombre de microorganismes responsables de la détérioration des aliments et des agents pathogènes (**Mangena et Muyima, 1999**). L'activité antimicrobienne de *Rosmarinus* a été également démontrée par de nombreux auteurs tels que **Abutbul et al., 2004** et **Celiktas et al., 2007**. L'effet antimicrobien de l'huile essentielle chez l'espèce *Rosmarinus officinalis* L. a été largement rapporté, bien que les informations sur l'extrait non volatile soient rares (**Santoyo et al., 2005**). Il est clair que les extraits de romarin ont des propriétés bioactives selon l'utilisation traditionnelle et les preuves scientifiques, mais leurs activités antimicrobiennes n'ont pas été bien caractérisées (**Moreno et al., 2006**).

Les activités antimicrobiennes de différents extraits de plantes contre les maladies cryptogamiques et bactériennes ont également été signalées par plusieurs chercheurs (**Meshra et Tewari, 1990 ; Ali et al., 1992 ; Akhtar et al., 1997 ; Suberu, 2004**). A titre d'exemple les activités antifongiques des extraits d'*Allium cepa*, d'*Eucalyptus rostrata* et de *Capsicum frutescens* *Datura stramonium* ont été observées contre la germination des spores et la croissance végétative d'*Alternaria solani* et de *Saprolegnia parasitica*, *Fusarium solani*, (**Khalil, 2001 ; Rawal et Thakore, 2003**). D'autres travaux ont démontré les effets positifs des composés foliaires volatiles contre certains champignons des produits alimentaires pendant leur stockage (**Holley et Patel, 2005 ; Tripathi et Dubey, 2008**). Par ailleurs, l'huile de gaulthérie (*Gaultheria procumbens*) associée à d'autres d'huiles essentielles foliaires stoppe de manière significative la production d'aflatoxine B par *Aspergillus flavus* (**Sahayarani, 2003**).

1. Matériel et méthodes

1.1 Pesticides naturels (extraits végétaux)

Les pesticides naturels utilisés dans cette étude sont des biopesticides à base d'extraits bruts obtenus à partir des feuilles de l'espèce étudiée, *Rosmarinus eriocalyx*. Les méthodes de préparation de ces extraits (EA, EM, EMS) ont été décrites dans le chapitre précédent (chapitre I)

1.2. Pesticides conventionnels

L'Hyméxazole est un fongicide systémique pour le sol et les semences, de la Famille des triazines et la sous Famille des isoxazoles, commercialisé sous plusieurs appellations, en Algérie il est connu sous le nom de Tachigazol. Ce fongicide est utilisé pour contrôler les maladies fongiques et bactériennes sur une large gamme de cultures (*Tomate, Pomme de terre*). La substance active est l'Hyméxazole. Son mode d'action inclut l'inhibition de la biosynthèse des acides nucléiques, les acides aminés et les lipides, modification de la perméabilité cellulaire et stimulateur de défense. Tachigazole a un effet stimulant sur les racines qui augmente la tolérance des racines pour les températures.

- **Sa formule brute** est : 5-methyl-3(2H) -isoxazolone
- **Sa structure chimique** est :

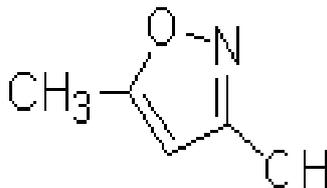


Fig. 9 : Structure chimique de l'Hymexazole

1.3. Isolement des souches fongiques et bactériennes

Le matériel microbiologique est constitué de champignons et de bactéries isolés soit du sol soit à partir des organes de plants contaminés. Les prélèvements des échantillons ont été effectués à partir de plusieurs parcelles agricoles (Dréan, Guelma et Skikda). Les échantillons de sol et des plantes ont été prélevés sur toutes les parcelles cultivées des sites étudiées.

1.3.1. A partir du sol

Les échantillons de sol ont été préalablement séchés, broyés et tamisés. 1g du broyat sont transférés dans 9 ml d'eau distillée stérile contenue dans un Erlenmeyer. Le mélange est ensuite mis en agitation pendant 30 minutes pour obtenir une bonne dilacération des particules. Une série de dilution au 1/10^{ème} (10^{-1} à 10^{-5}) est réalisée à partir de la solution mère (1g de sol tamisé et séché est mis en solution dans 10ml d'eau distillée stérilisée). La solution est ensuite homogénéisée par agitation au vortex pendant quelques minutes. **(Rapilly, 1968)**. Une goutte de 100µl de chaque dilution est étalée sur les milieux de culture stériles : extrait de Malt-Agar, (MEA), Pomme de terre-Dextrose-Agar (PDA), Mueller-Hinton (MH), Yeast Extract ou Extrait de Levure (EL) ; le milieu à base d'extrait de levure utilisé est un milieu amélioré supplémenté de saccharose.

Les boîtesensemencées sont incubées à 37 °C. Les lectures sont faites après 5 à 7 jours pour les champignons et 2 jours pour les bactéries. Trois répétitions sont utilisées pour chaque cas. Pour l'isolement des champignons, le milieu est supplémenté d'un antibactérien (Chloramphénicol) pour les bactéries, le milieu est supplémenté d'un antifongique (Fluconazole). Après incubation de plusieurs jours, Les colonies obtenues sont purifiées et identifiées macroscopiquement et microscopiquement en se basant sur la couleur, l'aspect, le diamètre et la hauteur des colonies ainsi que leur bordure sont des caractères considérés pour la description macroscopique **(Fig. 10)**

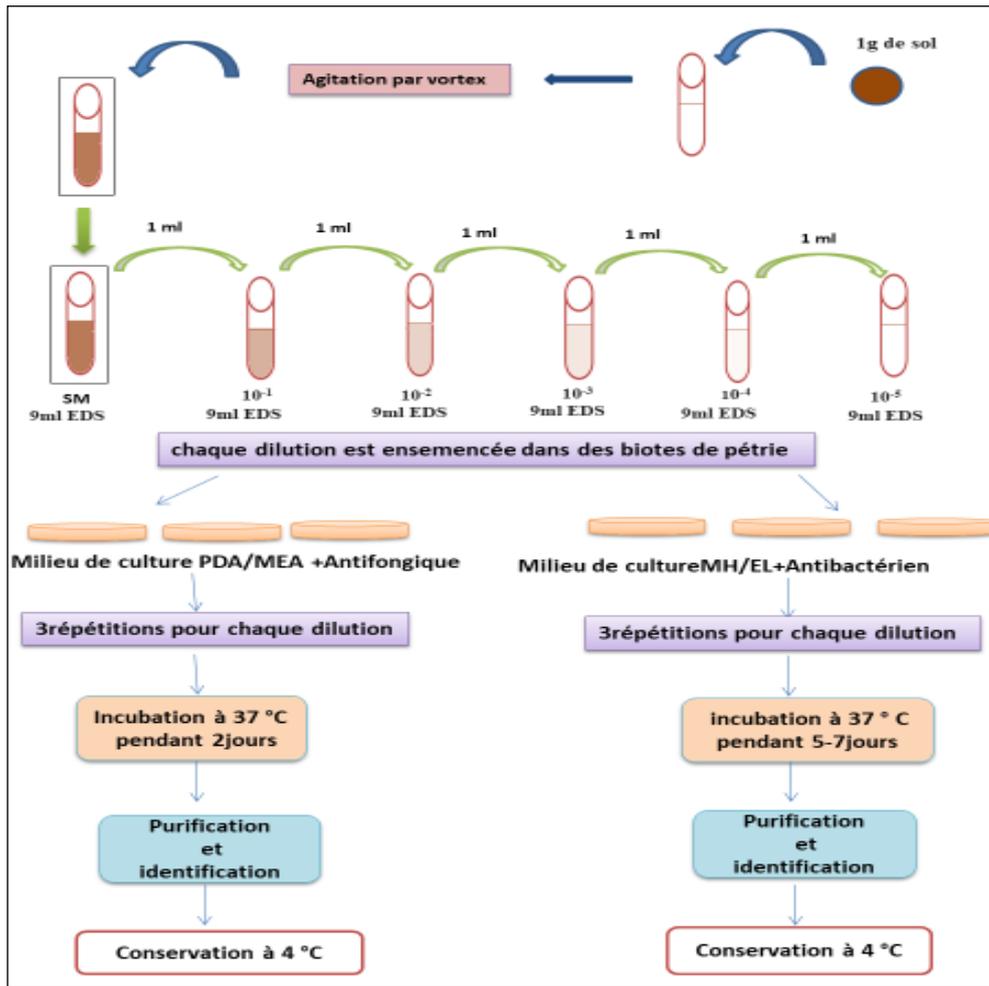


Fig. 10 : Les différentes étapes d'isolement des bactéries et des champignons à partir des sols agricoles

1.3.2. Isolement des souches fongiques et bactériennes à partir des cultures infectées

Pour l'isolement des souches microbiennes, nous avons choisi des plants prélevés à partir des parcelles agricoles contaminées par plusieurs maladies portant des symptômes visibles et/ou non visibles. Les microorganismes contaminant les cultures peuvent être exogènes ou endogène à l'intérieur des cellules. Pour cela deux modes de détection (lavage et broyage) ont fait l'objet de ces isolements à partir des feuilles de tomate infectées (**Fig. 11**)

1.3.2.1. Isolement par lavage

Le lavage permet d'isoler la microflore de surface. Les feuilles prélevées sont soumises à un lavage rapide après être débarrassée de souillures superficielles, puis elles ont été mises dans des flacons stériles contenant de l'eau distillée stérile. Après macération et agitation continue

Chapitre II : Etude de l'activité antimicrobienne

de 24 heures, l'eau est récupérée et une gamme de dilutions décimales (au 1/10^{ème}) est réalisée à partir d'1ml de la solution mère.

1.3.2.2. Isolement par broyage

Les feuilles sont broyées délicatement à l'aide d'un mini hachoir préalablement désinfecté de toute trace de germes. 1ml du broyat obtenu constituant la solution mère a subi une gamme de dilutions au 1/10^{ème}

1.3.3. Ensemencement

La technique employée 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 contenant les dilutions, une goutte de 100µl est déposée sur une boîte de Pétri contenant un milieu nutritif gélosé stérile de PDA, MEA, extrait de levure (EL) et Mueller Hinton (MH) additionnées d'antibactérien ou d'antifongique. Les gouttes 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. L'expérimentation est réalisée en triplicata. Les boîtes ainsi ensemencées sont déposées à l'étuve pour incubation à la température de 37°C, Les lectures sont réalisées après 2jours pour les bactéries et 5 à 7 jours pour les champignons.

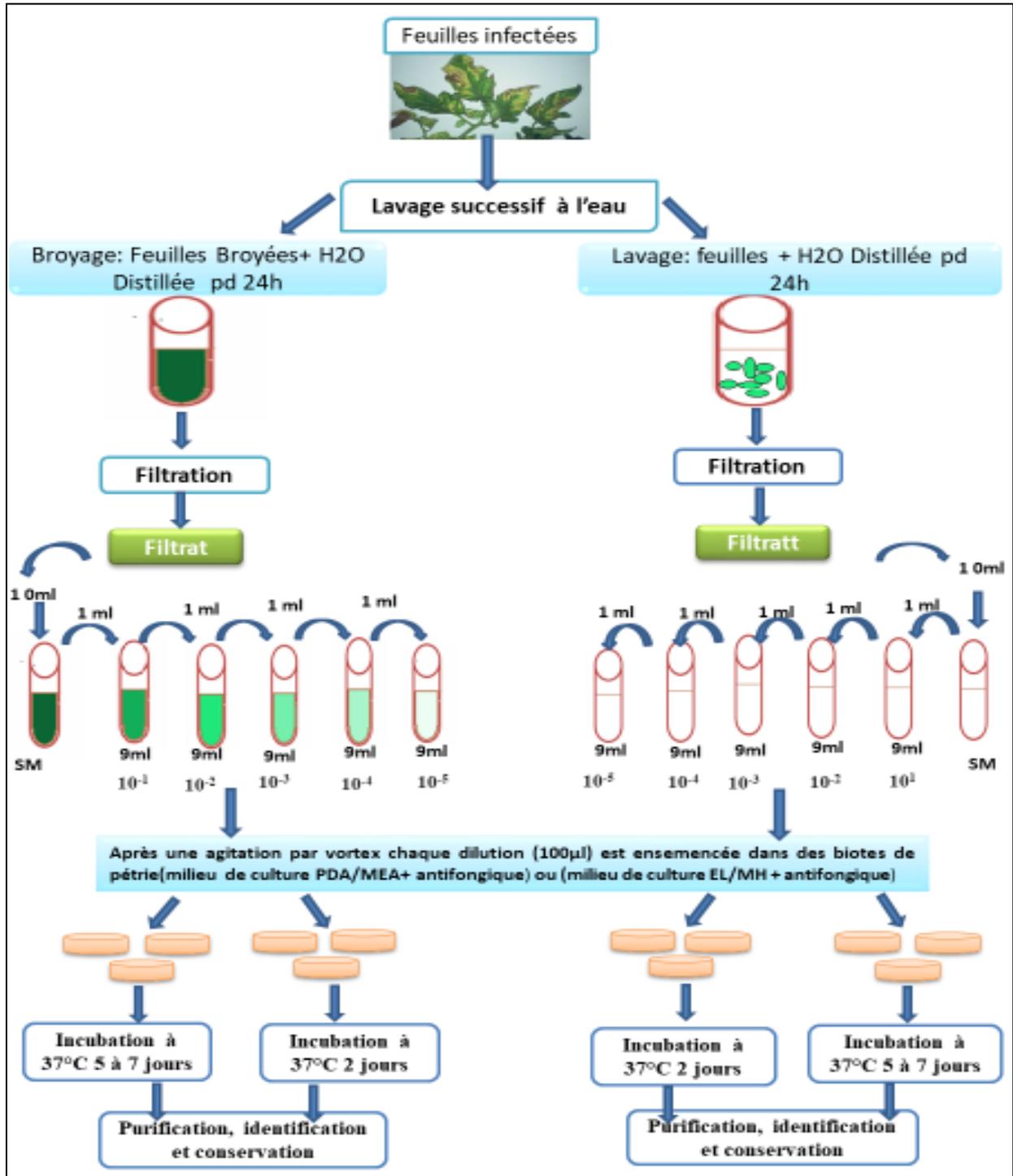


Fig. 11 : Schéma d'isolement des souches microbiennes à partir des feuilles infectées

1.3.4. Comptage et expression des résultats

La détermination de la charge microbienne est faite par comptage des colonies et les résultats sont exprimés en UFC (nombre d'Unités Formant Colonies) / ml d'eau selon la formule mathématique ci-dessous. Seules les boîtes contenant entre 15 et 150 colonies au niveau de deux dilutions successives sont retenues pour le dénombrement (**Dutruc-Rosset, 2003**).

$$N = \sum \text{colonies} / V_{\text{ml}} \times (n_1 \times 0,1n_2) \times d_1$$

N : Nombre d'UFC par volume d'eau ; $\sum \text{colonies}$: somme des colonies des boîtes interprétables ; **V** : Volume de solution déposée (1ml) ; **n1** : Nombre de boîtes considéré à la première dilution retenue ; **n2** : Nombre de boîtes considéré à la seconde dilution retenue ; **d1** : Facteur de la première dilution retenue

1.3.5. Purification et conservation des isolats

La purification des isolats bactériens est une étape indispensable qui joue un rôle crucial dans la détermination des agents pathogènes. En effet, chaque boîte d'isolement peut contenir un nombre important de germes provenant soit des échantillons soit de contaminations lors de l'isolement.

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 le milieu de culture PDA, et extrait de levure. Chaque isolat purifié est désigné par un numéro de code. La conservation se fait à une température de 4°C à partir de disques de gélose prélevés sur le pourtour de la culture purifiée puis transférés dans des tubes Eppendorf stériles de 1,5 ml, contenant du glycérol à 50% (**Kebe et al., 2009**).

1.3.6. Identification des isolats fongiques

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 (**Botton et al., 1990**)

1.3.6.1. Examen macroscopique

L'examen s'effectue à l'œil nu et avec la loupe binoculaire en vérifiant les colonies 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.

1.3.6.2. 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 ($\times 100$) (**Botton *et al.*, 1990**).

Les lames préparées en vue de l'identification sont conservées en appliquant 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. Les souches isolées ont été identifiées en se basant sur des clés de détermination complètes à partir des caractères culturels et morphologiques (**Botton *et al.*, 1990 ; Domch *et al.*, 1980 ; Kirk *et al.*, 2008 ; Tabuc, 2007 ; Wanatabe, 2002 ; Mueller *et Schmit*, 2007**).

1.3.7. Identification des isolats bactériens

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.

1.3.7.1. Observation macroscopique

L'examen macroscopique des colonies bactériennes se fait comme pour les colonies des champignons d'abord à l'œil nu. 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. Tous ces éléments rassemblés aboutissent à déterminer plusieurs sortes de colonies différentes du point de vue morphologique (Colonies lisse ou S, Rugueuse ou R, Muqueuse ou M avec toutes les intermédiaires)

1.3.7.2. Observation microscopique

➤ **Préparation du frottis à l'état frais**

Un test préliminaire à réaliser dans toute identification bactérienne, il s'agit de l'observation microscopique de la colonie 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 (**Marchal et Bourdon, 1982**)

1.3.7.3. Coloration de Gram

Ce test est également indispensable dans les étapes d'identification de tout type de bactérie. 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**). 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 (même ouvrage que précédemment)

1.3.7.4. Test de l'oxydase

Ce test est également de grande importance, il a pour but, en effet 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). si la bactérie contient une oxydase, elle prend une coloration rose à violette lorsqu'elle est mise en contact avec le réactif ; elle reste incolore si elle n'a pas d'oxydase.

1.3.7.5. Test de la catalase

Pendant leur respiration aérobie certaines bactéries produisent du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) 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 : $2H_2O_2 \rightarrow 2H_2O + O_2$. 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**).

1.3.7.6. 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 (**Tab. 13**).

Chapitre II : Etude de l'activité antimicrobienne

Tab. 13. lecture des tests des galeries API 20 E

Caractère	Substrat	Enzyme	Produit(s) formé(s)	indicateur	Réactif(s) ajouté(s)	Lecture +	Lecture -
ONPG	ONPG	ONPG-hydrolase β-galactosidase	ONP (jaune) galactose	/	/	Jaune	Incolore (1)
ADH	Arginine	Arginine Dihydrolase (ADH)	Ornithine NH ₃ CO ₂	RP	/	Rouge - orange	Jaune (2)
LDC	Lysine	Lysine Décarboxylase (LDC)	Cadavérine CO ₂	RP	/	Rouge - orange	Jaune (2)
ODC	Ornithine	Ornithine Décarboxylase (ODC)	Putrécine CO ₂	RP	/	Rouge - orange	Jaune (2)
CIT	Citrate	/	CO ₂ H ₂ O	BBT	/	Bleu	Vert (3)
H ₂ S	S ₂ O ₃ ²⁻	(Thiosulfate Réductase)	S ²⁻ (H ₂ S)	Fer III	/	Noir	Incolore (jaune pâle)
URE	Urée	Uréase	NH ₄ ⁺ (HCO ₃)	RP	/	Rouge	Jaune
TDA	Tryptophane	Tryptophane Désaminase (TDA)	Acide indole pyruvique NH ₃	/	TDA / immédiat (Fer III)	Marron Brun	Jaune
IND	Tryptophane	Tryptophanase	Indole A. pyruvique NH ₃	/	James / immédiat ou Kovacs / 2min	Rouge	Incolore Jaune
VP	Pyruvate	/	Acétoïne	/	VP1 (KOH) + VP2 (α-naphtol) / 10min	Rouge	Incolore (5)
GEL	Gélatine	Gélatinase	Acides Aminés	/	/	Noir	Incolore (+particules intactes)
GLU	Glucose	/	Acides	BBT	/	Jaune	Bleu ou bleu-vert (4)
SUCRES (AUXAN.)	Man, Ino, Sor, Rha, Sac, Mel, Amy, Ara	/	Acides	BBT	/	Jaune	Bleu ou bleu vert (4)
NO ₂ /N ₂	NO ₃ ⁻ (cupule GLU)	Nitrate Réductase	NO ₂ ⁻ N ₂	/	Nit1 + Nit2 / 2min (Zinc)	Rouge Incolore	Incolore Rouge

(1) une très légère couleur jaune est positive

(2) une couleur orange après 48H D'INCUBATION doit être considérée comme négative

(3) le résultat se lit dans la cupule (zone aérobie)

(4) la fermentation commence dans la partie inférieure des tubes et l'oxydation dans la cupule

(5) une légère coloration rose après 10 minutes doit être considérée comme négative

1.3.7.7. 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

Chapitre II : Etude de l'activité antimicrobienne

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 (**Tab. 14**)

Tab. 14. lecture des tests des galeries API 20 NE.

TESTS	COMPOSANTS ACTIFS	QTE (mg/cup.)	REACTIONS/ENZYMES	RESULTATS	
				NEGATIF	POSITIF
NO ₃	potassium nitrate	0,136	réduction des Nitrates en nitrites	incoloré	rose-rouge
			réduction des Nitrates en azote	rose	incoloré
TRP	L-tryptophane	0,2	formation d'indole (TRyptophane)	JAMES / immédiat	
				incoloré vert pâle / jaune	rose
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 du pigment	diffusion du pigment noir
PNPG	4-nitrophényl- β D-galactopyranoside	0,22	β -galactosidase (Para-NitroPhényl- β D-Galactopyranosidase)	incoloré	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	0,76	assimilation (acide CAPrique)	transparence	trouble
[ADI]	acide adipique	1,12	assimilation (acide ADIrique)	transparence	trouble
[MLT]	acide malique	1,56	assimilation (MaLaTe)	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)	

1.3.7.8. Test de pathogénéicité sur feuilles de tabac (*Nicotiana tabaccum*)

Le test d'hypersensibilité sur tabac est un test d'identification des souches de *Pseudomonas* et qui détermine la pathogénéité de la souche. Il s'agit de préparer un inoculum de l'ordre de 10^8 bactéries/ml qui correspond à 0.5 Mc-Farland et l'injecter au niveau de la face inférieure de la plante de tabac (*Nicotiana tabaccum*). Si la souche est pathogène, elle provoque une réaction d'hypersensibilité au niveau de la feuille (coloration brune due à un dessèchement des tissus) (Bordjiba-Haddad, 1988).



Fig. 12 : test de d'hypersensibilité sur *Nicotiana tabaccum*

1.4. Etude *in vitro* de l'activité antimicrobienne des extraits de *Rosmarinus eriocalyx*

1.4.1. Méthode de diffusion en milieu solide

Des disques stériles sont imprégnés de 20 μ l des dilutions (SM, 1/2 à 1/4) de l'extrait brut méthanolique (EM) et aqueux (EA) sont préparées à partir d'une solution mère (SM) de concentration (50mg/ml diluée dans le diméthylsulfoxyde (DMSO)). Les disques imprégnés sont déposés sur le milieu de culture MEA ou PDA pour les champignons et MH (Mueller-Hinton) pour les bactéries préalablementensemencées par la suspension fongique/bactérienne utilisée à la concentration de 10^5 spores/ml et de 10^8 UFC/ml par la suspension bactérienne.

Chapitre II : Etude de l'activité antimicrobienne

Parallèlement, des disques imprégnés de pesticide synthétique (l'Hymexazole) utilisés de la concentration de champ ont été également placés dans les boîtes. Des disques servant de témoins imbibés de DMSO et d'eau stérile ont été inclus dans l'expérimentation. Les boîtes de pétri sont ensuite incubées à la température de 27°C. Après incubation de 48h, si la molécule est toxique pour l'espèce microbienne, il se forme une zone ou un halo autour du disque. Cette zone évalue l'inhibition et l'efficacité du produit testé.

1.4.2. Technique de l'incorporation de l'extrait dans le milieu de culture

Cette méthode consiste à ajouter le pesticide naturel composé de l'extrait de la plante ou le pesticide de synthèse aux milieux de culture après stérilisation. 20 mg de chaque extrait est alors incorporé à 20 ml de milieu culture stérile (une concentration finale de 1mg/ml). Pour ce qui est du fongicide synthétique (Hymexazole), comme précédemment, la dose de champ a été utilisée (20µl/20ml). Le mélange est immédiatement reparti dans les boîtes de pétri qui sontensemencées par le champignon à l'aide de disque gélosé prélevée aseptiquement à l'aide d'un emporte-pièce de 5mm de diamètre et d'autres boîtes sontensemencées de 100µl de la suspension bactérienne.

Après solidification par la souche fongique jeune de 48h ; Les boîtes témoins sans extraits et sans pesticidesensemencées par la souche fongique sous forme de disque gélosé sont inclus dans les essais. Après incubation à une température de 27°C, les lectures sont faites après 1 à 5 jours ; les résultats de la croissance sont exprimés par (+) croissance ou de (-) qui signifie inhibition de la croissance pour les bactéries et en pourcentage concernant les champignons.

Le taux d'inhibition en pourcentage (T%) des souches fongiques par la méthode de (**Tian *et al.*, 2011**) avec modifications selon l'équation suivante.

$$T (\%) = [(dT - dt) / dT] \times 100$$

dT= diamètre de la colonie témoin sans traitement,

dt : diamètre de la colonie traité (extrait ou pesticide)

1.4.3. Evaluation de l'effet fongistatique ou fongicide/ bactériostatique ou bactéricide par la détermination des CMI, CMF, CMB

L'effet fongistatique/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/48h de culture à 37°C (**Hadacek et Greger, 2000 ; Cannilac et Mourey, 2001**). Tandis que l'effet fongicide/bactéricide d'une substance est évalué par la valeur de la CMF/CMB 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 (**Rees et al., 1995**). Les produits fongistatiques (antibiotiques ou autres) possèdent des CMF/CMB éloignées des CMI. Les CMF/CMB peuvent être 32 fois supérieures au CMI. (**Eucast, 2003**)

La **CMI, CMF et CMB** ont été déterminées selon (**Bolou et al., 2011**) avec quelques modifications. L'inoculum de chaque souche est obtenu après une préculture de 24h pour les bactéries et 7jours pour les champignons. L'inoculum est ajusté par dénombrement des cellules viables sur cellule de Thomas pour avoir une concentration cellulaire finale de 10^5 cellules/ml pour les champignons et de 10^8 cellules/ml. La gamme de concentration de chaque extrait subit une dilution de moitié. Les concentrations finales allant de 1mg/ml à 0,0032mg/ml. Des tubes contenant de milieu d'extrait de levure stérile, inoculés de 0.1ml de la suspension microbienne et 100µl de chaque concentration.

Quant au pesticide de synthèse, il est ajouté aux tubes de à la concentration (20µ/20ml de milieu). Des témoins positifs sont utilisés contenant la suspension sans extraits et sans pesticide. Après incubation de 24h/48h, on vérifie la croissance, dans chaque tube, qui se manifeste par une turbidité. La CMI d'un extrait vis-à-vis d'une souche donnée sera la plus petite des concentrations ne présentant aucune croissance visible de germe. La densité optique (D.O) est calculée pour chaque tube à une longueur d'onde de 550/620nm.

L'évaluation de la concentration microbienne a été réalisée à partir de la courbe d'étalonnage. Les CMF et CMB ont été ensuite calculées après ensemencement d'une goutte de 100µl de chaque tube sur Milieu de culture (extrait de levure) et dénombrement des colonies après 48h. La CMF ou la CMB étant la concentration de l'extrait qui ne laisse subsister que 0,01% de la population microbienne.

1.4.4. Détermination des cinétiques de croissance des souches microbiennes en mode batch sur milieu discontinu non renouvelé.

➤ **Principe de la méthode**

Il s'agit de déterminer le pouvoir antimicrobien ou en d'autres termes le pouvoir inhibiteur de l'extrait brut testé sur les capacités de croissance des souches phytopathogènes et de déterminer leur sensibilité et /ou résistance face au substrat ajouté au milieu (extrait végétal ou pesticide).

La détermination des potentialités de croissance des souches testées a été évaluée à travers des cinétiques de croissance à l'aide de trois paramètres : pH, D.O et Poids sec de l'inoculum. C'est une technique employée pour la première dans les tests des activités antimicrobiennes des substances naturelles. Elle a pour différence de mettre en contact l'extrait végétal et le microorganisme pendant la phase d'accélération et le début de la phase exponentielle de croissance puis d'évaluer l'activité antimicrobienne à partir de plusieurs paramètres de croissance (pH, opacité, biomasse ou la concentration fongique) et non à partir de l'importance de la zone d'inhibition

Les précultures et cultures sont conduites en mode batch sur milieu synthétique Galzy et Solninski (GS) amélioré, additionné de glucose (5g/l) à pH 4,5, le milieu est réparti dans des fioles d'Erlenmeyer de 250 ml à raison de 100 ml par fiole, l'ensemble est alors stérilisé sous pression vapeur saturante (20 mn à 120°C).

L'inoculum (mycélium plus spores ou colonies de de champignon) est prélevé des boites de Pétri 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 sous éclairage de 1200Lux (12h/24h) et en condition agitée (sur plaque orbitale à une vitesse de rotation de 180 tr/mn). Après 48h (T₀), l'extrait sec obtenu est repris dans le DMSO est ajouté dans les cultures de façon aseptique à la concentration finale de 1mg/ml.

La molécule de fongicide est alors préparée dans un mélange de DMSO (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 20 µ/ml. Des essais témoins (milieu + inoculum sans extrait et sans pesticides) sont inclus dans les essais. L'expérimentation a duré 5 jours (120min). (**Fig. 13**)

Chapitre II : Etude de l'activité antimicrobienne

Les paramètres étudiés sont le pH, la densité optique ou turbidité et le poids sec de l'inoculum. Les mesures sont prises à partir des prélèvements sur milieu à partir du temps t_0 (moment d'ajout de l'extrait ou du pesticide), puis toutes les 24 heures à partir de t_0 . Les valeurs calculées ont permis ensuite de tracer les cinétiques des pH, densité optique et des poids secs de l'inoculum des souches.

1.4.4.1. Mesure du pH

L'activité microbienne est largement influencée par le pH et par voie de conséquence, elle peut affecter le processus de croissance. Pour maintenir la survie du champignon dans le milieu, il est nécessaire que le pH soit proche de la neutralité ou légèrement basique. Le pH est déterminé à l'aide d'un pH mètre de type HI 2211 Hanna.

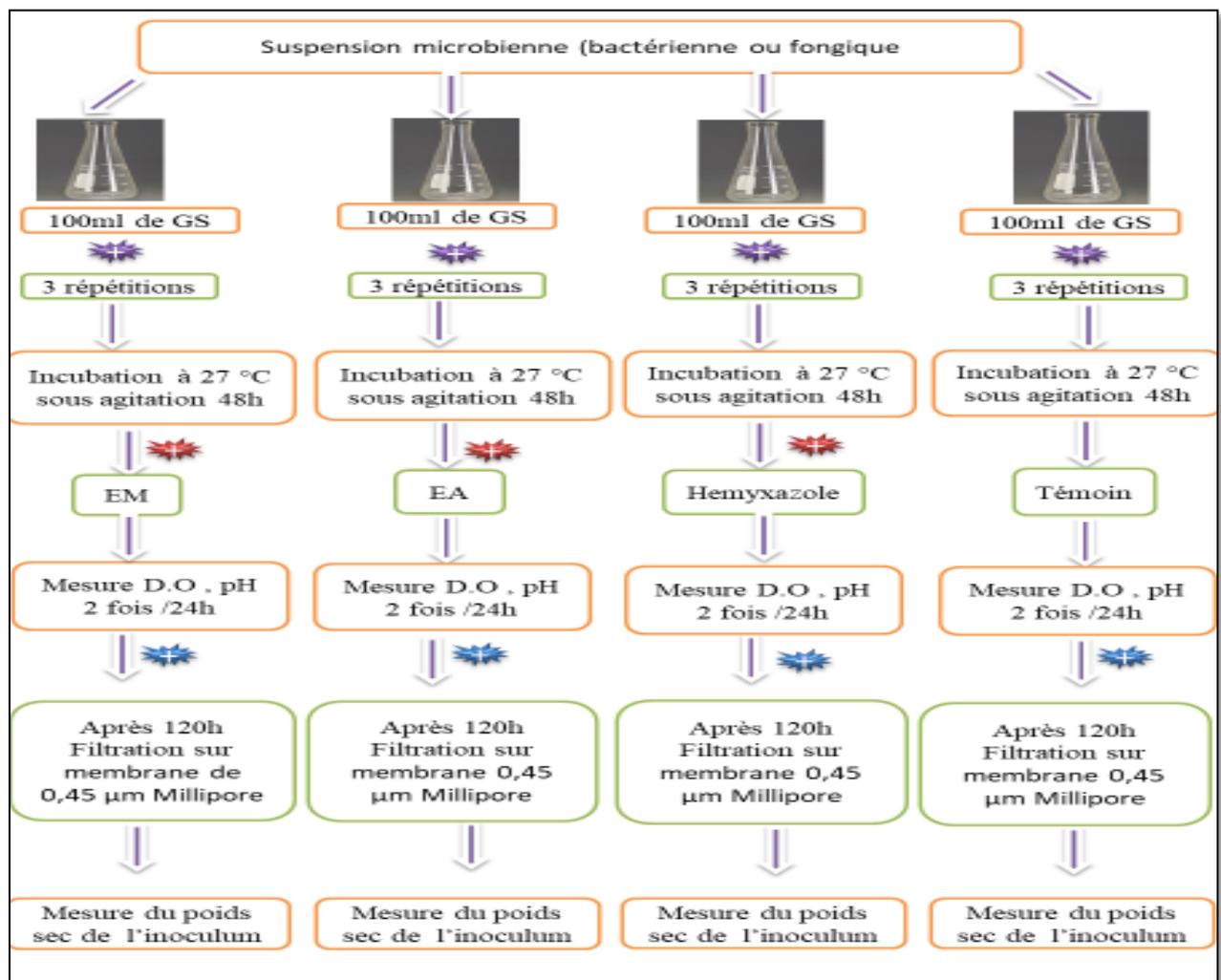


Fig. 13 : Les étapes de l'évaluation de l'effet antimicrobien des extraits de la plante effectués en mode batch sur milieu discontinu non renouvelé.

1.4.4.2. Détermination de la densité optique (D.O)

La turbidimétrie est utilisée pour déterminer la croissance des souches fongiques en présence de l'extrait ou du pesticide utilisé comme source de carbone à température ambiante pendant 5 jours. La densité optique est déterminée pendant la période d'incubation à partir de T0 à des intervalles de temps de 24 h. Elle est mesurée à une longueur d'onde de 550/660nm sur un spectrophotomètre WPA biowave. La courbe d'étalonnage réalisée séparément pour chaque souche permet de relier la densité optique obtenue au nombre réel de champignons.

1.4.4.3. Calcul du poids sec de l'inoculum

Après 120 heures, le contenu des fioles Erlenmeyer est récupéré, filtré à travers une membrane de 0,45 µm Millipore. Le contenu de la membrane est mis à sécher à une température de 105 °C pendant 24 heures puis pesé en vue de déterminer le poids en mg/100 ml de l'inoculum sec de la souche testée.

Le poids sec est calculé selon l'équation suivante :

$$Pis = (M - M0)$$

M : poids de la membrane après séchage

M0 : poids de la membrane vide

Tous les résultats obtenus sont validés par 2 tests statistiques (Tukey, Anova)

1.5. Etude *in vivo* de l'extrait méthanolique de *Rosmarinus eriocalyx* sur *Citrus sinensis* L. inoculé *ex situ* par les différentes souches microbiennes

Les infections fongiques sont la principale cause de pourriture post-récolte de fruits et légumes frais lors du stockage et du transport et entraînent des pertes économiques importantes pendant la phase de commercialisation (Gatto *et al.*, 2011). Les infections causées pendant les conditions post-récolte réduisent la durée de conservation et nuisent à la valeur marchande des fruits (Tripathi *et al.*, 2008). De plus, les mycotoxines qui sont des métabolites secondaires produits par les moisissures, ont des effets néfastes sur l'homme et les animaux (Zain, 2011). La contamination des fruits par les mycotoxines a non seulement entraîné des risques pour la santé, mais également a entraîné des pertes économiques, en particulier pour les pays exportateurs (Fernandez-Cruz *et al.*, 2010).

La sécurité alimentaire est l'un des problèmes majeurs liés aux fruits et légumes frais (Antunes et Cavaco, 2010). Le développement de produits naturels de protection des cultures en tant qu'alternative aux pesticides synthétiques est actuellement à l'honneur (Combrinck *et al.*, 2011). Les produits naturels de bio-contrôle pourraient être une bonne alternative à l'utilisation

de pesticides synthétiques, et à leur tour pour répondre aux exigences des consommateurs pour plus d'aliments naturels et sains (**Gachango *et al.*, 2012 ; Martinez-Romero *et al.*, 2008**).

Entre autres, l'utilisation d'extraits de plantes pourrait constituer une alternative utile aux fongicides synthétiques dans la lutte contre les champignons de la pourriture lors de la manipulation des fruits et des légumes après la récolte (**Gatto *et al.*, 2011**).

Les agrumes sont sujets à la décomposition post-récolte par les moisissures comme les *Penicillium*. Les préoccupations environnementales et sanitaires grandissantes associées à l'application post-récolte de pesticides de synthèse sur les cultures fruitières ont suscité un regain d'intérêt pour l'utilisation de métabolites secondaires de plantes comme biocides. Pour toutes ces raisons, nous avons essayé de vérifier le pouvoir fongicide et bactérien de l'extrait méthanolique de *Rosmarinus eriocalyx* sur les fruits de *Citrus sinensis* Inoculé artificiellement ex situ.

1.5.1. Biotest sur les fruits de *Citrus sinensis* L.

Ce test consiste à évaluer l'effet des extraits de *Rosmarinus eriocalyx* sur le fruit infecté par contamination artificielle. Pour ce faire, des lots d'orange (*Citrus sinensis* var. *Navel*.) indemnes de toute infection sont préalablement rincés à l'eau de robinet puis désinfectés à l'hypochlorite de sodium (0,5%), rincés de nouveau plusieurs fois à l'eau distillée stérile. Après séchage, les fruits sont inoculés par injection de 20 µl prélevés à partir d'une suspension fongique (10^5 spores/ml) ou bactérienne (10^8 UFC).

Quelques heures après, les fruits inoculés sont traités par injection de 100 µl d'EM ou de 20µl d'Hymexazole. Les citrus ainsi préparés sont enveloppés dans des sacs en plastiques stériles et placés en incubation à une température ambiante dans une enceinte de culture à une lumière continue de 12h/12h. Des témoins traités à l'eau distillée stérile sont inclus dans les essais. Les lectures sont faites dès l'apparition des nécroses (**Fig. 14**)

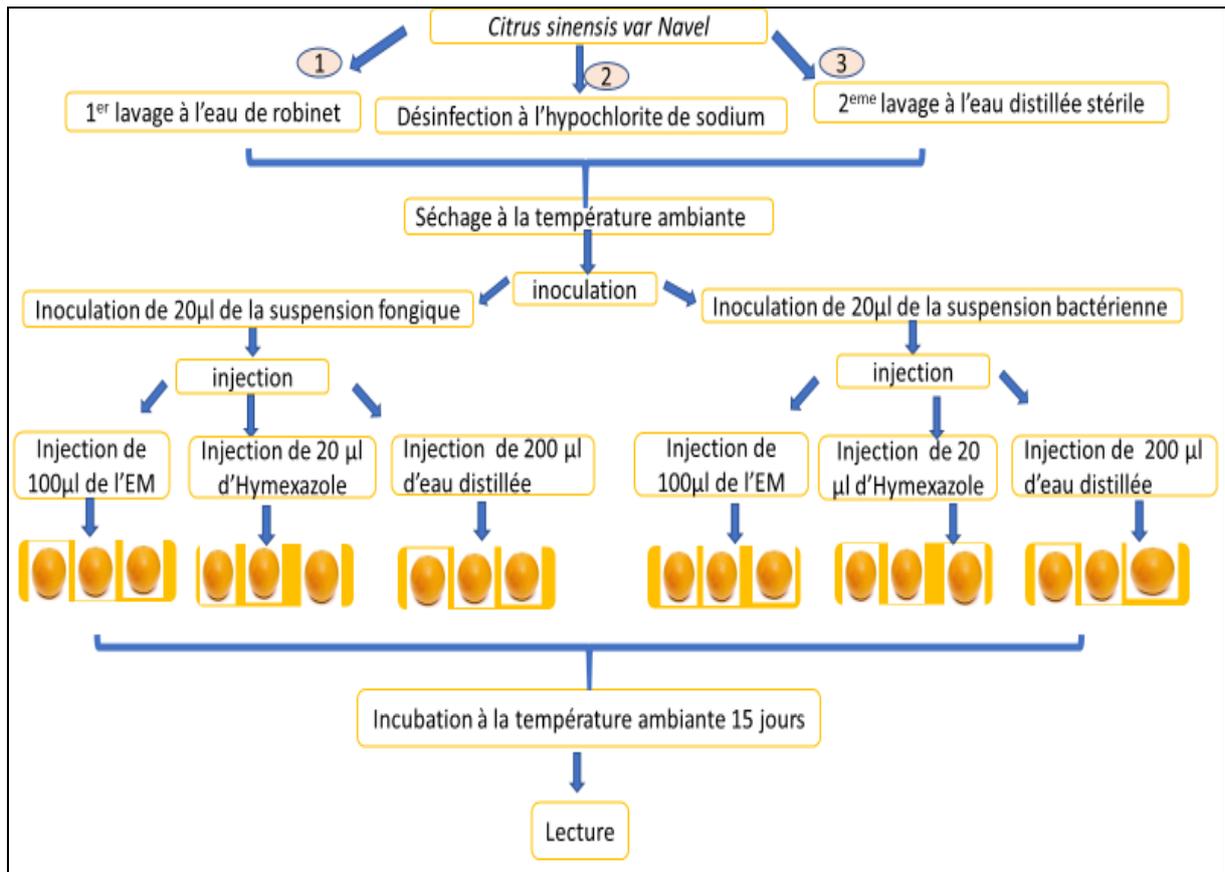


Fig. 14 : Schéma présentant les différentes étapes du test *in vivo ex situ* des activités antimicrobiennes des extraits de *Rosmarinus eriocalyx* sur *Citrus sinensis* L.

3. Résultats et Discussion

3. 1. Dénombrement de la microflore à partir des sols et des feuilles infectées

Le sol n'est pas simplement le support dans lequel les plantes s'enracinent et puisent les éléments nutritifs indispensables à leur développement. Le sol est un fantastique réservoir de microorganismes (champignons et bactéries), en termes de diversité et de densité. Les communautés microbiennes telluriques, qui jouent un rôle primordial dans les cycles biogéochimiques du carbone, de l'azote et d'autres éléments, exercent également des effets bénéfiques ou délétères sur la croissance et la santé des plantes.

La microflore isolée des sols est constituée d'un nombre important de bactéries et des champignons. Cette population bactérienne est hétérogène et présente une variabilité qualitative

et quantitative. Elle est représentée par un pourcentage de 86%, lequel est plus élevé que celui des champignons qui ne sont que de l'ordre de 14%. (**Fig. 16**)

L'isolement des souches fongique et bactérienne a été effectué également à partir des feuilles infectées par lavage et broyage. Un taux élevé des champignons a été détecté, selon les deux méthodes estimé respectivement de 50% (broyage) et de 33% (lavage) tandis que les bactéries ne représentent qu'un pourcentage de 6% (lavage) et de 11% (broyage) (**Fig 18**)

Tab. 15 : Le dénombrement de la microflore microbienne isolée des sols

Nombre des isolats bactériens à partir du sol (UFC/g)	Nombres des isolats fongiques à partir du sol (UFC/g)
14332	2365

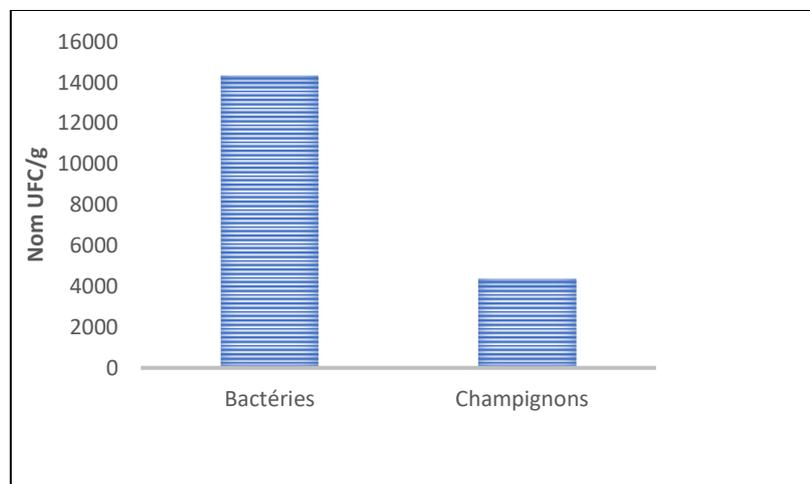


Fig.15 : La microflore totale du sol

Tab. 16 : le dénombrement total des isolats bactériens et fongiques isolés à partir des feuilles infectées

Feuilles infectées	
Nombre des isolats bactériens (UFC/ml)	Nombres des isolats fongiques (UFC/ml)
1123	5448

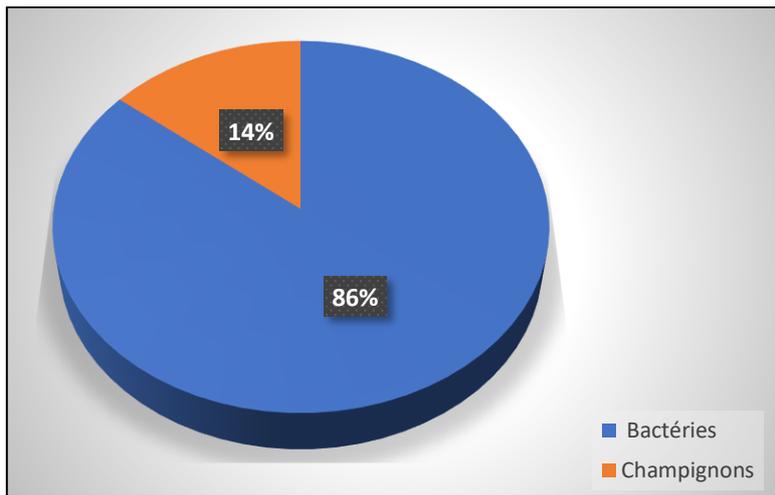


Fig. 16 : La microflore totale du sol

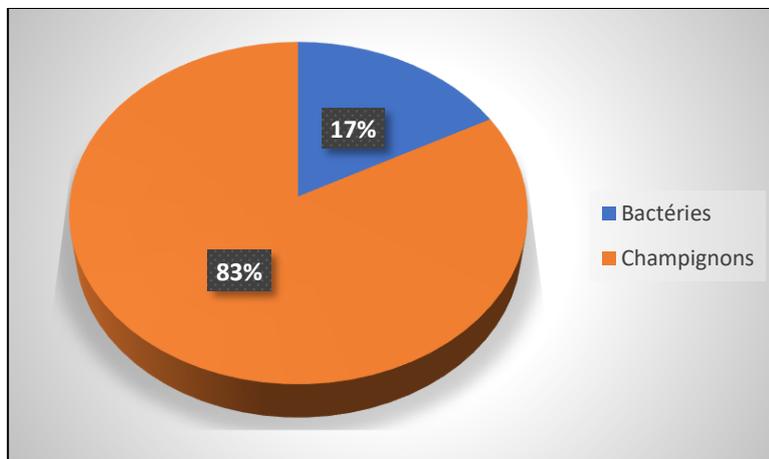


Fig. 17 : La microflore des feuilles infectées

Tab.17 : Les isolats bactériens et fongiques dénombrés par lavage et broyage.

Feuilles infectées			
Lavage ((UFC/ml))		Broyage ((UFC/ml))	
Bactérie	Champignons	Bactérie	Champignons
402	2157	702	3291

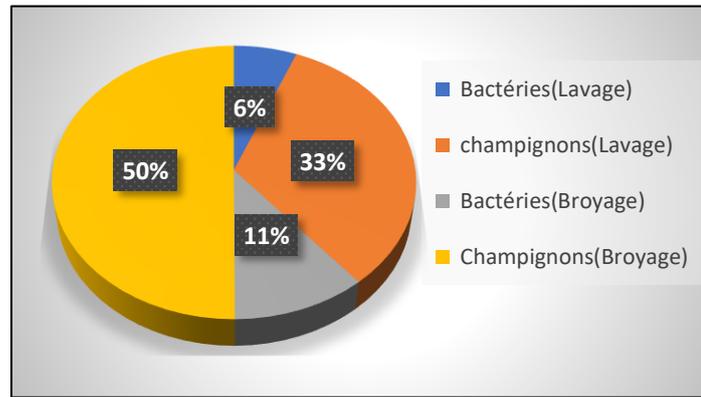


Fig. 18 : La microflore des bactéries et des champignons des feuilles infectées

3.2. Identifications des souches microbiennes isolées

Une multitude d'espèces a été identifiée au niveau des populations bactérienne et fongique. On note l'abondance des genres : *Pseudomonas*, *Aspergillus* et *Alternaria* et *Fusarium* (Tab. 18, Tab. 19, Tab20)

Tab. 18 : La liste des espèces fongiques isolées

Espèce fongique	Nombre des champignons à partir des sols	Nombre de champignons à partir plantes infectées	
		Lavage	Broyage
<i>Aspergillus niger</i>	26	18	21
<i>Aspergillus flavus</i>	22	11	15
<i>Aspergillus ochraceus</i>	15	16	19
<i>Aspergillus nidulans</i>	13	12	17
<i>Aspergillus terreus</i>	20	21	25
<i>Alternaria alternata</i>	11	15	13
<i>Alternaria sp</i>	26	26	18
<i>Alternaria tenuissima</i>	6	12	14
<i>Alternaria arborescenes</i>	8	11	12
<i>Fusarium oxysporum</i>	23	17	17
<i>Fusarium graminearum</i>	14	14	15
<i>Fusarium proliferatum</i>	12	5	8
<i>Fusarium culmorum</i>	9	7	9
<i>Fusarium sp</i>	16	13	21

Suite Tab. 18 : La liste des espèces fongiques isolées

<i>Penicillium sp</i>	15	14	14
<i>Rhizopus sp</i>	9	12	14
<i>Mucor sp</i>	12	6	11
<i>Trichoderma sp</i>	14	10	13
<i>Cladosporium sp</i>	13	6	8
<i>Acremonium sp</i>	7	8	13
<i>Helminthosporium sp</i>	4	6	9
<i>Colletotrichum coccodes</i>	2	4	5

Tab. 19 : La taxonomie des espèces bactériennes isolées

Règne	Division	Classe	Ordre	Famille	Genre	Espèce
Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Pseudomonadales	<i>Pseudomonadaceae</i>	<i>Pseudomonas</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
						<i>Pseudomonas sp1</i>
						<i>Pseudomonas sp2</i>
						<i>Pseudomonas sp 3</i>
						<i>Pseudomonas sp4</i>
						<i>Pseudomonas sp5</i>
						<i>Chryseomonas luteola</i>
			Enterobacterales	<i>Enterobacteriaceae</i>	<i>Proteus</i>	<i>proteus penneri</i>
					<i>Enterobacter</i>	<i>Enterobacter sakazakii</i>
					<i>pantoea</i>	<i>pantoea spp</i>
					<i>proteus</i>	<i>proteus vulgaris</i>
			Pasteurellales	<i>Pasteurellaceae</i>	<i>Pasteurella</i>	<i>Pasteurella pneumotrop</i>
			Xanthomonadales	<i>Xanthomonaceae</i>	<i>Stenotrophomonas</i>	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>
Aeromonadales	<i>Aeromonadaceae</i>	<i>Aeromonas</i>	<i>Aeromonas salmonicida</i>			

Tab. 20 : La taxonomie des espèces fongiques isolées

Règne	Classe	Ordre	Famille	Genre	Espèce
Fungi	Eurotiomycetes	Eurotiales	Trichodermaceae	<i>Aspergillus</i>	<i>Aspergillus niger</i>
					<i>Aspergillus flavus</i>
					<i>Aspergillus ochraceus</i>
					<i>Aspergillus nidulans</i>
					<i>Aspergillus terreus</i>
Fungi	Dothideomycetes	Pleosporales	Pleosporaceae	<i>Alternaria</i>	<i>Alternaria alternata</i>
					<i>Alternaria sp</i>
					<i>Alternaria tenuissima</i>
					<i>Alternaria arborescens</i>
Fungi	Sordariomycetes	Hypocreales	Nectriaceae	<i>Fusarium</i>	<i>Fusarium oxysporum</i>
					<i>Fusarium graminearum</i>
					<i>Fusarium proliferatum</i>
					<i>Fusarium culmorum</i>
Fungi	Eurotiomycetes	Eurotiales	Trichodermaceae	<i>Penicillium</i>	<i>Penicillium sp</i>
		Mucorales	Mucoraceae	<i>Rhizopus</i>	<i>Rhizopus sp</i>
			Mucoraceae	<i>Mucor</i>	<i>Mucor sp</i>
	Eurotiomycetes	Eurotiales	Trichodermaceae	<i>Trichoderma</i>	<i>Trichoderma sp</i>
	Dothideomycetes	Capnodiales	Devidiellaceae	<i>Cladosporium</i>	<i>Cladosporium sp</i>
		Hypocreales	Hypocreaceae	<i>Acremonium</i>	<i>Acremonium sp</i>
	Dothideomycetes	Pleosporales	Pleosporaceae	<i>Helminthosporium</i>	<i>Helminthosporium sp</i>
	Sordariomycetes	Glomerellales	Glomerellaceae	<i>Colletotrichum</i>	<i>Colletotrichum coccodes</i>

3.3. Détermination de l'hypersensibilité des *Pseudomonas*

Toutes les souches de *Pseudomonas* testées sont pathogènes sauf *Pseudomonas aeruginosa*

Tab. 21 : Test de l'hypersensibilité des souches de *Pseudomonas* sur feuilles de tabac

Espèce	Nombre des champignons à partir des sols	Nombre des champignons à partir des sols		Test d'hypersensibilité
		Lavage	Broyage	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	4	1	2	-
<i>Pseudomonas sp 1</i>	0	2	2	+
<i>Pseudomonas sp 2</i>	0	1	3	+
<i>Pseudomonas sp 3</i>	3	0	0	+
<i>Pseudomonas sp4</i>	2	0	0	+
<i>Pseudomonas sp5</i>	0	3	3	+

3.4. Etude *in vitro* de l'activité des extraits de *Rosmarinus eriocalyx* sur les souches antifongiques et antibactériennes

3.4.1. La méthode de diffusion en milieu solide

➤ Sur le genre *Aspergillus*

La méthode de l'activité en milieu solide (la méthode des disques) a révélé une assez forte capacité de la solution mère (SM=1mg/ml) de l'extrait méthanolique (EM) contre la croissance des souches d'*Aspergillus*. Les halos enregistrés se situent entre 12mm à 21,33mm (**Fig. 22**). *Aspergillus terreus* et *Aspergillus flavus* se sont montrés les plus sensibles à la SM de l'EM (21,33mm) suivis par *Aspergillus ochraceus* avec une zone d'inhibition de 20,67mm.

Les deux autres concentrations de l'EM (0,5 mg/ml, 0,25mg/ml) ont montré une activité antifongique mais moins importante que celle de la SM avec des zones d'inhibition variant entre 16,66mm et à 12mm. L'extrait aqueux (EA) n'a pas exercé un fort potentiel d'inhibition avec toutes les espèces d'*Aspergillus* testées au cours de l'expérimentation. Le pesticide de

référence a cependant exercé une action inhibitrice plus performante sur la croissance des deux souches fongiques, *Aspergillus ochraceus* et *Aspergillus nidulans* (21mm, 18,66mm). Il s'est montré par contre inefficace sur *Aspergillus terreus* et *Aspergillus flavus*. (Fig. 19, Fig. 20, Fig .21).

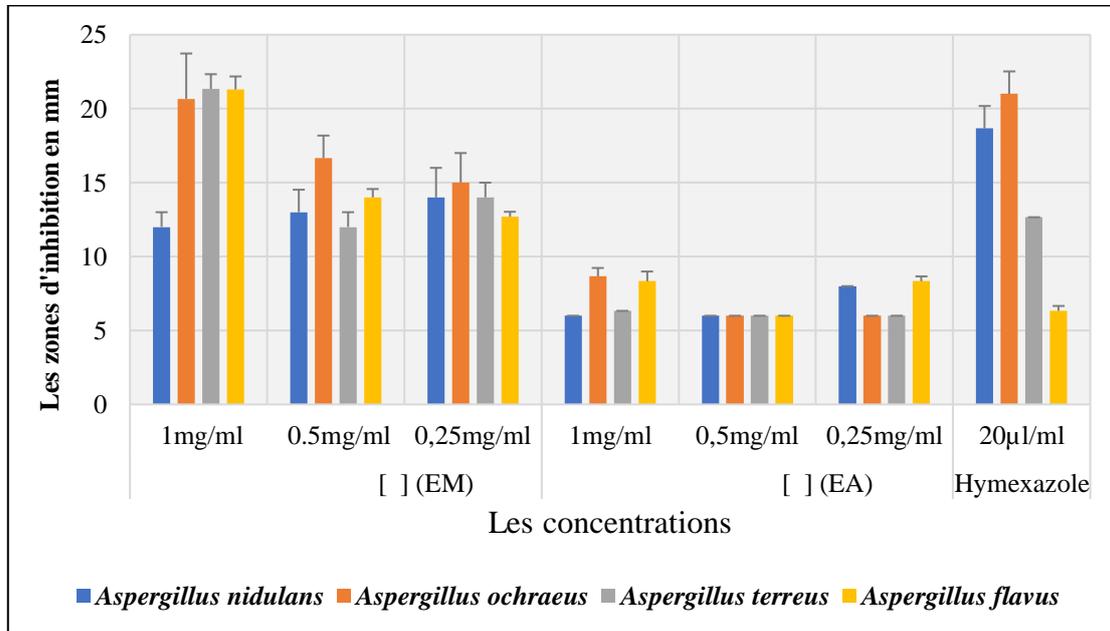


Fig. 19 : Les zones d'inhibition provoquées par les extraits de *Rosmarinus eriocalyx* sur les souches du genre *Aspergillus*

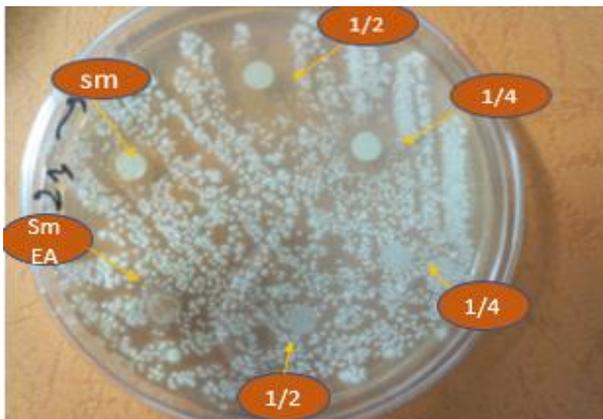


Fig.20 : Effet de l'extrait méthanolique et L'extrait aqueux sur *Aspergillus ochraceus*

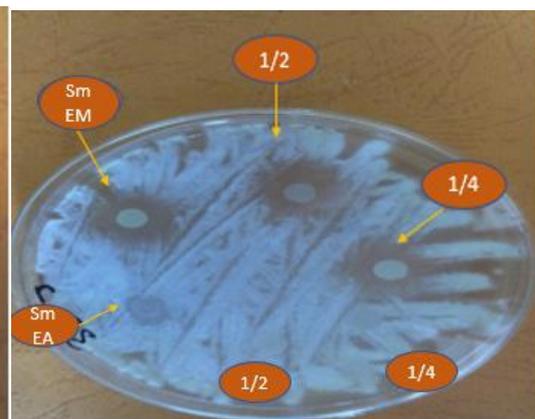


Fig.21 : Effet de l'extrait méthanolique et l'extrait aqueux sur *Aspergillus terreus*

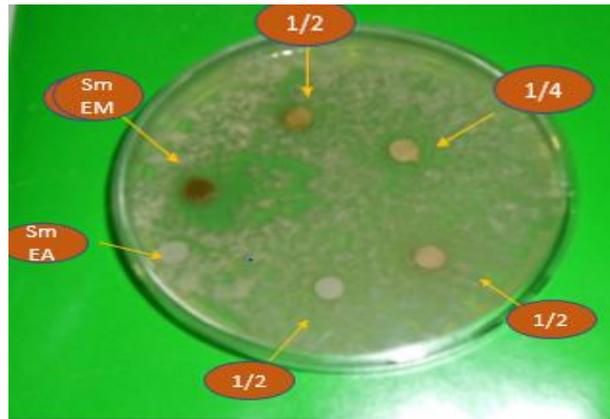


Fig. 22 : l'effet de l'extrait méthanolique sur *Aspergillus flavus*

➤ **Sur le genre *Fusarium***

L'EM a provoqué une activité significative ($p < 0,001$) (**Annexe II**) envers les souches testées. Les *Fusarium graminearum*, *Fusarium verticilloides*, *Fusarium proliferatum* semblent les souches les plus sensibles à la concentration de 1mg/ml. Par ailleurs la concentration de 0,5mg/ml a exprimé un pouvoir inhibiteur sur toutes les souches du *Fusarium* avec une inhibition plus forte pour l'espèce *Fusarium graminearum*. Cette dernière paraît sensible également à la concentration de 0,25mg/ml avec une zone d'inhibition de l'ordre de 15mm.

Comme précédemment, le pesticide de synthèse l'Hyméxazole a montré un effet plus élevé contre quelques espèces de *Fusarium* testées et notamment sur *Fusarium graminearum* dont le diamètre d'inhibition a dépassé ceux des autres souches (21,66mm) (**Fig. 23**)

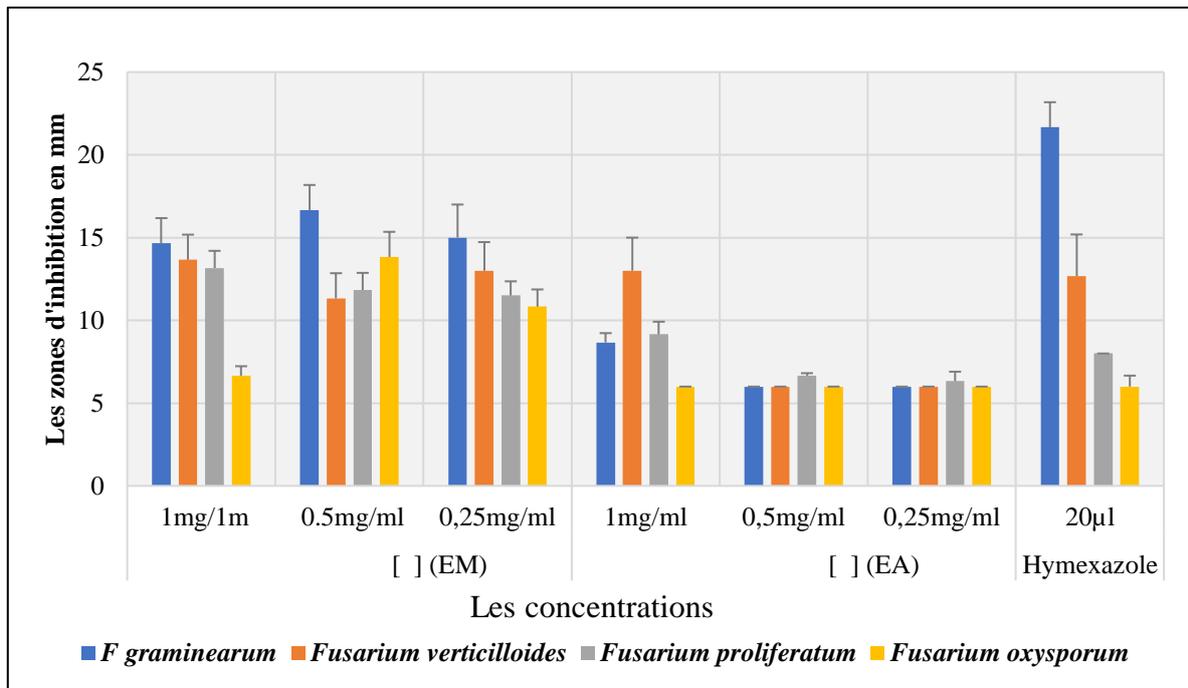


Fig. 23 : Les zones d'inhibition provoquées par les extraits de *Rosmarinus eriocalyx* sur les souches du genre *Fusarium*

➤ **Sur le genre *Alternaria***

Le pouvoir antifongique de l'EM s'avère plus actif que celui de l'extrait aqueux. L'analyse des résultats illustrés dans le **Fig.24** indique qu'*Alternaria. arborescens* et *Alternaria alternata* 1 sont les plus sensibles à la concentration 1mg/ml de l'EM avec une zone d'inhibition de 21mm et 20mm respectivement . Toutefois la concentration de 0,5mg/ml à l'air d'être la plus efficace contre *Alternaria tenuissima* puisque le diamètre d'inhibition enregistré est de l'ordre de 24,33mm contre 17mm et 16mm pour *Alternaria Alternata* 1 et *Alternaria arborescens* respectivement. La plus forte activité antifongique a été notée avec 0,25 mg/ml sur *Alternata alternata* 1 avec 23,33 mm. Un effet modéré a été déterminé avec cette même concentration avec les autres souches. Comme dans les autres cas précédents, l'extrait aqueux a entraîné une inhibition assez modeste face à toutes les *Alternaria* testées. Le chiffre le plus élevé (10,33mm) a été relevé pour *Alternaria tenuissima* à la concentration de 1mg/ml.

L'Hymexazole a exercé l'effet le plus accentué avec toutes les souches d'*Alternaria*, les zones d'inhibitions s'échelonnent entre 22,33mm à 24, 66mm. En comparant l'effet du pesticide de synthèse (Hymexazole) avec celui de l'EM, on constate que l'EM a effectué une capacité antifongique similaire à celui du pesticide contre la souche *Alternaria tenuissima* à 0,5mg/ml. Une efficacité du même ordre a été détectée vis-à-vis d'*Alternaria alternata* 1 à 0,25mg/ml.

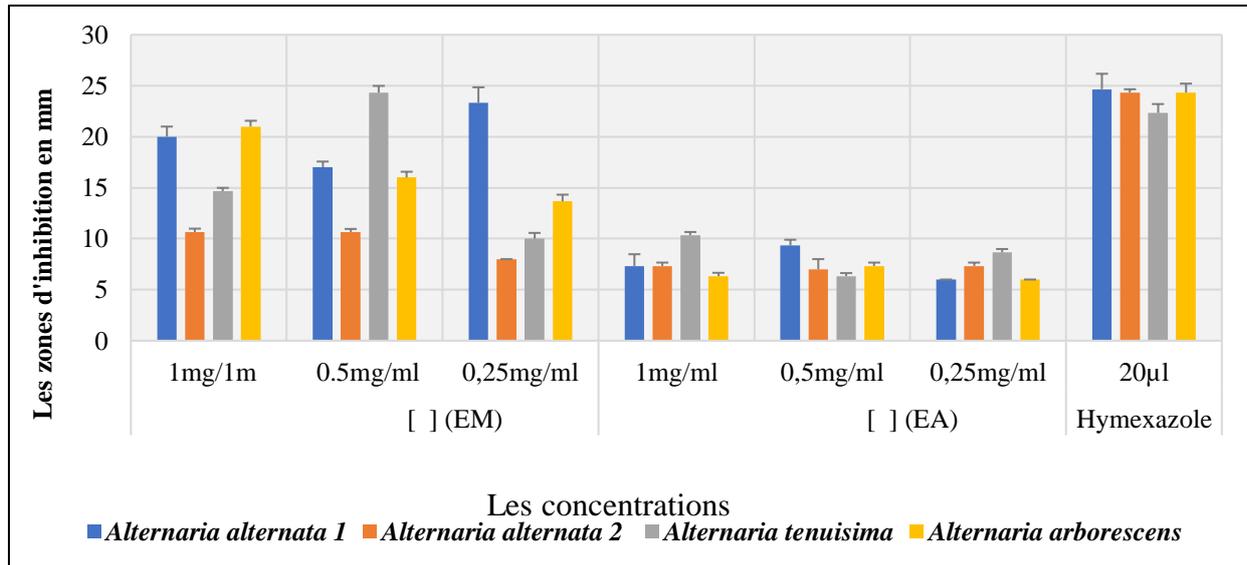


Fig. 24 : Les zones d'inhibition provoquées par les extraits de *Rosmarinus eriocalyx* sur les souches du genre *Alternaria*

➤ **Sur les autres genres**

Un pouvoir antifongique sur *Penicillium sp* avec toutes les concentrations testées avec des zones d'inhibition comprises entre 13, 33 mm et 21 mm (**Fig. 25**) et notamment pour 0,5mg/ml. *Colletotrichum coccodes* s'est montré sensible aux trois doses de l'EM, la valeur la plus élevée a été notée à 0.5mg/ml avec 13mm. En revanche *Helminthosporium sp* a été le moins sensible à la concentration de 1mg/ml (6,66mm). L'AE n'a pas exercé une efficacité vis-à-vis des souches fongiques testées, les zones d'inhibition affichées sont situées entre 6,33mm et 8,66mm. L'Hymexazole n'a pas induit une inhibition importante sauf pour *Colletotrichum coccodes* (15,33mm).

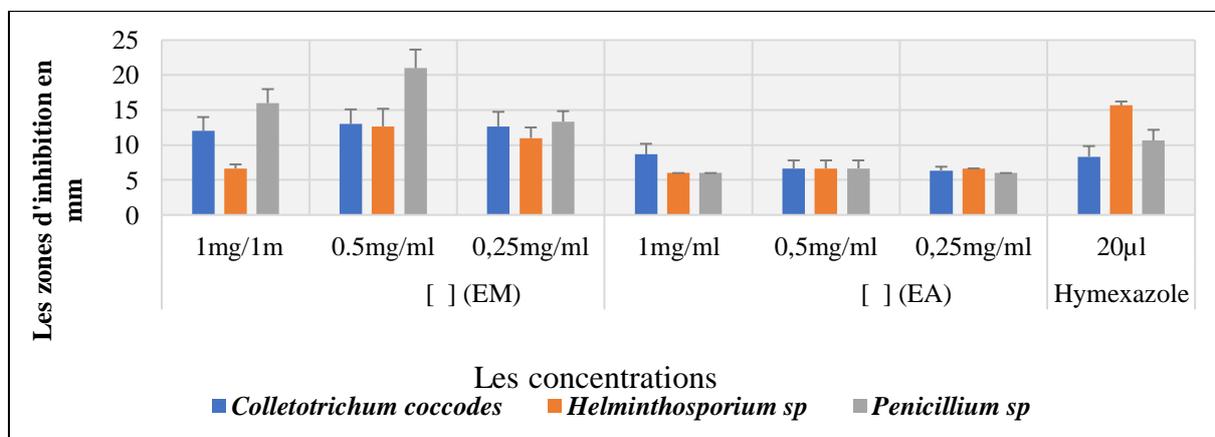


Fig. 25 : Les zones d'inhibition provoquées par les extraits de *Rosmarinus eriocalyx* sur les souches des autres genres

➤ Sur le genre *Pseudomonas*

Sur l'optique des résultats présentés dans (Fig. 26), on constate selon les diamètres d'inhibition générés par les deux extraits que l'effet de la concentration 1mg/ml a été le plus intense sur la croissance des souches testées, ceci a été traduit par des zones de l'ordre de 19,66mm à 22,33mm. Le meilleur résultat relevé a été sur *Pseudomonas sp 2* (22,33mm). En outre la concentration 0,5 mg/ml a exprimé une activité antibactérienne efficace. Des zones d'inhibition situées dans une fourchette de 11,66mm à 21,33mm avec un effet plus prononcé sur *Pseudomonas sp 2*. La concentration 0,25gm/ml a été aussi inhibitrice sur les *Pseudomonas* mais les halos résultants ont été moins importants que ceux obtenus pour les doses précédentes avec des valeurs allant de 14,33mm à 17,33mm. *Pseudomonas sp 5* a été la plus sensible à cette concentration (17,33mm). L'EA a révélé l'effet le moins significatif et les agents pathogènes n'ont pas été affectés par la présence des trois concentrations testées à l'exception de *Pseudomonas sp 3* qui a présenté une sensibilité modérée (11,33mm) avec la concentration de 1mg/ml. Quant au pesticide, une action moins importante a été générée avec l'ensemble des souches comparativement à celle de l'EM. Les zones d'inhibition enregistrées sont de l'ordre de 12mm à 23mm. La souche la plus affectée par le pesticide est celle de *Pseudomonas sp 5* ayant exprimé le halo le plus élevé (23mm).

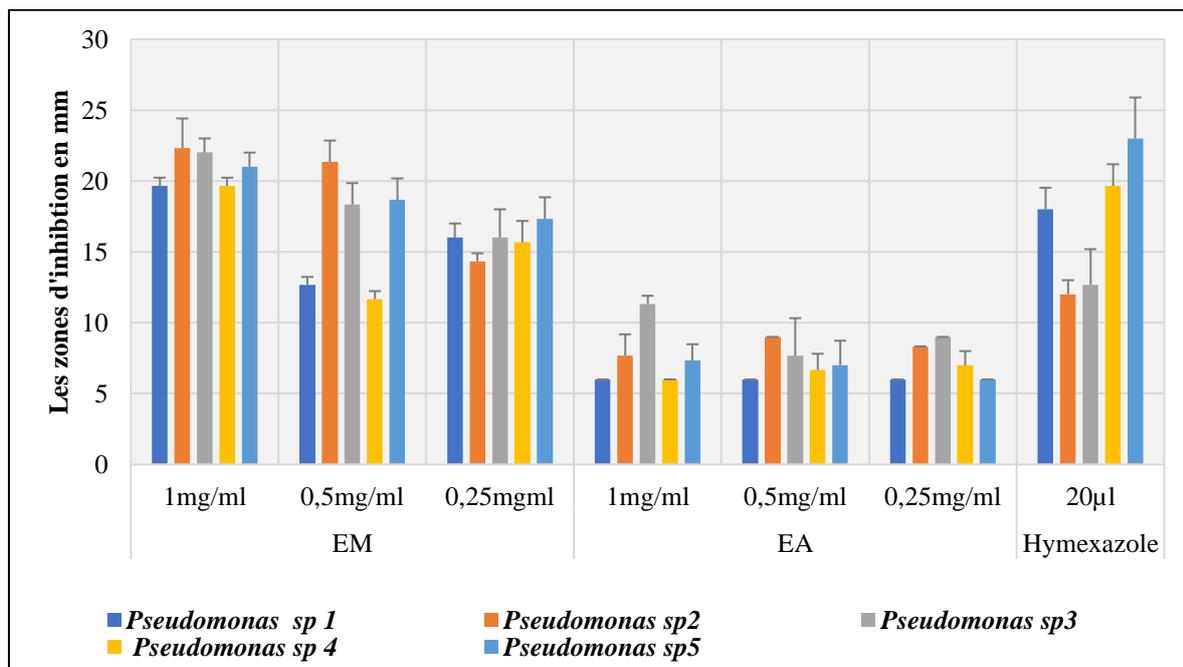


Fig. 26 : les zones d'inhibition provoquées par les extraits de *Rosmarinus eriocalyx* sur les souches du genre *Pseudomonas*

3.4.2. Activité antimicrobienne par la méthode de l'incorporation de l'extrait dans le milieu de culture

➤ Sur le genre *Aspergillus*

La deuxième méthode employée afin d'évaluer l'effet antifongique est celle de mélanger l'extrait végétal au milieu de culture stérile liquide. La lecture des boîtes après incubation permet de déterminer cette fois ci la croissance radiale exprimée en pourcentage par rapport aux boîtes témoins. Les deux extraits méthanoliques et méthanoliques soumis aux ultrasons (EM, EMS) ont démontré une activité antifongique presque similaire malgré leurs modes d'extraction différents.

Les pourcentages de la croissance radiale des souches sont compris entre 77,57% et 62,7% avec une forte réduction pour *Aspergillus nidulans* et *Aspergillus terreus* (77,57%, 76, 19%). Quant à l'extrait EMS la croissance radiale varie entre 75,47% à 58 ,43% (**Fig. 27**) avec un meilleur effet sur les mêmes souches que précédemment avec 75, 47% et 73,47%. L'extrait aqueux a exercé une activité réductrice vis-à-vis de l'espèce *Aspergillus terreus* (64,21%) uniquement. Le pesticide s'est avéré moins efficace face à *Aspergillus terreus* avec un taux d'inhibition de 5,3% (**Annexe II**).

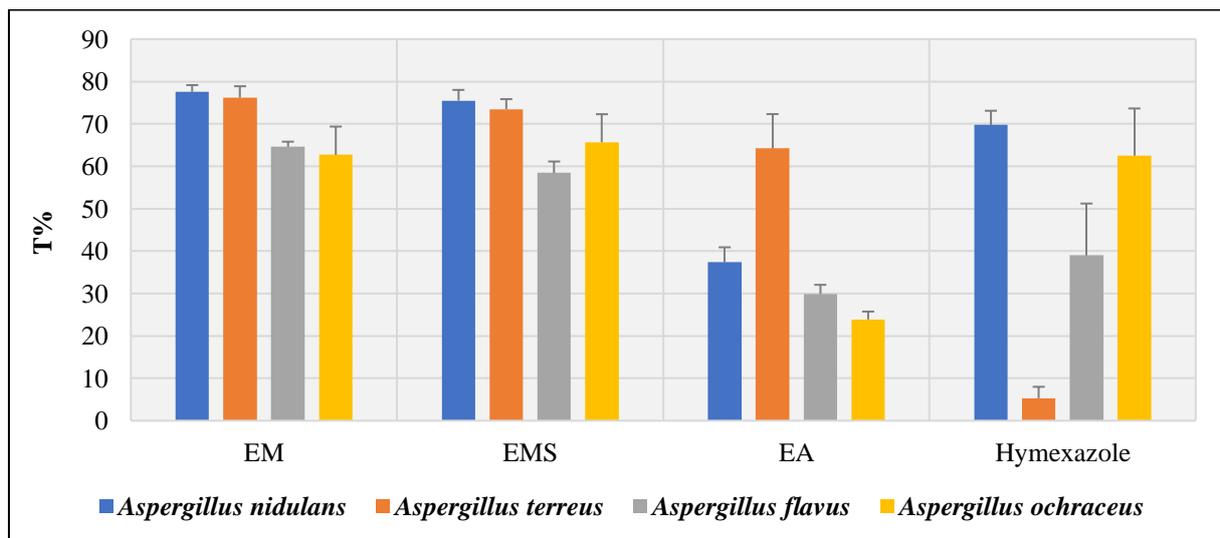


Fig. 27 : Taux d'inhibition provoqués par les extraits de *Rosmarinus eriocalyx* sur les souches du genre *Aspergillus*

➤ **Sur le genre *Fusarium***

Les deux extraits testés ont induit un effet inhibiteur assez satisfaisant avec un taux variant de 78,53% à 38,13% pour EMS et de 75,19% à 28,46% pour EM (**Fig. 28**). Le plus fort pouvoir d'inhibition a été enregistré sur *Fusarium verticillioides* alors que le pouvoir le plus faible a été obtenu sur *Fusarium oxysporum*. D'un autre côté, l'extrait aqueux ne semble exercer qu'un effet inhibiteur assez faible sur l'ensemble des souches analysées. L'Hymexazole s'est montré actif sur la prolifération des *Fusarium* mais moins important que celui induit par les deux extraits méthanoliques.

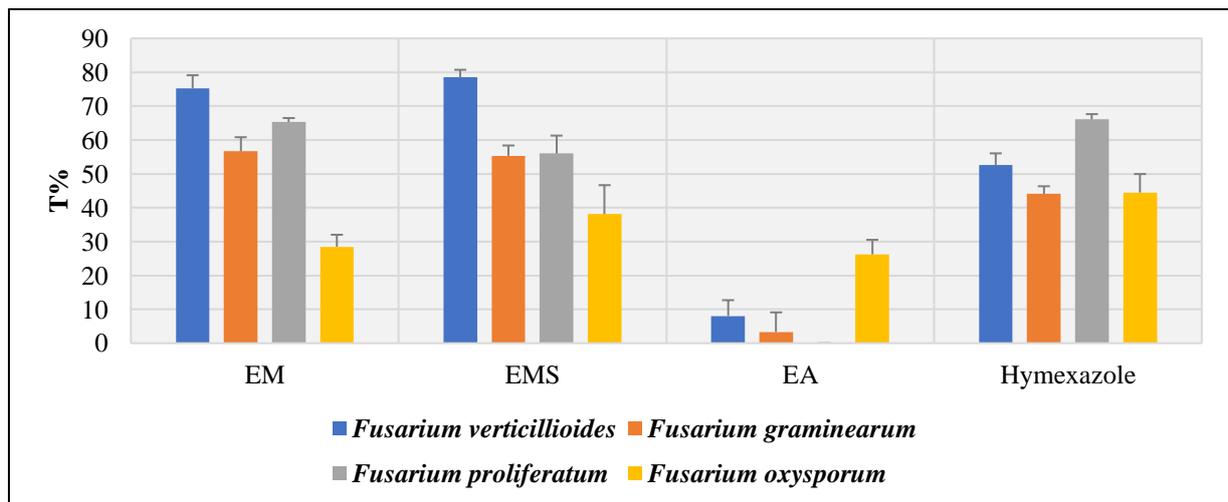


Fig. 28 : Taux d'inhibition provoqués par les extraits de *Rosmarinus eriocalyx* sur les souches du genre *Fusarium*

➤ **Sur le genre *Alternaria***

Les résultats présentés dans la **Fig. 29**, indiquent un effet antifongique très important de la part de l'EM. Ce dernier a inhibé la croissance radiale de toutes les souches pendant un temps d'incubation assez court, il a freiné la croissance des souches avec des taux allant de 52,89% à 84,11%. Le taux d'inhibition le plus remarquable a été observé contre *Alternaria alternata* 1 avec un pourcentage de 84,11%. Des taux non négligeables ont été dénotés respectivement pour *Alternaria arborescens* et *Alternaria tenuissima* (79,02% et 76,66%).

Le pesticide synthétique a provoqué quant à lui, un effet moins important avec des pourcentages de réduction de la croissance radiale des souches compris entre 60,7% à 65,55%. En revanche,

seule un pouvoir inhibiteur enregistré sur *Alternaria arborescens* (72,79%) en présence de l'ajout de l'extrait aqueux (**voir Annexe II**).

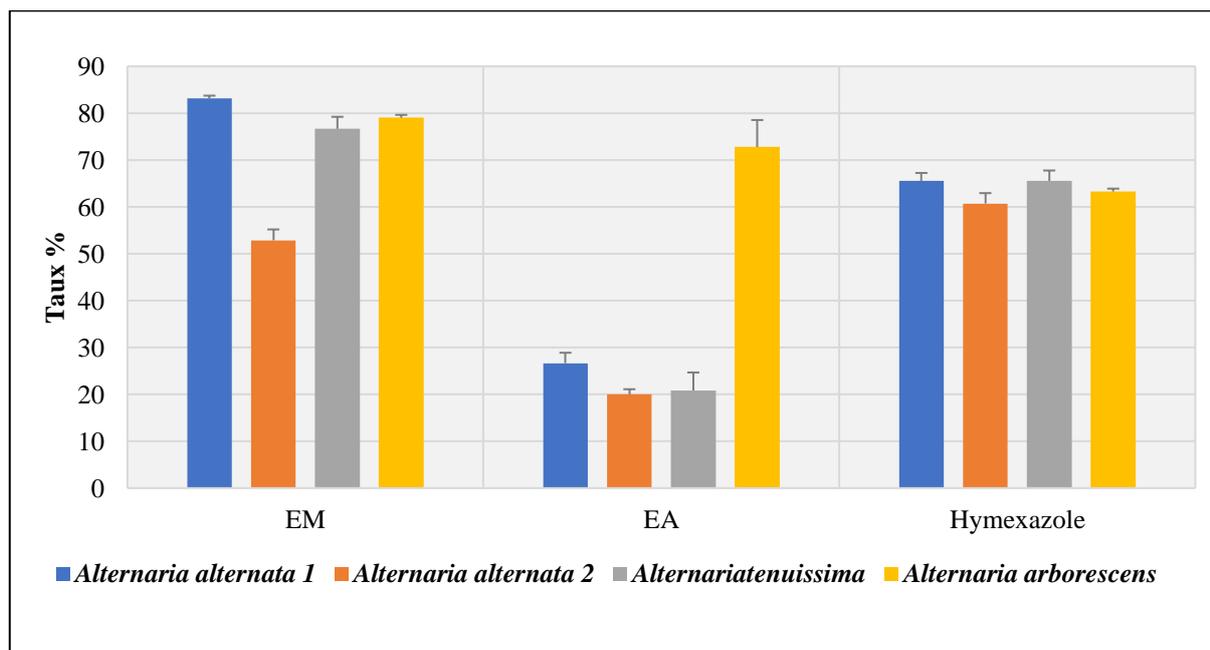


Fig. 29 : Taux d'inhibition provoqués par les extraits de *Rosmarinus eriocalyx* sur les souches du genre *Alternaria*

➤ **Sur les autres genres**

Selon les valeurs des taux d'inhibition obtenus (**Fig. 30**), on observe que les deux extraits EM et EMS marquent l'activité antifongique la plus élevée alors que l'EA se révèle actif sur *Helminthosporium sp.* Toutes les souches fongiques étaient sensibles aux différents extraits méthanoliques. L'effet de l'EM est le plus puissant sur *colletotrichum coccodes* à un taux réducteur de 88,66%. EMS s'est également avéré être plus actif avec un effet inhibiteur de 78,66% sur *colletotrichum coccodes*. La croissance radiale d'*Helminthosporium sp* a été infecté par la présence des différents extraits de *Rosmarinus eriocalyx*, le taux d'inhibition obtenu était de 81,08% EM, 77,03% EMS et 61,45% EA respectivement. Le pesticide a prononcé un effet moins important comparativement à celui des EM ou le taux enregistré le plus élevé était contre *Colletotrichum coccodes* de 77,81%. En revanche, l'EA a exhibé une activité assez bonne sur la croissance radiale d'*Helminthosporium sp* de 61,45%.

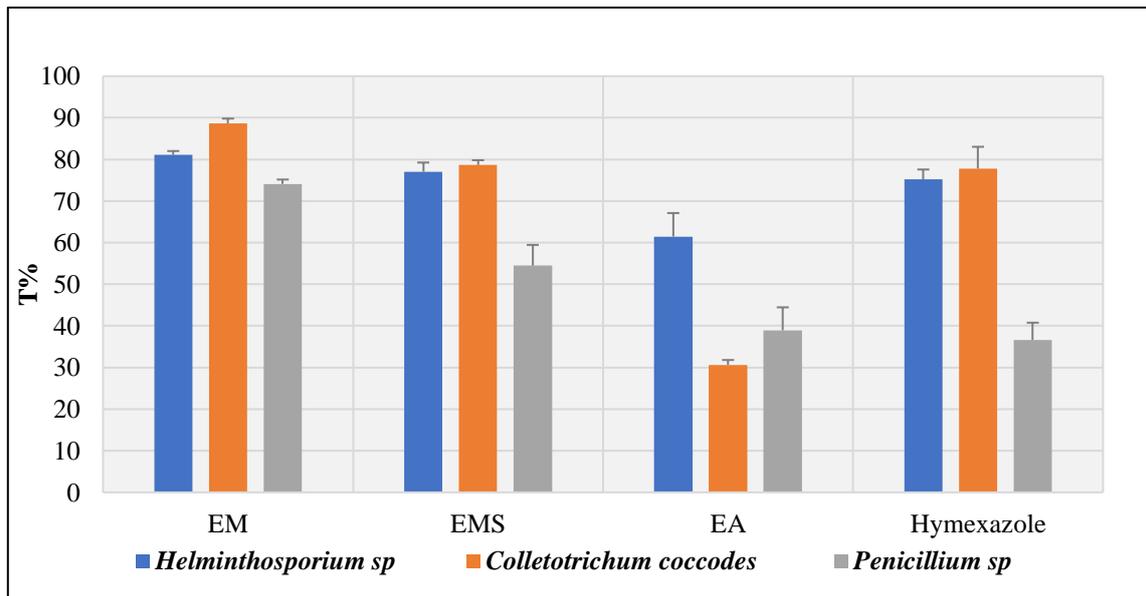


Fig. 30 : Taux d'inhibition provoqués par les extraits de *Rosmarinus eriocalyx* sur les souches des autres genres

➤ **Sur le genre *Pseudomonas***

L'effet antibactérien de l'EM s'est montré extrêmement actif, vis-à-vis *Pseudomonas sp 2* et *Pseudomonas sp 5* (Tab. 22) où aucune croissance n'a été détecté. En revanche, l'EA s'est avéré moins efficace et n'a pas exprimé d'effet sur la croissance des souches testées. Toutefois le pesticide de synthèse testé a montré une inhibition de la croissance sur les trois espèces *Pseudomonas sp 1*, *Pseudomonas sp 3*, *Pseudomonas sp 4* alors qu'il semble inefficace contre *Pseudomonas sp 2* et *Pseudomonas sp 5*.

Tab. 22 : L'inhibition de la croissance provoquée par les extraits de *Rosmarinus eriocalyx* sur les souches genre *Pseudomonas*

Genre et espèce	EM	EA	Hymexazole	Témoin
<i>Pseudomonas sp 1</i>	+	++	-	+++
<i>Pseudomonas sp 2</i>	-	++	++	+++
<i>Pseudomonas sp 3</i>	+	++	-	+++
<i>Pseudomonas sp 4</i>	+	++	-	+++
<i>Pseudomonas sp 5</i>	-	++	++	+++

(+) : Présence de bactérie, (-) : Absence de bactérie

3.4.3. Evaluation de l'effet fongistatique/fongicide et bactériostatique/bactéricide par la détermination des CMI, CMF, CMB

Avant de déterminer les CMI, CMF, CMB, nous avons d'abord calculé les densités optiques des différentes souches en croissance dans les tubes (**Tab. 23, Tab. 25, Tab. 27, Tab. 29, Tab. 31**). Les concentrations minimales inhibitrices et les concentrations minimales fongicides varient selon la nature de la souche. Il est évident que les espèces microbiennes réagissent différemment aux différentes substances puisqu'elles ne possèdent pas les potentialités métaboliques. Certes ce sont les concentrations les moins élevées qui sont les moins efficaces alors que les concentrations élevées qui sont les plus efficaces.

Ce sont les *Aspergillus* qui semblent avoir des CMI les moins élevées. La valeur la plus faible a été obtenue pour *Aspergillus terreus* et *Aspergillus flavus* (CMI= 0,062mg/ml pour les deux souches). Les CMF sont également assez faibles et sont situés dans un intervalle de 0,125mg/ml à 0,5mg/ml. A partir de nos résultats, les différentes concentrations testées qui ont été obtenues à partir de la solution mère initiale de l'extrait du *Rosmarinus eriocalyx*, nous n'avons pas pu déceler de CMF pour *Aspergillus nidulans*, toutes les concentrations d'extraits testés ne sont pas très efficaces pour détruire les 99,99% des populations de ce champignon.

Parallèlement, les CMI et les CMF des *Fusarium* ont l'air d'être plus élevées. Les CMI sont comprises entre 0,125mg/ml et 0,5mg/ml et les CMF sont relativement plus élevés que celles de toutes les autres souches. Les valeurs sont égales à 1mg/ml pour *Fusarium graminearum* et *Fusarium verticilloides*, les deux autres espèces *Fusarium proliferatum* et *Fusarium oxysporum* n'ont pas pu être complètement inhibées par les concentrations testées. Les *Alternaria* ainsi que les autres genres *Colletotrichum cocodes*, *Hemionthosporium sp* et *Penicillium sp* ont des valeurs de CMI et de CMF assez faibles par rapport à celles des *Aspergillus* et des *Fusarium* avec tout de même des CMF non négligeables pour certaines d'entre elles avec des valeurs de 0,5 à 0,25mg/ml.

Concernant le genre *Pseudomonas* et selon les résultats du **Tab. 32**, la concentration 0,062mg/ml présente la CMI pour les trois souches, *Pseudomonas sp 1*, *Pseudomonas sp 2*, *Pseudomonas sp 4*. Par ailleurs, *Pseudomonas sp 3* et *Pseudomonas sp 5* ont enregistré la CMI la plus faible de l'ordre de 0,031mg/ml. Les CMB obtenues pour les souches testées s'échelonnent entre 0,0062mg/ml et 0,5mg/ml. Notons que la concentration 0,125mg/ml est la CMB pour *Pseudomonas sp 2* et *Pseudomonas sp 5* respectivement.

➤ Sur le genre *Aspergillus*

Tab 23 : La densité optique (D.O) de l'activité en milieu liquide sur les souches d'*Aspergillus*

Genre et espèces	1 mg/ml	0,5 mg/ml	0,25 mg/ml	0,125 mg/ml	0,062 mg/ml	0,031 mg/ml	Hymexazole	Témoin
<i>Aspergillus terreus</i>	0,007f ± 0,003	0,027e ± 0,004	0,0476e ± 0,005	0,082d ± 0,007	0,13c ± 0,018	0,14b ± 0,005	0,147c± 0,004	2,470a ±0,039
<i>Aspergillus ochraceus</i>	0,01e ±0,009	0,08d ±0,008	0,13c ±0,008	0,139c c±0,01	0,162c ±0,007	1,942b ±0,01	0,008f ±0,003	2,648a ±0,004
<i>Aspergillus nidulans</i>	0,121e ±0,023	0,133d ±0,03	0,147d ±0,023	0,165c ±0,016	1,142b ±0,005	2,232a ±0,014	0,014f ±0,003	2,114a ±0,007
<i>Aspergillus flavus</i>	0,012d ±0,008	0,013cd ±0,013	0,025c ±0,013	0,09d ±0,005	0,147b ±0,013	0,167b ±0,04	0,126b ±0,007	2,219a ±0,008

Tab. 24 : Les CMI/ CMF des souches d'*Aspergillus*

Genre et espèce	1 mg/ml	0,5 mg/ml	0,25 mg/ml	0,125 mg/ml	0,062 mg/ml	0,031 mg/ml	Hymexazole	Témoin
<i>Aspergillus terreus</i>	8,75.10 ³	3,38.10 ⁴	5,88.10 ⁴	3,9.10 ⁴ 	1,62. 10 ⁵	1,75. 10 ⁵ 	5,9.10 ⁵	3,09.10 ⁸
<i>Aspergillus ochraceus</i>	12,5. 10 ³	10 ⁴ 	16,25.10 ⁵	17,3.10 ⁵	2,03. 10 ⁵ 	3,42.10 ⁶	10 ³	3,31.10 ⁸
<i>Aspergillus nidulans</i>	1,51.10 ⁵	1,66.10 ⁵	1,83.10 ⁵	2,06.10 ⁵ 	14,28.10 ⁷	2,79.10 ⁸	1,75.10 ⁴	2,64.10 ⁸
<i>Aspergillus flavus</i>	15.10 ⁴	16,25.10 ⁴	31,25.10 ⁴ 	1,12.10 ⁵	1,8.10 ⁵	2,08. 10 ⁵ 	1,58.10 ⁵	2,77.10 ⁸

Chapitre II : Etude de l'activité antimicrobienne

➤ Sur le genre *Fusarium*

Tab. 25 : La densité optique (D.O) de l'activité en milieu liquide sur les souches de *Fusarium* sp

Genre et espèce	Les concentrations de l'EM						Hymexazole	Témoin
	1 mg/ml	0,5 mg/ml	0,25 mg/ml	0,125 mg/ml	0,062 mg/ml	0,031 mg/ml	20µl	Témoin
<i>Fusarium graminearum</i>	0,010d ±0,003	0,105d ±0,003	0,114d ±0,003	0,263c ±0,011	0,396b ±0,017	2,65a ±0,014	0,408b ±0,06	2,543a ±0,017
<i>Fusarium verticilloides</i>	0,075e ±0,009	0,086e ±0,007	0,124d ±0,006	0,142d ±0,01	0,22c ±0,003	0,443b ±0,01	0,073e ±0,007	2,84a ±0,013
<i>Fusarium proliferatum</i>	0,119d ±0,004	0,171de ±0,049	0,228cde ±0,003	0,271cd ±0,011	0,335c ±0,009	0,592b ±0,025	0,095e ±0,008	2,975a ±0,13
<i>Fusarium Oxysporum</i>	0,109e ±0,003	0,126de ±0,005	0,145cd ±0,02	0,367bc ±0,016	0,421b ±0,008	2,857a ±0,256	0,264c ±0,008	2,77a ±0,13

Tableau 26 : Les CMI/ CMF des souches de *Fusarium* sp

Genre et espèce	1 mg/ml	0,5 mg/ml	0,25 mg/ml	0,125 mg/ml	0,062 mg/ml	0,031 mg/ml	Hymexazole	Témoin
<i>Fusarium graminearum</i>	1,26.10 ⁴ 	1,31.10 ⁵	1,42. 10 ⁵ 	3,28.10 ⁶	4,94.10 ⁶	3,31.10 ⁸	5,1.10 ⁶	2,18.10 ⁸
<i>Fusarium verticilloides</i>	9,4. 10 ⁴ 	10,8. 10 ⁴	1,55.10 ⁵	1,78. 10 ⁵ 	2,75.10 ⁶	5,54.10 ⁶	0,91.10 ⁴	3,55.10 ⁸
<i>Fusarium Prolifetatum</i>	1,49.10 ⁵	2,13.10 ⁵ 	2,85.10 ⁶	3,39. 10 ⁶	4,18.10 ⁶	7,4.10 ⁶	1,19.10 ⁴	2,72.10 ⁸
<i>Fusarium oxysporum</i>	1,36. 10 ⁵	1,58. 10 ⁵	1,81. 10 ⁵ 	4,59.10 ⁶	5,26.10 ⁶	3,57.10 ⁸	3,3.10 ⁶	3,46.10 ⁸

➤ Sur le genre *Alternaria*

Tab. 27 : La densité optique (D.O) de l'activité en milieu liquide sur les souches de *Fusarium*

Genre et espèce	Les concentrations de l'EM						Hymexazole	Témoin
	1 mg/ml	0,5 mg/ml	0,25 mg/ml	0,125 mg/ml	0,062 mg/ml	0,031 mg/ml	20µl	Témoin
<i>Alternaria alternata 1</i>	0,038 ±0,006	0,058 ±0,006	0,061 ±0,003	0,071 ±0,003	0,073 ±0,003	0,325 ±0,008	0,045 ±0,008	2,365 ±0,001
<i>Alternaria alternata 2</i>	0,047 ±0,014	0,062 ±0,014	0,109 ±0,003	0,124 ±0,002	0,334 ±0,002	1,371 ±0,002	0,049 ±0,006	1,32 ±0,001
<i>Alternaria tenuissima</i>	0,041 ±0,006	0,063 ±0,001	0,078 ±0,002	0,090 ±0,004	0,19 ±0,004	2,336 ±0,001	0,063 ±0,01	2,163 ±0,006
<i>Alternaria arborescens</i>	0,047 ±0,003	0,061 ±0,004	0,082 ±0,004	0,107 ±0,004	0,129 ±0,004	0,131 ±0,004	0,061 ±0,006	2,389 ±0,001

Tab. 28 : Les CMI/ CMF des souches d'*Alternaria*

	1 mg/ml	0,5 mg/ml	0,25 mg/ml	0,125 mg/ml	0,062 mg/ml	0,031 mg/ml	Hymexazole	Témoin
<i>Alternaria alternata 1</i>	4,8.10 ⁴	7,2.10 ⁴	7,6.10 ⁴	8,8.10 ⁴ 	9,1.10 ⁴ 	4,06.10 ⁶	6,5.10 ⁴	2,95.10 ⁸
<i>Alternaria alternata 2</i>	5,9.10 ⁴	7,75.10 ⁴ 	1,36.10 ⁵	1,55.10 ⁵ 	4,17.10 ⁶	1,71.10 ⁷	6,1.10 ⁴	1,65.10 ⁷
<i>Alternaria tenuissima</i>	5,1.10 ⁴	7,8.10 ⁴	9,8.10 ⁴	1,13.10 ⁴ 	2,37.10 ⁵ 	4,2.10 ⁸	0,78.10 ⁴	2,07.10 ⁸
<i>Alternaria arborescens</i>	5,9.10 ⁴	7,6.10 ⁴	1,02.10 ⁴ 	1,33.10 ⁵ 	1,61.10 ⁵	1,63.10 ⁵	0,76.10 ⁴	4,86.10 ⁶

➤ Sur les autres genres

Tab. 29 : La densité optique (D.O) de l'activité en milieu liquide sur les souches des autres genres

Genre et espèce	Les concentrations de l'EM						Hymexazole	Témoin
	1 mg/ml	0,5 mg/ml	0,25 mg/ml	0,125 mg/ml	0,062 mg/ml	0,031 mg/ml	20µl	Témoin
<i>Colletotrichum coccodes</i>	0,02 ^e ±0,03	0,063d ±0,01	0,167c ±0,008	0,182c ±0,012	0,191c ±0,008	0,434b ±0,008	0,027e ±0,008	2,094a ±0,019
<i>Helminthosprrium sp</i>	0,003d ±0,066	0,113cd ±0,004	0,168bc ±0,016	0,186bc ±0,007	0,257b ±0,022	0,294b ±0,03	0,01d ±0,001	2,452a ±0,125
<i>Penicillium sp</i>	0,025 ^e ±0,003	0,032 ^e ±0,003	0,04 ^e ±0,003	0,108d ±0,006	0,267c ±0,006	0,316b ±0,01	0,016e ±0,004	1,07a ±0,02

Tab. 30 : Les CMI/ CMF des souches des autres genres

Genre et espèce	1 mg/ml	0,5 mg/ml	0,25 mg/ml	0,125 mg/ml	0,062 mg/ml	0,031 mg/ml	Hymexazole	Témoin
<i>Colletotrichum coccodes</i>	2,5.10 ³	7,8.10 ³ 	2,09.10 ⁵	2,28. 10 ⁵	2,39.10 ⁵ 	5,52. 10 ⁶	3,3.10 ³	2,62.10 ⁸
<i>Helminthosprrium sp</i>	3,75.10 ³	1,41.10 ³ 	2,1.10 ⁵	2,32.10 ⁵ 	3,21.10 ⁶	3,67. 10 ⁶	1,25.10 ³	3,06.10 ⁸
<i>Penicillium sp</i>	3,1.10 ³	4.10 ³	5.10 ⁴ 	1,35. 10 ⁵ 	3,33.10 ⁶	3,95.10 ⁶	2.10 ³	1,4.10 ⁸

➤ Sur le genre *Pseudomonas*

Tab. 31 : La densité optique (D.O) de l'activité en milieu liquide sur les souches de *Pseudomonas*

Genre et espèce	1 mg/ml	0,5 mg/ml	0,25 mg/ml	0,125 mg/ml	0,062 mg/ml	0,031 mg/ml	Hymexazole	Témoin
<i>Pseudomonas sp 1</i>	0,024e±0,011	0,031d±0,005	0,037d±0,008	0,042d±0,006	0,075c±0,003	0,291b±0,006	0,031d±0,014	1,702a±0,93
<i>Pseudomonas sp 2</i>	0,002f0±0,005	0,003e±0,011	0,033e±0,004	0,040d±0,002	0,06c±0,01	0,198c±0,007	0,91b±0,07	2,657a±0,063
<i>Pseudomonas sp 3</i>	0,001e±0,014	0,002e±0,007	0,044d±0,01	0,056c±0,011	0,076c±0,006	0,087c±0,022	0,96b±0,03	2,609a±0,86
<i>Pseudomonas sp 4</i>	0,024f±0,008	0,026f±0,007	0,037e±0,012	0,040d±0,005	0,092c±0,023	0,259b±0,061	0,352b±0,06	1,837a±0,51
<i>Pseudomonas sp 5</i>	0,005e±0,006	0,029d±0,005	0,042c±0,014	0,05c±0,001	0,087b±0,004	0,089b±0,005	0,004e±0,007	1,964a±0,072

Tab. 32 : Les CMI/ CMF des souches de *Pseudomonas*

Genre et espèce	1 mg/ml	0,5 mg/ml	0,25 mg/ml	0,125 mg/ml	0,062 mg/ml	0,031 mg/ml	Hymexazole	Témoin
<i>Pseudomonas sp 1</i>	3.10 ³	3,88. 10 ³	4,63.10 ³ 	5,25.10 ³	9,4.10 ⁴ 	12.10 ⁶	3,9.10 ³	2.10 ⁹
<i>Pseudomonas sp 2</i>	2,7.10 ²	4,12.10 ²	4,4.10 ³	5.10 ³ 	7,5.10 ³ 	8,5.10 ⁵	1,12.10 ⁶	3,3.10 ⁹
<i>Pseudomonas sp 3</i>	18.10 ²	32,5.10 ²	5,5.10 ³	7.10 ³	9,5.10 ³ 	10,8.10 ⁴ 	1,02.10 ⁶	32,6.10 ⁹
<i>Pseudomonas sp 4</i>	3.10 ³	3,25.10 ³ 	46,3.10 ³	5.10 ⁴	6,5.10 ⁴ 	1,98.10 ⁶	4,4.10 ⁵	22,9.10 ⁹
<i>Pseudomonas sp 5</i>	31.10 ²	36,25.10 ³	5,25.10 ³	6,25.10 ³ 	8,38.10 ⁴	11,1.10 ⁴ 	5,5.10 ²	4.10 ⁹

3.4.4. Détermination des cinétiques de croissance des souches microbiennes en mode batch sur milieu discontinu non renouvelé

La culture en Batch est une technique qui a été exploitée pour la première fois dans l'évaluation des activités antimicrobiennes des extraits végétaux. Cette méthode est utilisée en microbiologie pour augmenter la multiplication des microorganismes pour la production de biomasse ou pour la production de métabolites. La culture dans les fioles d'Erlenmeyer comme pour les bioréacteurs industriels, elle est d'une grande fiabilité puisqu'elle permet de contrôler les conditions de cultures. Ce mode batch a été déjà utilisé dans le domaine de la biodégradation des pesticides par les microorganismes (bactéries et champignons) (Bordjiba, 2003).

L'objectif visé ici était la détermination de l'effet antimicrobien via le comportement et les potentialités de nos souches phytopathogènes (tolérance, résistance, sensibilité) lorsqu'elles sont soumises à l'effet des extraits du romarin au cours d'une période de culture de 96h dans les conditions contrôlées. Les paramètres étudiés sont : la densité optique, le pH des milieux de culture et le calcul du poids sec de l'inoculum.

➤ Sur le genre *Aspergillus*

A partir des résultats obtenus, on constate que cette méthode vient consolider les résultats précédents où il a été noté, une activité antifongistatique assez intéressante. Selon la (Fig. 31), l'EM et le pesticide ont exercé un effet similaire sur l'inhibition de la croissance d'*Aspergillus terreus* avec une densité optique (D.O) de 0,332 et 0.342 après 96h. L'EA a montré un effet moins important puisque la densité enregistrée est de 1,65 à 96h. un pH de 3,14 à 5,52 a été enregistré après 4 jours de culture. On remarque une acidification du milieu en fonction du temps. Dans le cas d'*Aspergillus ochraceus*, tous les traitements (pesticide et extraits) se sont avérés efficaces dès 48h avec des D. O comprises entre 0,30 et 0,032 (Annexe II).. Les densités optiques calculées après 96 h montrent un pouvoir accentué pour le pesticide chimique suivi de celui de l'EM et un effet moindre pour l'EA avec des D.O s'échelonnant entre 0,188 et 1,18 (Fig. 33).

L'allure des cinétiques des densités optiques des deux souches *Aspergillus nidulans* et *Aspergillus flavus* semblent assez similaires pour l'EM et le pesticide avec des D.O très inférieures à celles des témoins (1,27 et 1,168). En outre, on constate une augmentation après 96h. En ce qui concerne l'EA, il paraît plus efficace entre 48h et 72h avec des D.O ne dépassant pas 1,03. Pour ce qui est du pH, on dénote une acidification du milieu aussi bien pour l'extrait

aqueux que pour le pesticide synthétique. Contrairement, une légère augmentions du pH a été mesurée dans les milieux traités par l'EM. (Fig. 36, Fig. 38).

Si nous nous reportons aux valeurs des poids sec de l'inoculum présentées dans la Fig. 39 et calculées à la fin de l'expérimentation, on note une diminution dans les chiffres pour l'EM et l'hyméxazol par comparaison aux témoins. Les meilleurs résultats ont été obtenus pour *Aspergillus terreus* en présence de l'EM (104,23mg) d'une part, et pour *Aspergillus nidulans* (76,31mg) lorsqu'il est soumis à l'effet de l'Hemyxazole d'autre part.

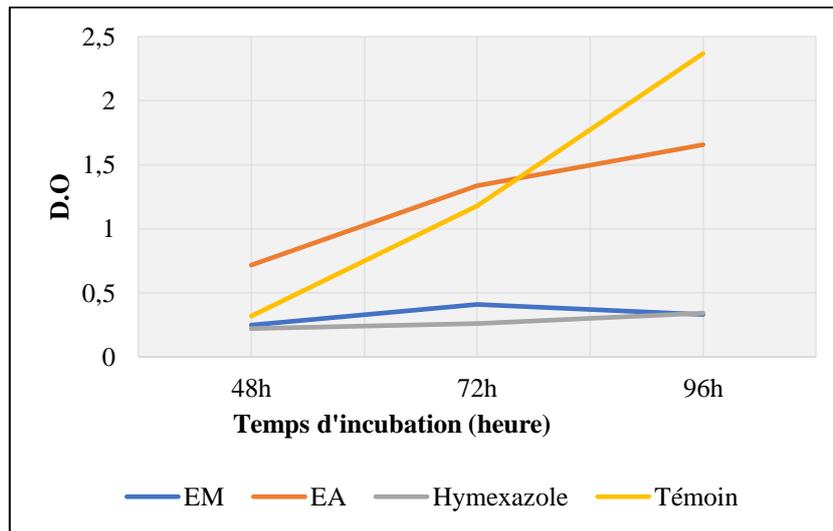


Fig. 31 : Cinétique de croissance d'*Aspergillus terreus* provoqué par les extraits de *Rosmarinus eriocalyx*

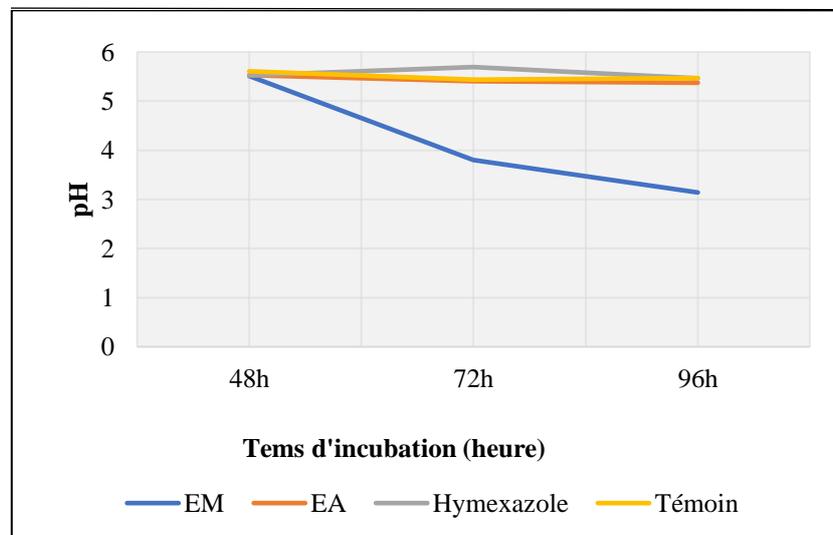


Fig. 32 : Cinétique du pH d'*Aspergillus terreus* provoqué par les extraits de *Rosmarinus eriocalyx*

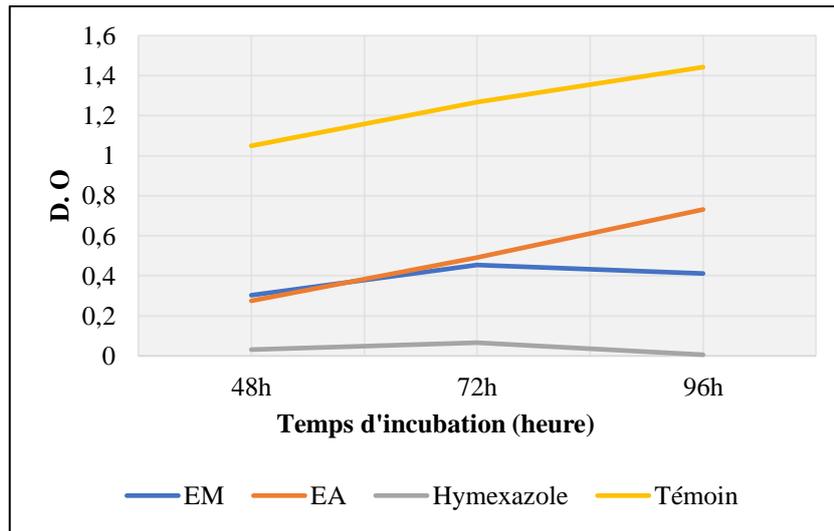


Fig. 33 : Cinétique de croissance d'*Aspergillus ochraceus* provoqué par les extraits de *Rosmarinus eriocalyx*

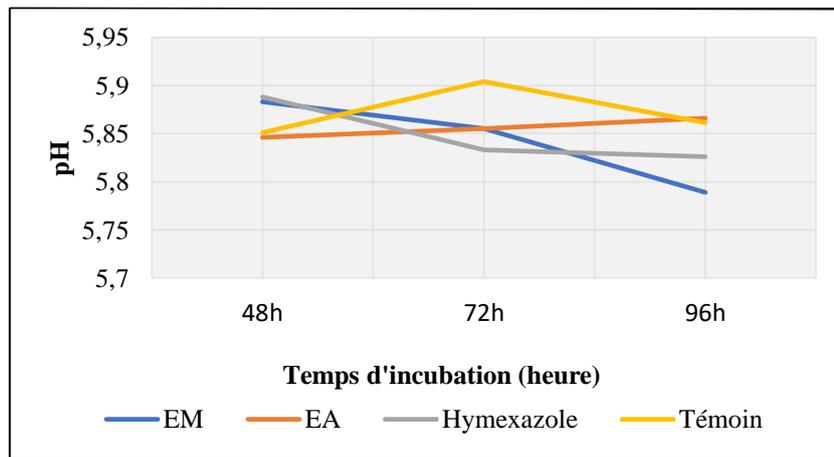


Fig. 34 : Cinétique du pH d'*Aspergillus ochraceus* provoqué par les extraits de *Rosmarinus eriocalyx*

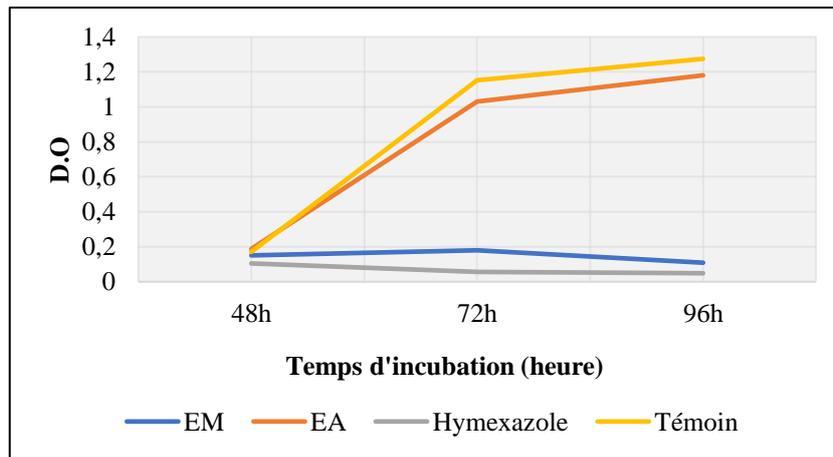


Fig. 35 : Cinétique de croissance d'*Aspergillus nidulans* provoqué par les extraits de *Rosmarinus eriocalyx*

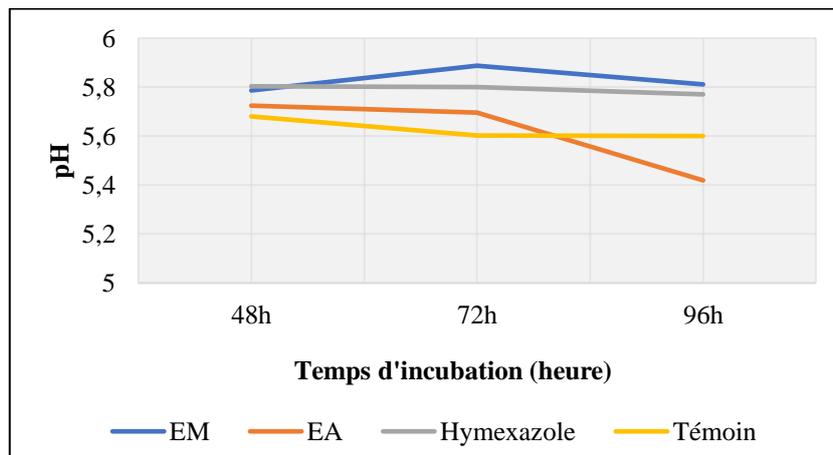


Fig. 36 : Cinétique du pH d'*Aspergillus nidulans* provoqué par les extraits de *Rosmarinus eriocalyx*

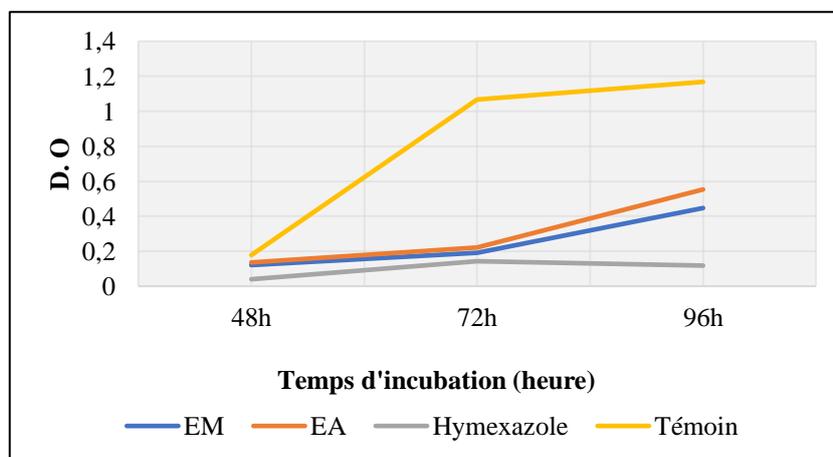


Fig. 37 : Cinétique de croissance d'*Aspergillus flavus* provoqué par les extraits de *Rosmarinus eriocalyx*

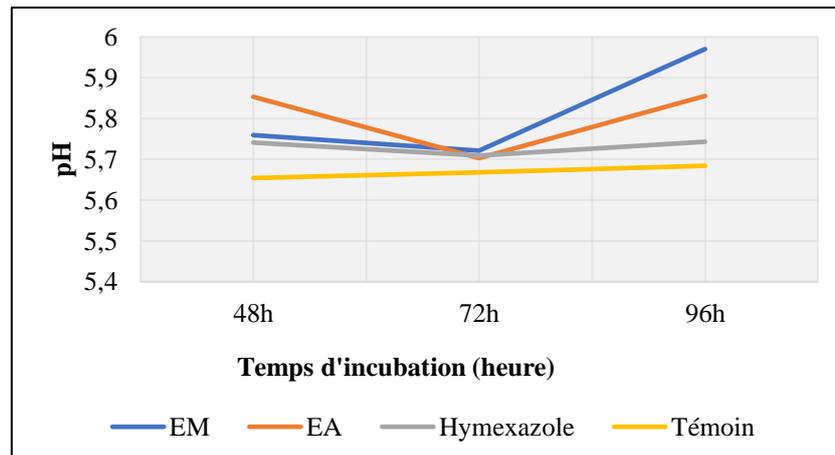


Fig. 38 : Cinétique du pH d'*Aspergillus flavus* provoqué par les extraits de *Rosmarinus eriocalyx*

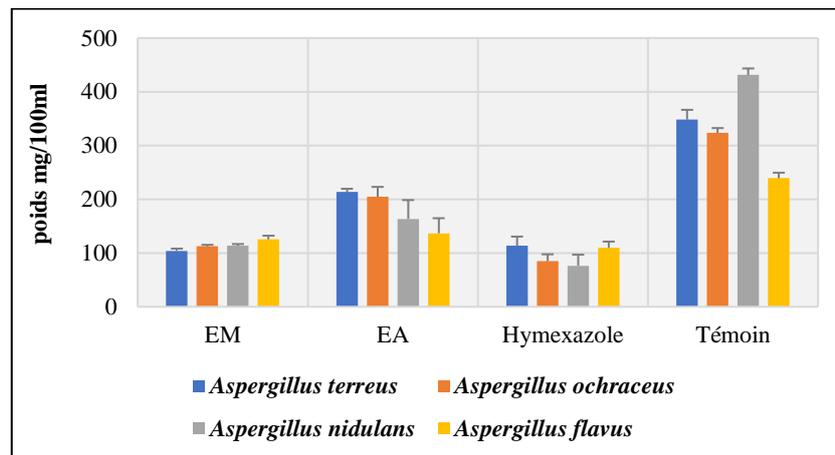


Fig. 39 : le poids de l'inoculum des cultures des souches d'*Aspergillus* provoqué par les extraits de *Rosmarinus eriocalyx*

➤ **Sur le genre *Fusarium***

Les cinétiques déterminées en mode batch ont exprimé une activité inhibitrice très importante pour l'EM contre *Fusarium verticilloides* après un temps de 72h avec une D.O de 0.40 (**Fig. 40**) plus faible que celle du pesticide (1,93), cet effet s'est poursuivi même après les 96 H ce qui signifie que les souches de *Fusarium verticilloides* ont été affectées par l'EM. L'EA a montré une efficacité importante au début de l'expérience (D.O = 0,07 à 48 h).

Les deux traitements employés (EM et EA) ont provoqué une légère augmentation du pH par rapport aux deux témoins de références (pesticide et le témoin négatif). Cependant le milieu de culture reste dans tous les cas assez acide (**Fig. 41**). Cette réduction de la D.O s'est traduite par une réduction du poids sec de l'inoculum de départ. Le poids sec calculés est de l'ordre de

85,45mg/ml face à l'EM et de 156,94mg/ml en face de l'EA (**Fig. 48**). Une sensibilité du *Fusarium oxysporum* face à l'EM a débuté à partir de 48h (D.O =1,35). La D.O a atteint la valeur de 0,635 après 96h. Ces résultats indiquent un potentiel inhibiteur progressif de l'EM.

Le pesticide n'a révélé qu'une faible activité antifongique (**Fig. 42**) avec une D.O de 1,278 après 96h. D'une manière globale, l'EA, s'est montré moins actif (**Fig. 42**). L'analyse du pH du milieu contenant l'EM a entraîné une augmentation de l'acidité avec une valeur de 6,961 (**Fig. 43**) par rapport au témoin qui est d'environ 6,63. Pour ce qui est du poids de l'inoculum mesuré à la fin de l'expérimentation en présence du *Fusarium oxysporum*, il indique une forte activité antifongique représentée par un poids de 131,25 mg devant une valeur de 329,56 mg pour le témoin sans pesticide et sans extrait.

Les résultats sont assez semblables pour l'EM et l'Hymexazole durant les 96h d'analyse pour *Fusarium graminearum* ; les D.O décelées sont égales à 1,22 et 1,07 respectivement. L'EA reste toujours moins efficient que les autres substances (**Fig. 44**). Concernant le pH, on relève une variation très modeste dans tous les traitements et à tous les temps. La souche de *Fusarium proliferatum* a engendré une diminution de la croissance évaluée à partir des différentes D.O à 72 h pour l'EM par rapport au pesticide qui a exhibé un pouvoir meilleur pendant les 96h (**Fig. 46**). Les D.O déterminée se situent entre 0,21 et 0,55. Une augmentation du pH a été détectée dans tous les cas et durant toute l'expérimentation.

Les poids les moins importants pour les deux souches *Fusarium proliferatum* et *Fusarium graminearum* ont été obtenus pour le pesticide et l'EM avec une accentuation de l'effet pour le pesticide. Les valeurs respectives sont de 116,18 mg et 146,74 mg pour le pesticide, 146,28 mg et 179,88 mg pour l'EM devant 306,43 mg et 236,39 mg pour les témoins non traités (**Fig. 48**)

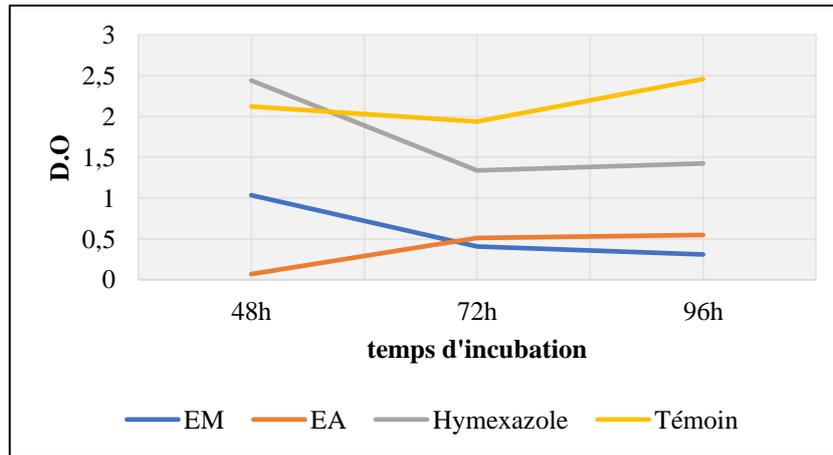


Fig. 40 : Cinétique de croissance de *Fusarium verticilloides* provoqué par les extraits de *Rosmarinus eriocalyx*

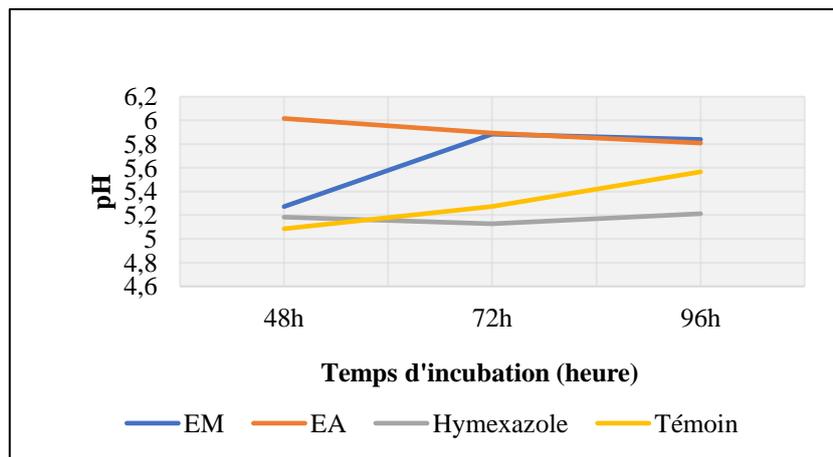


Fig. 41 : cinétique du pH de *Fusarium verticilloides* sous l'effet des extraits et de l'Hymexazole

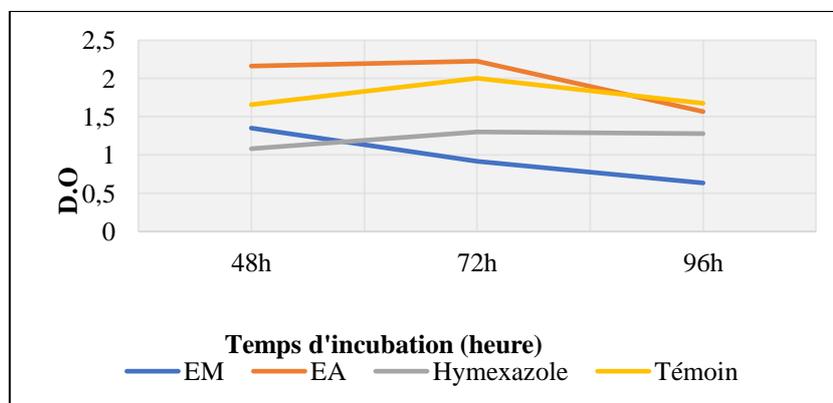


Fig.42 : Cinétique de croissance de *Fusarium oxysporum* sous l'effet des extraits et de l'Hymexazole

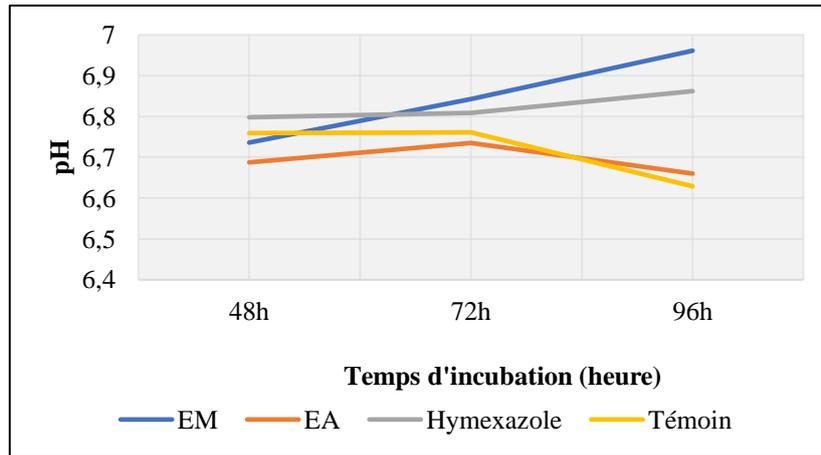


Fig. 43 : Cinétique de pH de *Fusarium oxysporum* provoqué par les extraits de *Rosmarinus eriocalyx*

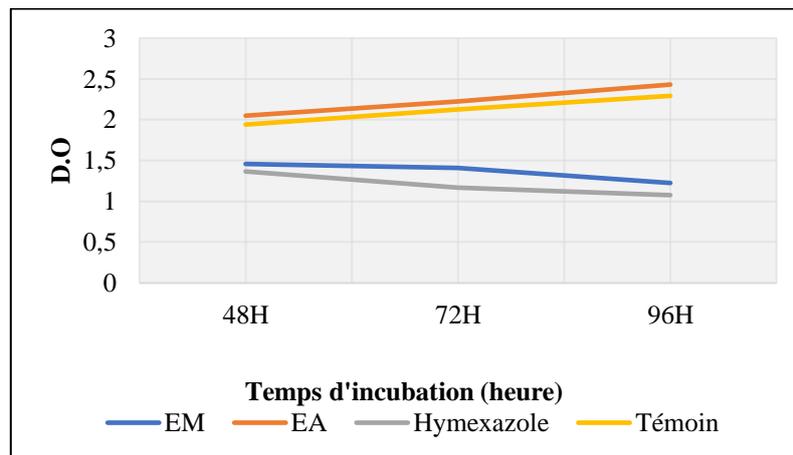


Fig. 44 : Cinétique de croissance de *Fusarium graminearum* provoqué par les extraits de *Rosmarinus eriocalyx*

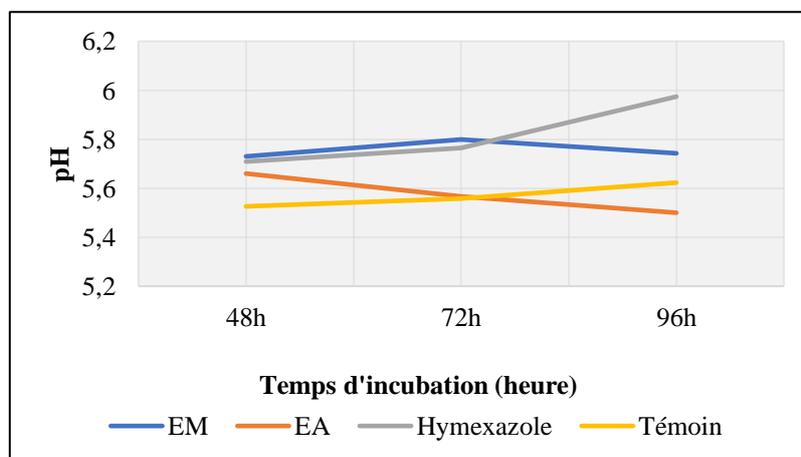


Fig. 45 : Cinétique du pH de *Fusarium graminearum* provoqué par les extraits de *Rosmarinus eriocalyx*

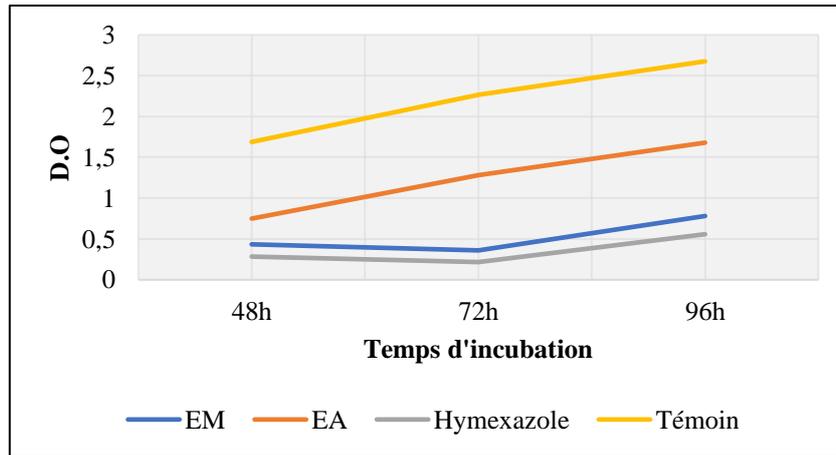


Fig.46 : Cinétique de croissance de *Fusarium proliferatum* provoqué par les extraits de *Rosmarinus eriocalyx*

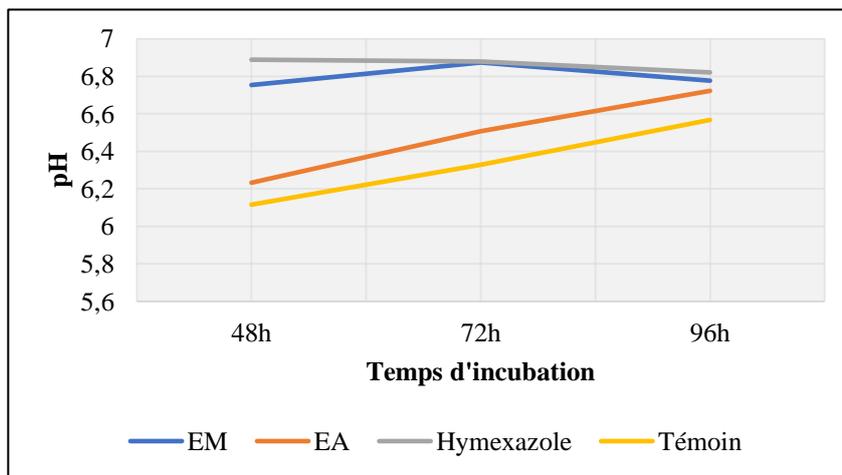


Fig. 47 : Cinétique du pH de *Fusarium proliferatum* provoqué par les extraits de *Rosmarinus eriocalyx*

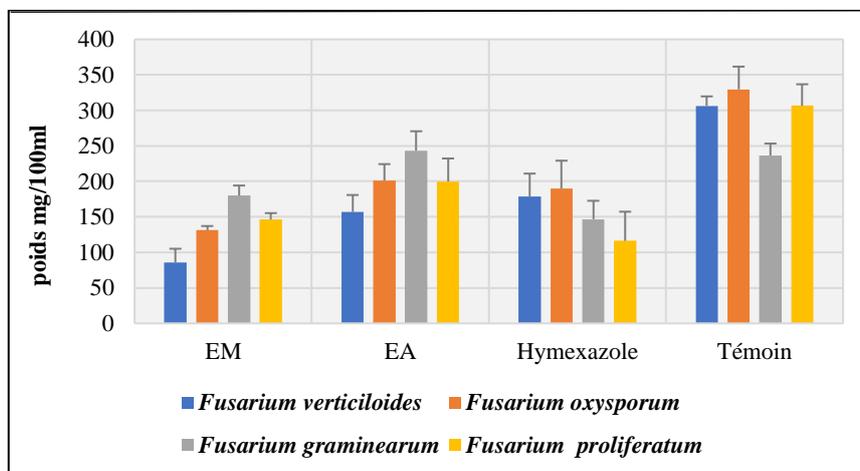


Fig. 48 : le poids de l'inoculum des cultures des souches du genre *Fusarium* provoqué par les extraits de *Rosmarinus eriocalyx*

➤ **Sur le genre *Alternaria***

Les résultats obtenus montrent que l'activité antifongique des extraits testés varie selon la nature de la souche. La souche d'*Alternaria alternata* 1 semble la plus sensible à l'EM. Les densités mesurées varient entre 0.431 à 48h et 0.046 72h après 72 h (**Fig. 49**). L'EM a un effet assez proche de celui de la molécule du pesticide conventionnel (0.022). L'analyse statistique de Tukey (P) révèle des différences significatives entre les deux substances. Pour ce qui est du pH, il y a une augmentation dans le cas du milieu inoculé par l'EM et une diminution du pH dans le cas du milieu inoculé par le pesticide de synthèse (**Fig. 50**).

Le test de Tukey révèle également des différences significatives dans les résultats du pH entre les deux traitements ($p < 0.0001$). Pour ce qui est de la souche *Alternaria alternata* 2, on remarque selon les données illustrées dans (**Fig. 51**) que la densité optique diminue jusqu'à atteindre un niveau bas (0.031) contrairement à la valeur enregistrée par l'échantillon témoin non soumis aux substances analysées (1.996).

Quant à la densité optique enregistrée à partir du milieu supplémenté avec le pesticide, elle se rapproche de celle de l'échantillon traité par l'EM (0.015). Après 72 h d'incubation, la turbidité du milieu contenant la souche *Alternaria alternata* 2 augmente légèrement aussi bien pour le témoin (2.069) que pour l'EM (0,135). A partir de 72h, on remarque, une élévation du pH du milieu injecté par l'extrait de la plante et une baisse de pH pour le témoin. D'une manière globale, l'acidité de la solution supplémentée par l'extrait du romarin est plus accentuée que celles des deux autres suspensions analysées (supplémentée de pesticide et de l'EA) (**Fig. 52**).

Une diminution du poids de l'inoculum pour l'EM et le pesticide signifiant une inhibition du développement de la souche d'*Alternaria alternata* 2 mais cette inhibition est plus prononcée pour le pesticide synthétique. La turbidité d'*Alternaria tenuissima* révélée par les densités optiques montre que l'Hymexazole semble plus efficace le développement de cette espèce fongique, la D. O est de 0,027 alors qu'elle est de 0.482 pour l'EM (**Fig. 53**). Cette efficacité du pesticide de synthèse a été également exprimée par une acidité accrue due à une baisse de pH avec 5,6 (**Fig. 54**). Ce fort pouvoir antifongique de l'Hymexazole a été également noté sur la souche d'*Alternaria arborescens*. Par ailleurs, un pouvoir du même ordre a été détecté à partir des suspensions supplémentées par l'EM. Une turbidité faible et stationnaire même après un temps d'incubation de 72h (0,053 EM et 0,03 pesticide) (**Fig. 55**).

Les valeurs du pH n'indiquent pas par contre une augmentation de l'acidité. Les valeurs s'échelonnent de 6,06 à 6,431 pour L'EM, de 5,893 à 5,736 pour L'EA et de 5,933 à 5,348 pour Le pesticide de synthèse (Fig. 56). Les tests statistiques montrent des différences hautement ou très hautement significatives ($p < 0.05$).

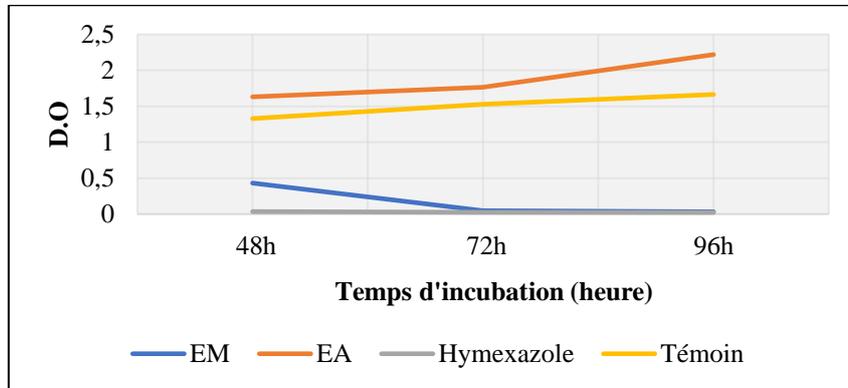


Fig. 49 : Cinétique de croissance d'*Alternaria alternata* 1 provoqué par les extraits de *Rosmarinus eriocalyx*

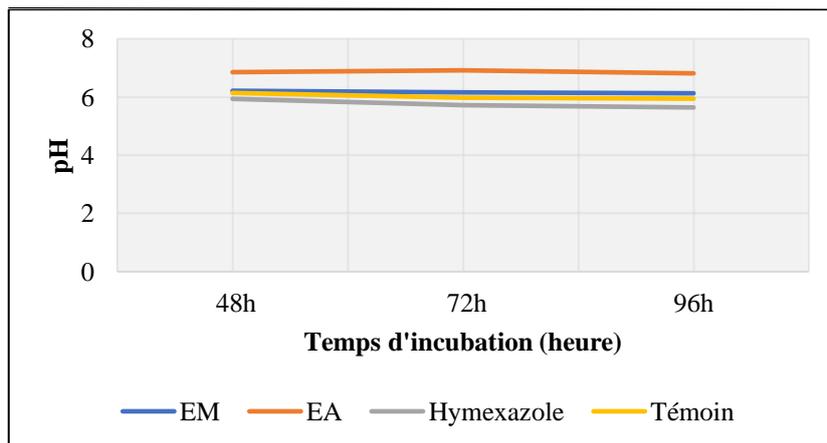


Fig. 50 : Cinétique du pH d'*Alternaria alternata* 1 provoqué par les extraits de *Rosmarinus eriocalyx*

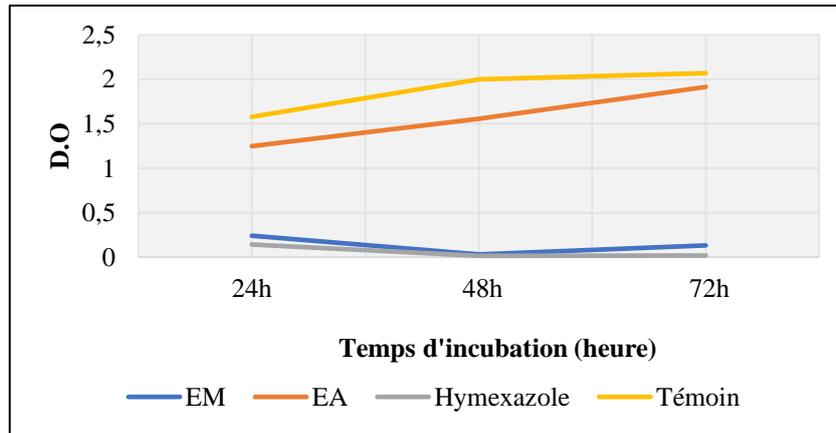


Fig. 51 : Cinétique de croissance d'*Alternaria alternata* 2 provoqué par les extraits de *Rosmarinus eriocalyx*

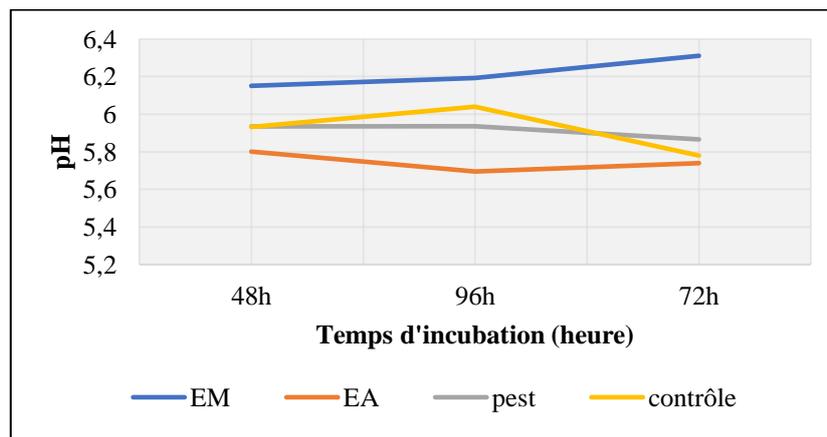


Fig. 52 : Cinétique du pH d'*Alternaria alternata* 2 provoqué par les extraits de *Rosmarinus eriocalyx*

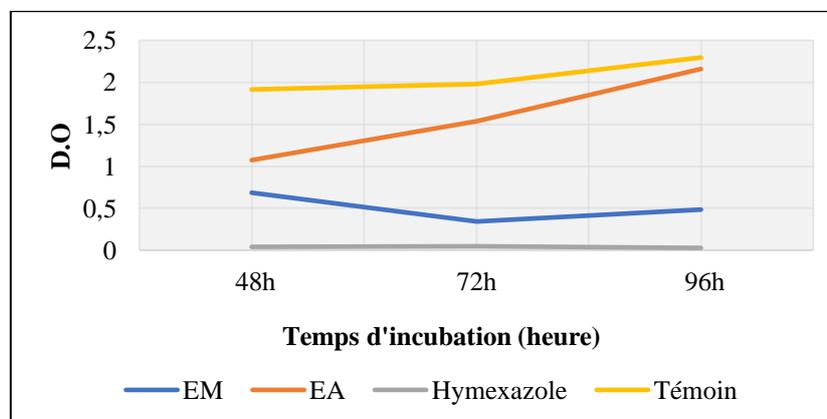


Fig. 53 : Cinétique de croissance d'*Alternaria tenuissima* provoqué par les extraits de *Rosmarinus eriocalyx*

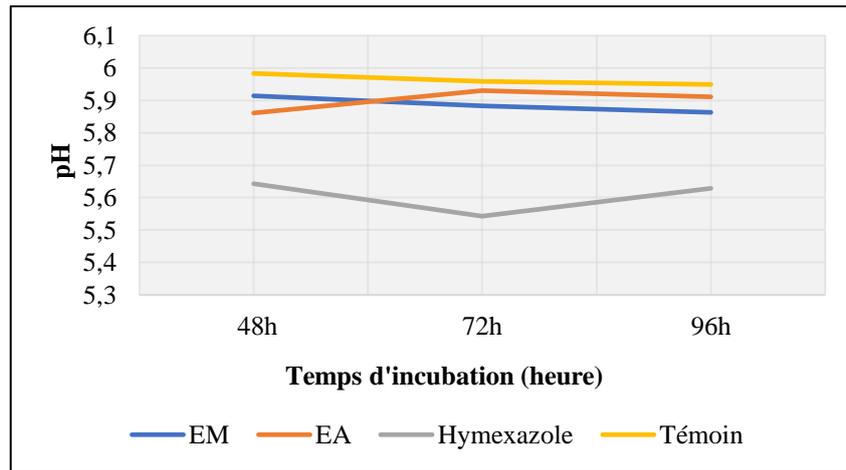


Fig. 54 : Cinétique du pH d'*Alternaria tenuissima* provoqué par les extraits de *Rosmarinus eriocalyx*

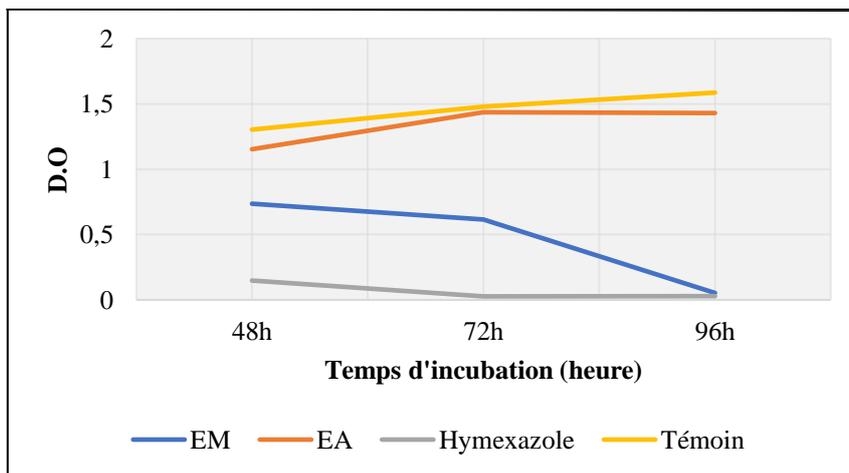


Fig. 55 : Cinétique de croissance d'*Alternaria arborescens* provoqué par les extraits de *Rosmarinus eriocalyx*

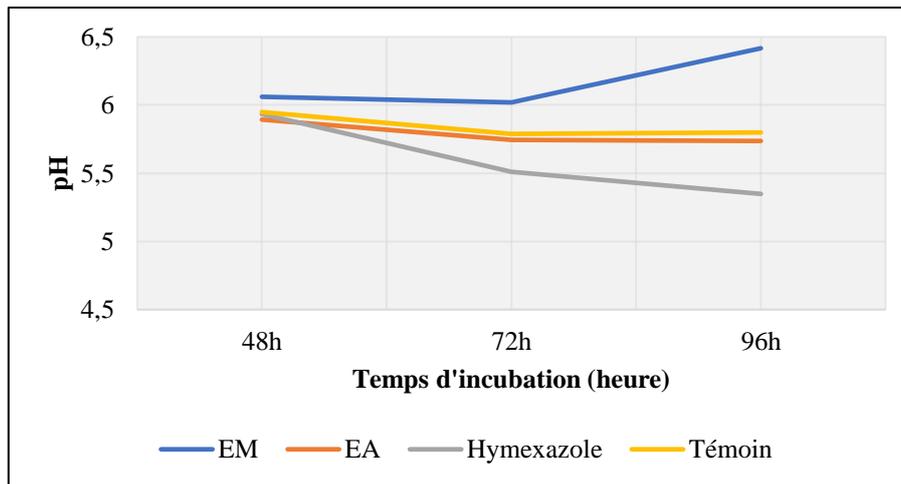


Fig. 56 : Cinétique de pH d'*Alternaria arborescens* provoqué par les extraits de *Rosmarinus eriocalyx*

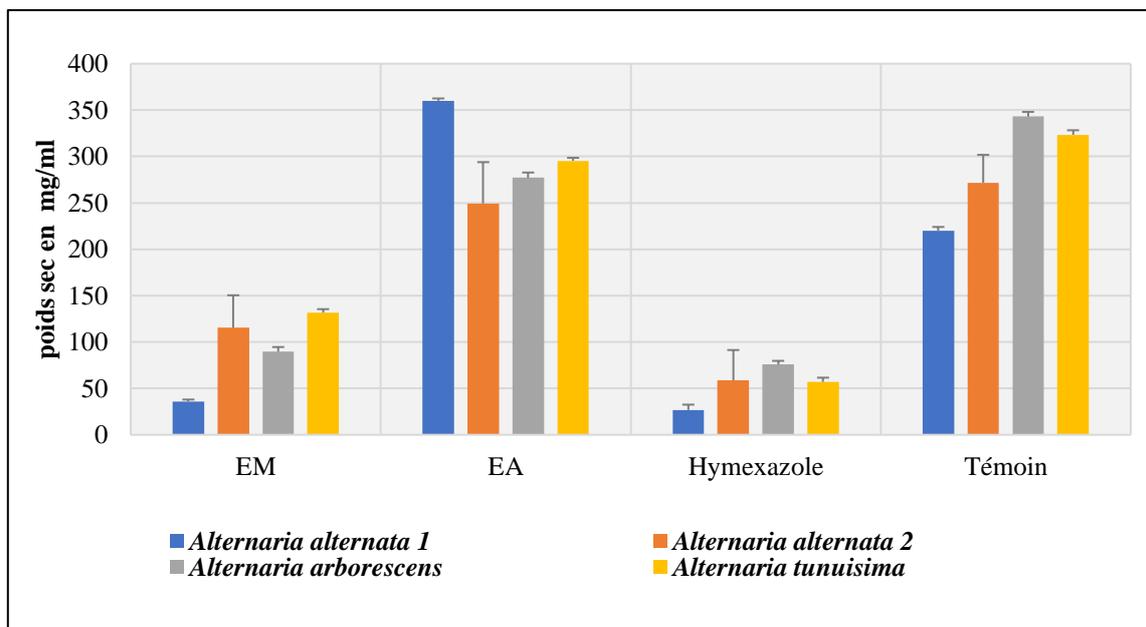


Fig. 57 : le poids de l'inoculum des cultures des souches du genre *Alternaria* provoqué par les extraits de *Rosmarinus eriocalyx*

➤ *Sur les autres genres*

L'activité antifongique en mode batch pour la souche de *Penicillium sp* a révélé un potentiel pesticide non négligeable de l'EM de *Rosmarinus eriocalyx* suivait de celui de l'EA. Les D.O mesurés ont traduit un effet inhibiteur des extraits dès les 48h h et cet effet a été maintenu jusqu'à la fin de l'expérience c.à.d. après 5 jours. Les des D.O valeurs varient de 0,219 à 0, 274 pour l'EM et de 0,28 à 0,364 pour EA (**Fig. 58**). Comme précédemment, l'efficacité du pesticide a été également retrouvée face au *Penicillium sp* et ce, après 72h d'incubation

Concernant les pH, il ressort d'après les résultats qu'il n'existe pas de différences significatives au cours des 48h, une augmentation a été enregistrée après les 72h pour les deux extraits (5,81 et 5,84) par rapport au témoin et le pesticide (5,68 et 5,74) (**Fig. 59**). Une efficacité relativement élevée a été décelée à partir du poids de l'inoculum des prélèvements de solutions supplémentées de L'EM par comparaison avec ceux des échantillons contenant l'Hymexazole et l'EA (**Fig. 59**). En effet, l'interprétation de la (**Fig. 64**) fait ressortir des poids secs de 89mg pour l'EM, 124 mg pour l'EA, 112mg pour le pesticide

Concernant la souche de *Colletotrichum coccodes* les trois traitements n'ont pas exercé un effet au cours des premiers 48h, puisque les DO mesurés sont du même ordre (**Fig. 60**). Des différences significatives ont été enregistrées après les 72h où l'action de l'EM et du pesticide a été mieux prononcé sur la croissance de la souche fongique avec des D.O presque du même ordre 0,387 et 0,384. Comme toujours, une activité antifongique très modeste (72h) à nulle (96h) a été engendrée par l'EA. Les valeurs des pH exprimées par la (**Fig. 61**) ont révélé des différences significatives nettes dès les 48 h d'agitation,

L'évaluation de l'activité antifongique par la mesure du poids sec *Colletotrichum coccodes* mise en croissance en présence des trois substances testées montre un pouvoir élevé du pesticide par rapport aux deux extraits de *Rosmarinus eriocalyx* (**Fig. 64**). Le poids de l'inoculum d'*Helminthosporium sp* soumis à l'effet de l'EM est diminué de 30% par rapport à celui de l'EA et de presque 50% par rapport au témoin sans ajout de substances et par rapport le traitement. Des souches d'*Helminthosporium sp* par les trois traitements, n'ont révélé de différences significatives durant les 48h ($p > 0.05$) (**Fig. 62**). La souche n'a été affectée par les extraits et le pesticide qu'à partir des 72h avec des D.O plus basses que celles du témoin où les valeurs les plus faibles ont été constatées qu'en présence du pesticide (0,319) et de l'EM (0,462).

L'effet du pesticide a été maintenu même après 96h avec les même D.O. Une augmentation du pH de 5,6, 5,626 et 5,649 respectivement soumis à l'effet de l'EA, l'EM et du pesticide durant les 72h comparativement au témoin de 5,538. Après les 72h, on dénote une diminution au niveau des suspensions fongiques n'ayant subies aucun traitement (**Fig. 63**). Cette réduction a subsisté même après les 96h. La baisse de pH la plus remarquable a été calculée à partir de la solution contenant L'EA avec une valeur de 3,97.

Les poids secs des inoculums illustrés dans la (**Fig. 64**) indiquent des potentialités métaboliques et réduites de la part de cette souche d'*Helminthosporium sp* lorsqu'elle est soumise à l'action du pesticide qui semble être plus efficace sur sa croissance (103 mg). Une capacité de croissance

mineure face à l'EM a été également illustrée par la (Fig. 64) un poids sec de 128mg. De même, *Heminthosporium sp* comme la plupart des autres souches étudiées semble résistante à l'extrait aqueux de l'espèce du romarin analysé.

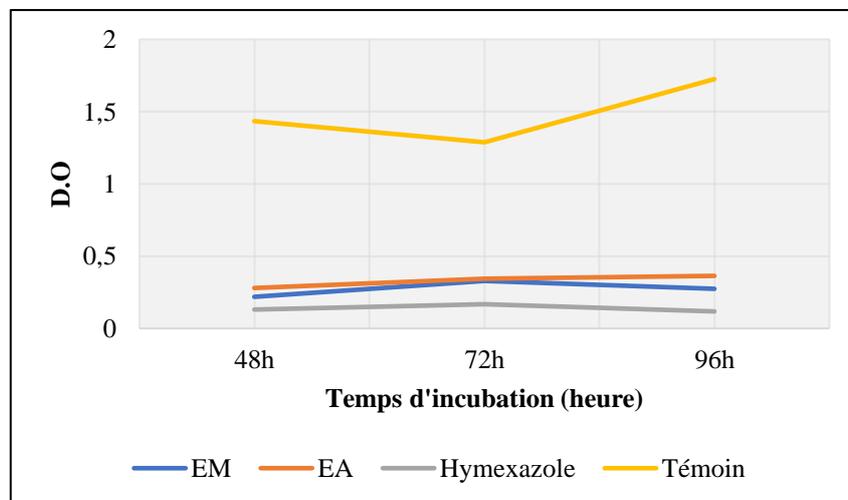


Fig. 58 : la cinétique de croissance de *Penicillium sp* sous provoqué par les extraits de *Rosmarinus eriocalyx*

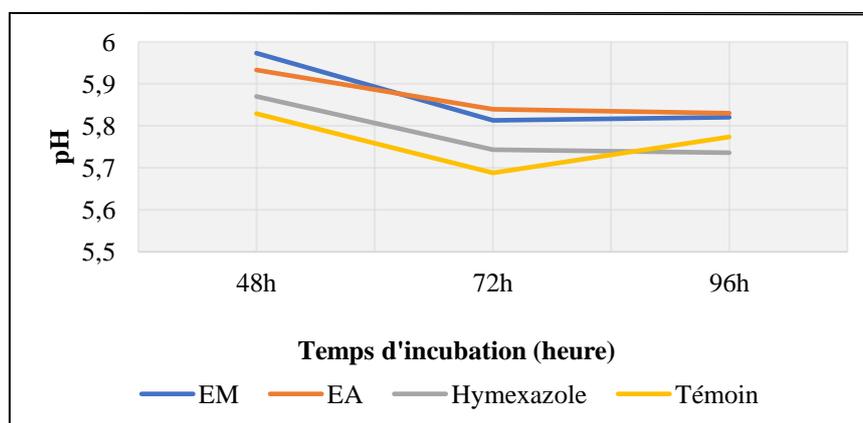


Fig. 59 : Cinétique de pH de *Penicillium sp* provoqué par les extraits de *Rosmarinus eriocalyx*

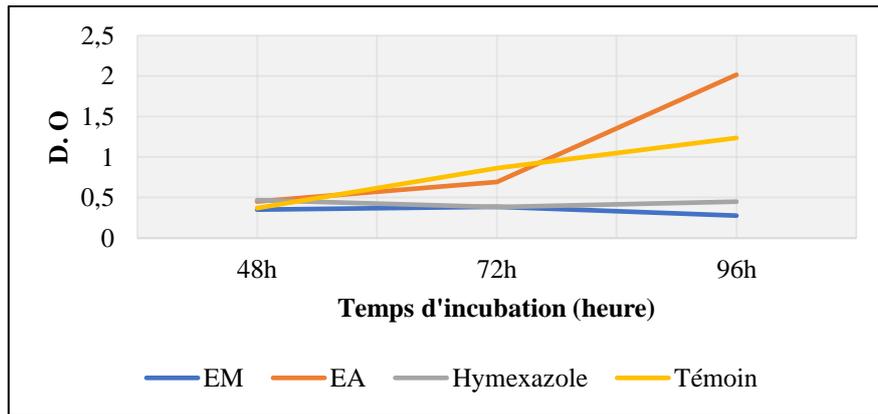


Fig. 60 : Cinétique de croissance de *Colletotrichum coccodes* provoqué par les extraits de *Rosmarinus eriocalyx*

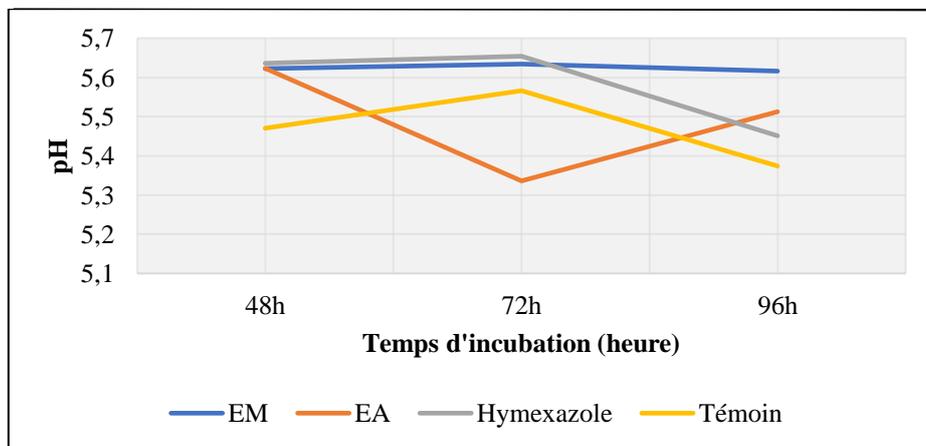


Fig. 61 : Cinétique du pH de *Colletotrichum coccodes* provoqué par les extraits de *Rosmarinus eriocalyx*

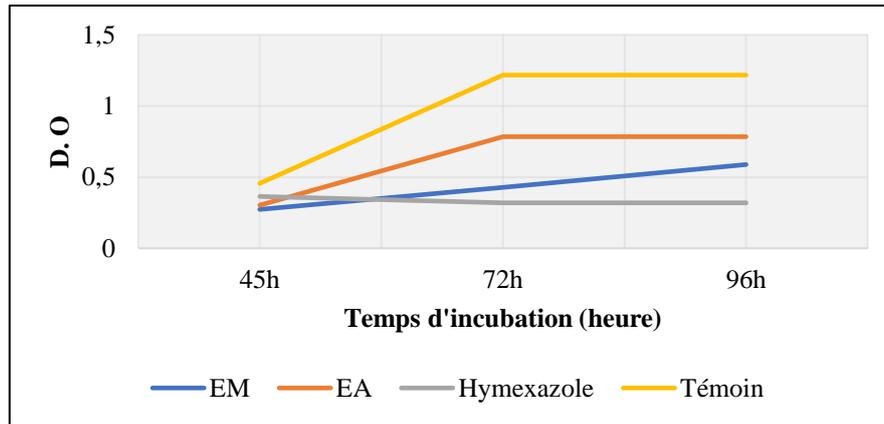


Fig. 62 : Cinétique de croissance d'*Helminthosporium sp* provoqué par les extraits de *Rosmarinus eriocalyx*

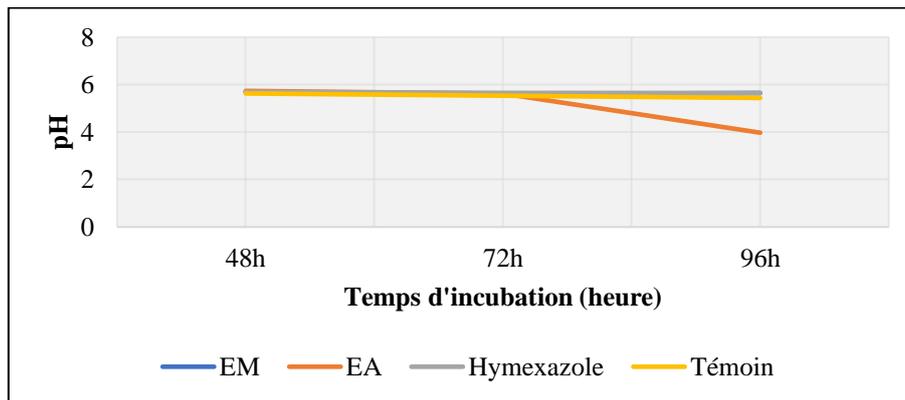


Fig. 63 : Cinétique du pH d'*Helminthosporium sp* sous provoqué par les extraits de *Rosmarinus eriocalyx*

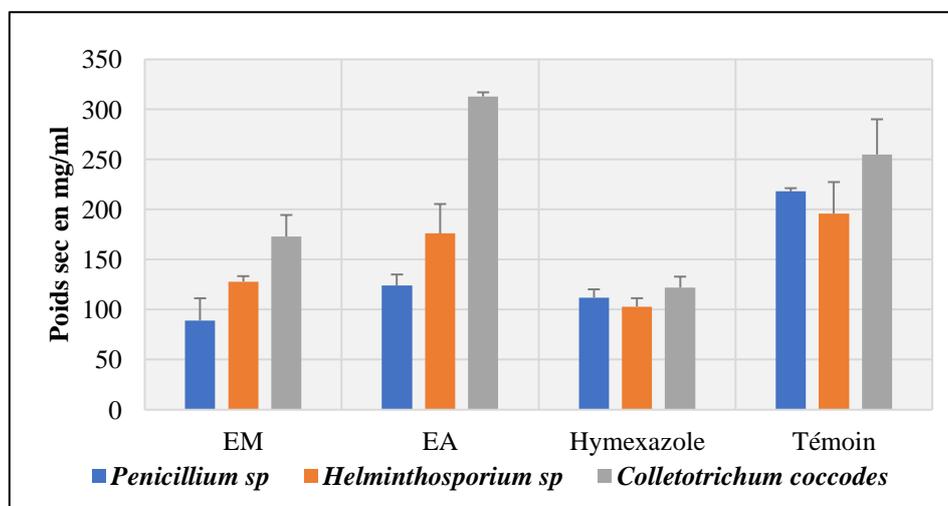


Fig. 64 : le poids de l'inoculum des cultures des souches des autres genres provoqué par les extraits de *Rosmarinus eriocalyx*

➤ Sur le genre *Pseudomonas*

L'activité antibactérienne en mode batch sur les souches appartenant au genre *Pseudomonas* a exprimé l'effet inhibiteur des extraits du romarin et le pesticide sur la dégradation de la croissance bactérienne. En général toutes les bactéries testées ont été sensible aux différents traitements en particulier *Pseudomonas sp 3* et *Pseudomonas sp 5*. Selon les résultats présentés dans **Fig. 75**, l'EM a prononcé le meilleur pouvoir inhibiteur sur tous les agents pathogènes testés.

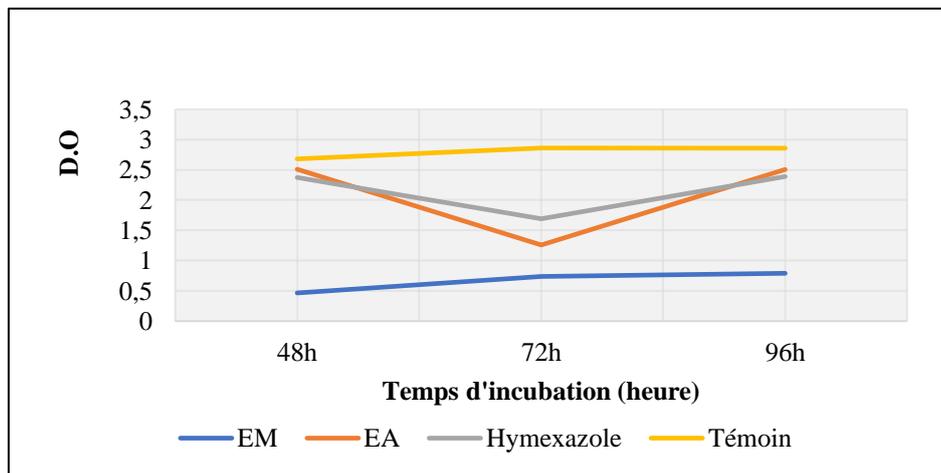


Fig. 65 : Cinétique de croissance de *Pseudomonas sp 1* provoqué par les extraits de *Rosmarinus eriocaly*

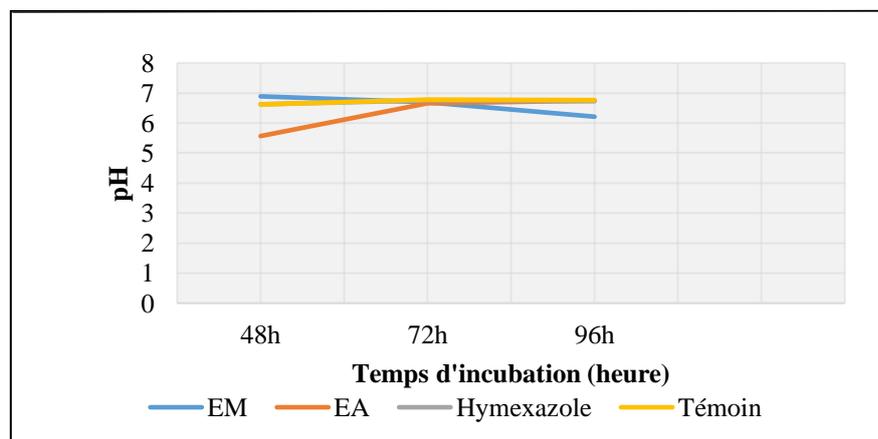


Fig 66 : Cinétique du pH de *Pseudomonas sp 1* provoqué par les extraits de *Rosmarinus eriocalyx*

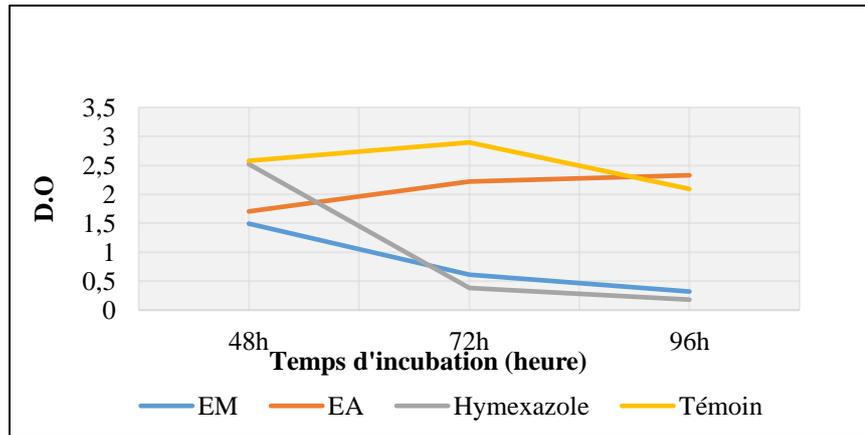


Fig. 67 : Cinétique de croissance *Pseudomonas sp 2* provoqué par les extraits de *Rosmarinus eriocalyx*

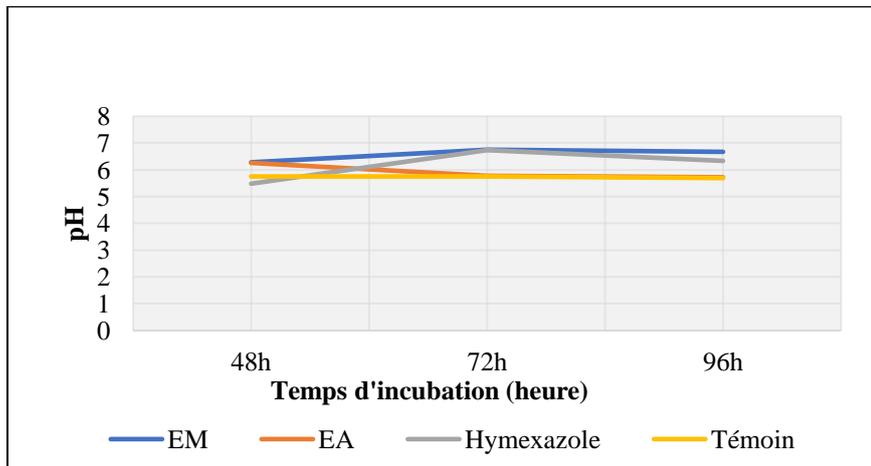


Fig. 68 : Cinétique de pH *Pseudomonas sp 2* provoqué par les extraits de *Rosmarinus eriocalyx*

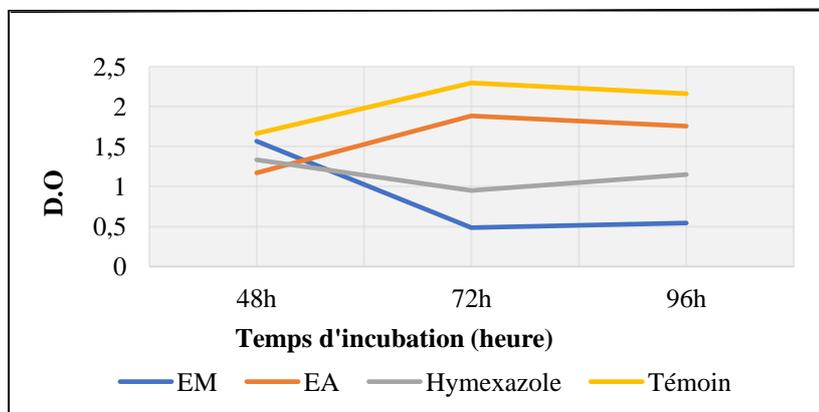


Fig. 69 : Cinétique de croissance *Pseudomonas sp 3* provoqué par les extraits de *Rosmarinus eriocalyx*

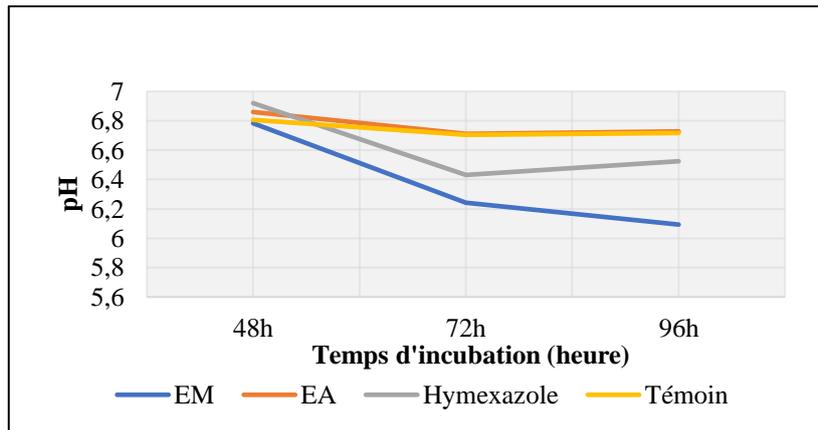


Fig. 70 : Cinétique de pH de *Pseudomonas sp 3* provoqué par les extraits de *Rosmarinus eriocalyx*

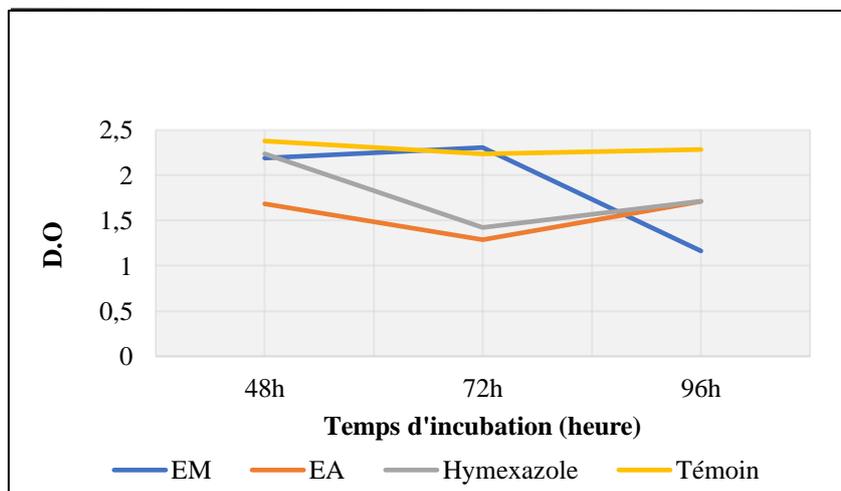


Fig. 71 : Cinétique de croissance *Pseudomonas sp 4* provoqué par les extraits de *Rosmarinus eriocalyx*

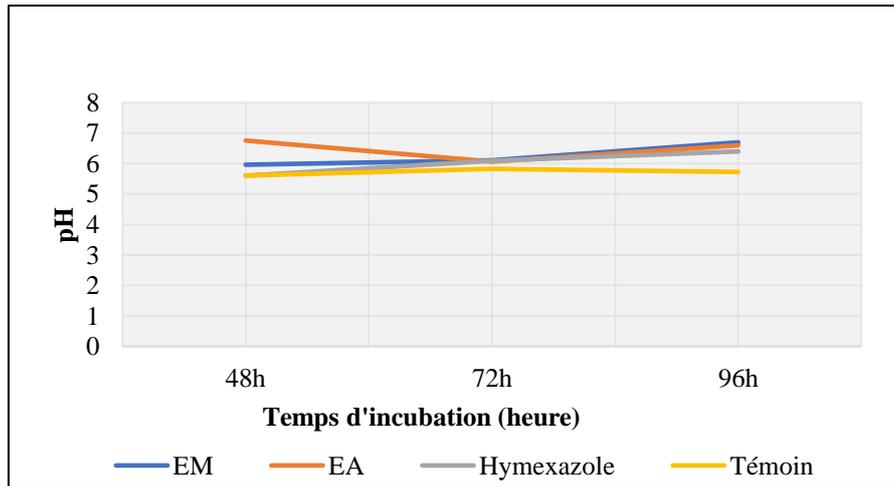


Fig. 72 : Cinétique de pH de *Pseudomonas sp 4* provoqué par les extraits de *Rosmarinus eriocalyx*

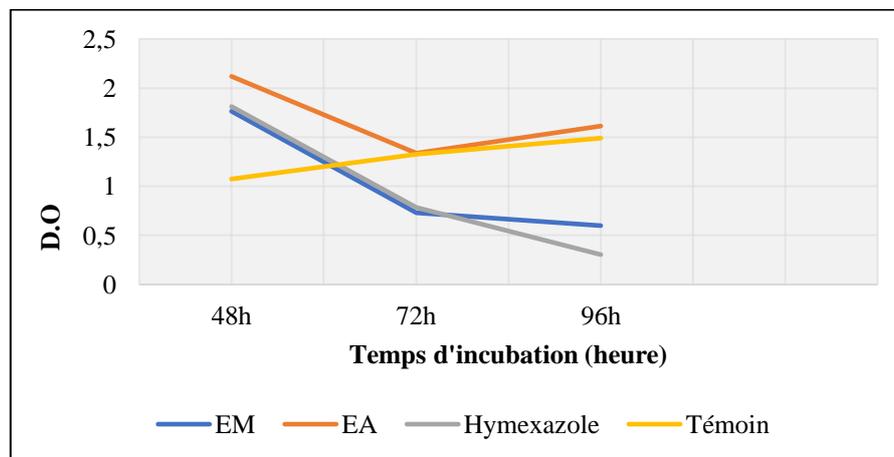


Fig. 73 : Cinétique de croissance *Pseudomonas sp 5* provoqué par les extraits de *Rosmarinus eriocalyx*

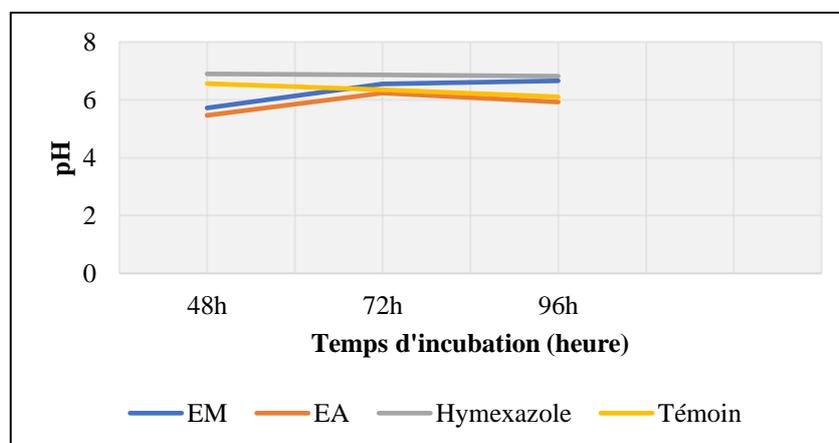


Fig 74 : Cinétique de pH *Pseudomonas sp 5* provoqué par les extraits de *Rosmarinus eriocalyx*

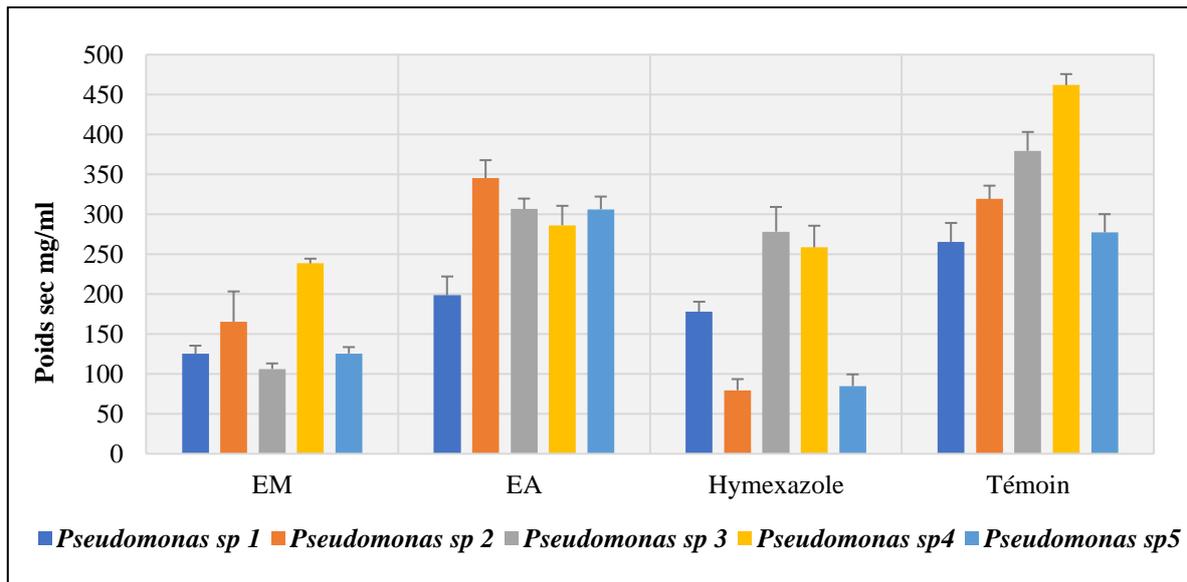


Fig. 75 : Le poids de l'inoculum des cultures des souches du genre *Pseudomonas* provoqué par les extraits de *Rosmarinus eriocalyx*

3.5. Résultats de l'étude *in vivo* de l'extrait méthanolique de *Rosmarinus eriocalyx* sur *Citrus sinensis* L. inoculé *ex situ* par les différentes souches microbiennes

➤ Sur le genre *Aspergillus*

Le taux d'extension radiale des colonies fongiques sur les oranges traitées par l'EM et le pesticide ainsi que le témoin négatif sont élucidés dans le **Tab. 33**. Les résultats montrent l'effet inhibiteur de l'EM à réduire l'incidence de l'infection des oranges après l'inoculation artificielle par les souches phytopathogènes et stocké à la température ambiante de 25°C selon les diamètres des nécroses relevées. Sur la base des résultats présentés dans le **Tab. 33** et **Fig. 76**, les *Aspergillus* ont été sensibles à l'EM avec des valeurs qui varient entre de 4,06 à 15,09mm. L'EM a exhibé l'effet le plus intense à l'inhibition de la prolifération *Aspergillus terreus* avec de diamètre de nécrose de l'ordre de 4,06mm comparativement à l'Hymexazole et le témoin avec des nécroses de valeurs de 10,26 mm et de 15,23 mm respectivement. De même, *Aspergillus flavus* s'est montré plus sensible vis-à-vis l'EM avec une croissance radiale de l'ordre de 10,98 mm sur les oranges traitées, en revanche le fongicide n'a manifesté qu'une activité modérée présentée par des zones d'inhibitions de l'ordre de 15,26mm proche à celles des témoins sans traitement.

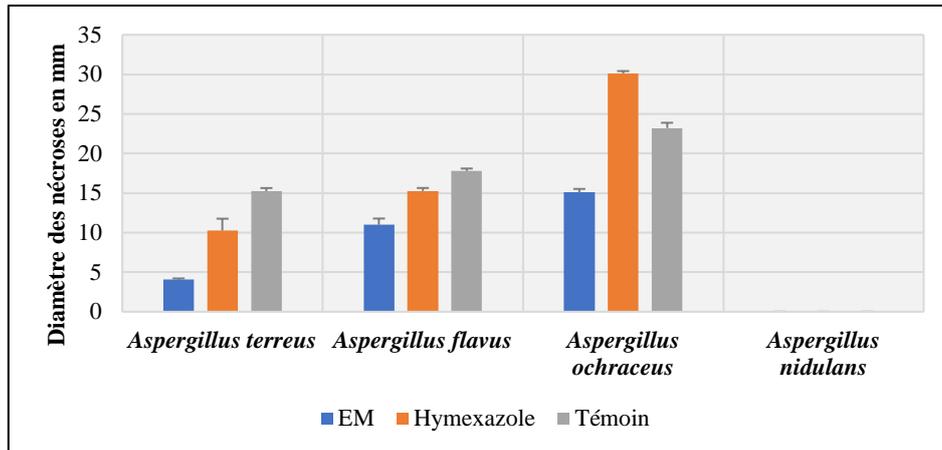


Fig. 76 : l'effet toxique provoqué de l'extrait de *Rosmarinus eriocalyx* sur les fruits de *Citrus sinensis* inoculés des *Aspergillus*

➤ **Sur le genre *Fusarium***

Les résultats affichés dans le tableau et présentés dans l'histogramme (**Fig. 77**) l'effet de l'extrait naturel du romarin et l'Hymexazole sur l'évolution des nécroses apparus à la suite de l'infection artificiel pour *Fusarium verticilloides* et *Fusarium proliferatum*. Sur la base de ces résultats, on note que l'effet de l'EM a été modéré sur le control de la prolifération de ces deux agents phytopathogènes, les nécroses ne sont que de l'ordre de 16,23 mm pour *Fusarium verticilloides* et de 18mm pour *Fusarium proliferatum*. Par contre, le fongicide a exprimé une activité importante sur la croissance de *Fusarium verticilloides* du fait que les diamètres des nécroses sont considérablement réduits avec une valeur de 5,26 comparativement à l'infection du témoin qui est de l'ordre de 17,66 mm.

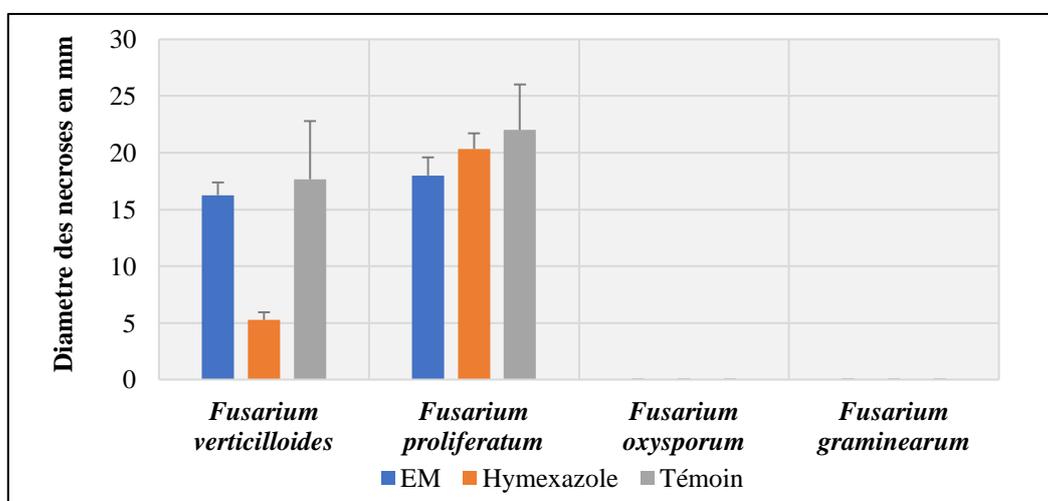


Fig. 77 : L'effet toxique provoqué de l'extrait de *Rosmarinus eriocalyx* sur les fruits de *Citrus sinensis* inoculés de *Fusarium*

➤ **Sur le genre *Alternaria***

Sur l'optique des résultats enregistrés sur (**Tab. 33**), on constate que seulement deux souches d'*Alternaria* qui ont infectées les fruits de *Citrus sinensis* inoculées, *Alternaria alternaria* 1 et *Alternaria alternata* 2 avec des nécroses de 12mm et 28,33mm, respectivement pour l'EM, de 6,33 mm et 17,66mm pour l'Hymexazole et de 17,33 et 37,33mm pour le témoin négatif. Ces résultats illustrent un potentiel inhibiteur notable enregistré par le pesticide qui a réduit l'incidence de l'infection d'*Alternaria alternata* 1 et *Alternaria alternata* 2 sur les oranges avec des zones d'inhibition de l'ordre de 6,33mm et 17,66mm.

L'EM a exhibé une inhibition de la croissance des deux souches d'*Alteranria alternata* de 12mm et 28,33mm comparativement au témoin (17,33mm et 37,33mm) mais cette activité reste moins efficace que celle évaluée par le pesticide conventionnel.

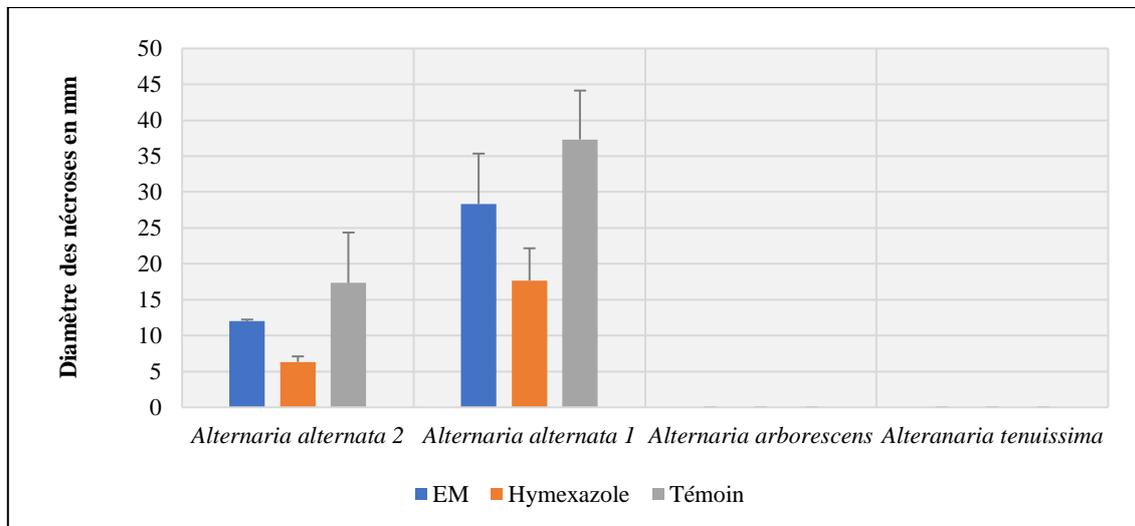


Fig. 78 : l'effet toxique provoqué de l'extrait de *Rosmarinus eriocalyx* sur les fruits de *Citrus sinensis* inoculés des *Alternaria*

➤ **Sur les autres genres**

Après l'inoculation des oranges par les souches phytopathogènes *Penicillium sp*, *Colletotrichum coccodes* et *Helminthosporium sp*, on observe qu'uniquement le *Penicillium sp* qui a exprimé son pouvoir pathogène sur les fruits par des nécroses moins visibles. Concernant les résultats de l'injection des oranges par les deux traitements, l'EM et l'Hymexazole, présentés par le graphique (**Fig. 79**) et le **Tab. 33**, le *Penicillium sp* a été sensiblement affecté par l'EM et le pesticide conventionnel, ces derniers ont évalué une activité inhibitrice assez similaire où ils ont considérablement réduit la croissance du *Penicillium sp* avec des zones

nécrosées de l'ordre de 6,33 mm pour l'EM et de 8,33 pour l'Hymexazole comparativement au témoin (35,66 mm) (**Fig. 79**).

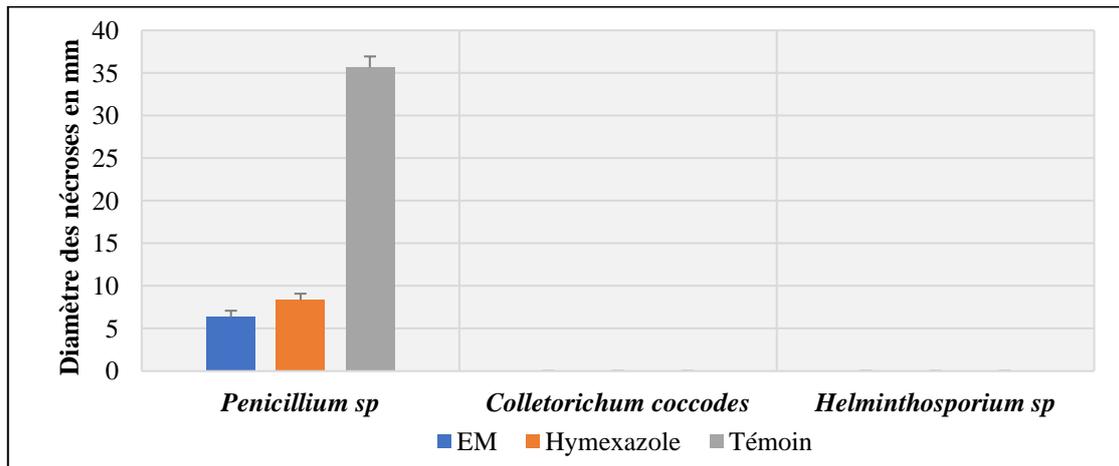


Fig.79 : l'effet toxique de l'EM de *Rosmarinus eriocalyx* sur les fruits de *Citrus sinensis* inoculés des autres genres

➤ **Sur le genre *Pseudomonas***

Concernant les souches de *Pseudomonas*, la révélation de la maladie sur les oranges artificiellement infectés n'a affecté que les fruits contaminés par *Pseudomonas sp 2* et *Pseudomonas sp 5*. Les nécroses ont été plus réduites (0,23 mm) dans le cas des oranges supplémentés de l'EM en comparants celles de du témoin avec des valeurs s'échelonnent de 0,8m à 0,91mm. Le pesticide a révélé une activité inhibitrice limité les nécroses ont été assez proches de celles du témoin d'une valeur de 0,63mm. En revanche l'effet de l'EM a effectué moins d'efficacité avec *Pseudomonas sp 2* où les diamètres des nécroses ont atteigne les 0,52mm par rapport à celles du témoin de 0,91mm. Pour le pesticide conventionnel, une réduction similaire à celle de l'EM avec des nécroses de 0,76mm a été décelé (**Fig. 80**).

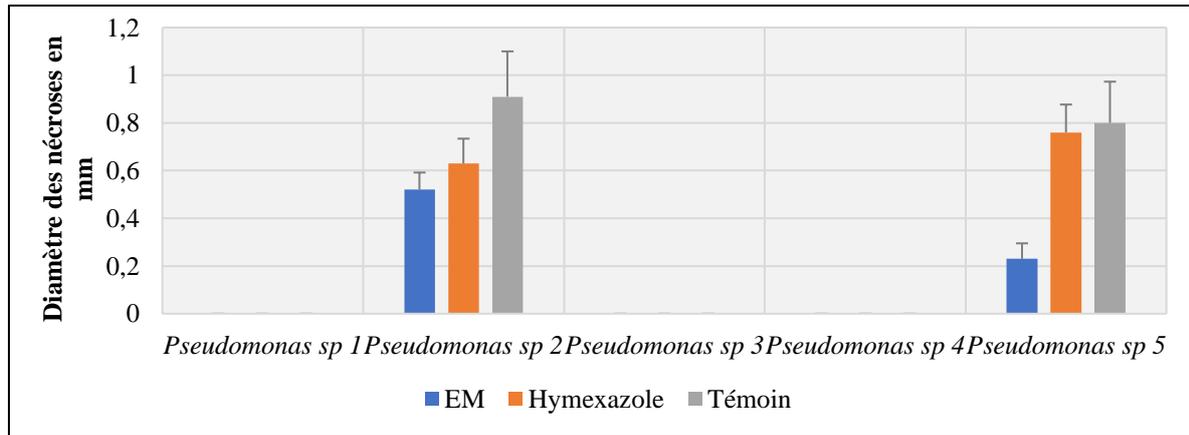


Fig. 80 : l'effet toxique provoqué de l'extrait de *Rosmarinus eriocalyx* sur les fruits de *Citrus sinensis* inoculés des *Pseudomonas*

Tab. 33 : Les diamètres des nécroses provoqués par l'extrait méthanolique de *Rosmarinus eriocalyx* sur les fruits de *Citrus sinensis* inoculés des souches phytopathogènes

Nom de la souche	EM	Hymexazole	Témoïn	P
<i>Aspergillus terreus</i>	4,06c ±0,15	10,26b ±1,5	15,23a ±0,404	0,001
<i>Aspergillus flavus</i>	10,98c ±0,8	15,26b±0,38	17,8a ±0,3	0,01
<i>Aspergillus ochraceus</i>	15,09c ±0,433	30,13a ±0,289	23,21b ±0,672	0,02
<i>Aspergillus nidulans</i>	0	0	0	0
<i>Alternaria alternata 2</i>	12b ±0,23	6,33c ±0,77	17,33a±7,02	0,01
<i>Alternaria alternata 1</i>	28,33b±7,02	17,66c±4,5	37,33a±6,8	0,03
<i>Alternaria arborescens</i>	0	0	0	0
<i>Alteranaria tenuissima</i>	0	0	0	0
<i>Fusarium verticilloides</i>	16,26a±1,12	5,26b±0,68	17,66a±5,13	0,01
<i>Fusarium proliferatum</i>	18a±1,59	20,33a±1,38	22a±4,016	0,05
<i>Fusarium oxysporum</i>	0	0	0	0
<i>Fusarium graminearum</i>	0	0	0	0
<i>Penicillium sp</i>	6,33b±0,76	8,33b±0,76	35,66a±1,28	0,001
<i>Colletorichum coccodes</i>	0	0	0	0
<i>Helminthosporium sp</i>	0	0	0	0
<i>Pseudomonas sp 1</i>	0	0	0	0
<i>Pseudomonas sp 2</i>	0,52 a±0,07	0,63a±0,104	0,91a±0,19	0,06
<i>Pseudomonas sp 3</i>	0	0	0	0
<i>Pseudomonas sp 4</i>	0	0	0	0
<i>Pseudomonas sp 5</i>	0,23a ±0,06	0,76 b±0,11	0,8b±0,17	0,04

L'effet antimicrobien des extraits de *Rosmarinus eriocalyx*. a été évalué contre les agents phytopathogènes les plus fréquents des grandes cultures. Parmi ces agents étudiés, plusieurs d'entre eux sont des espèces fongiques et quelques-uns sont des espèces bactériennes.

Différents bioessais ont été effectués afin de mieux explorer la capacité biopesticide de la plante dans les différentes des méthodes utilisées. De tous les résultats obtenus, il ressort que le *Rosmarinus eriocalyx* possède un effet inhibiteur qui varie en fonction de la nature de la souche et de la méthode d'extraction des substances testées et le biotest effectué. Tout d'abord, en ce qui concerne les *Aspergillus*, ces microorganismes qui semblent saprophytes non virulents au début de la contamination des cultures agricoles mais qui deviennent à un stade avancé de leur cycle biologique plus nocifs pour la plante en provoquant des dépérissements et des pourritures graves.

Le genre *Aspergillus* est responsable dans de nombreux cas de la détérioration des aliments (**Williams et al., 2004**). Ces champignons sont reconnus comme des agents actifs dans les processus de décomposition (**Kumar et al., 2007**). Les extraits méthanolique (EM) et méthanolique soumis aux ultrasons (EMS) ont réduit d'une manière significative la croissance d'*Aspergillus nidulans* et *Aspergillus terreus*. Ces deux espèces d'*Aspergillus* semblent sensibles aux différents constituants des deux extraits. Les pourcentages d'inhibition calculés montrent un pouvoir fongicide plutôt que fongistatique. Cette puissante activité vis à vis de ces souches pourrait être expliquée par la présence des taux de polyphénols détectés dans les feuilles lors des dosages. Par surcroît, cet effet serait également lié à la présence des constituants autres que les composés polyphénoliques tels que, les flavonoïdes et les tanins. En effet, selon certains auteurs, les plantes synthétisent plus de 100.000 petites molécules dotées pour la plupart d'une activité antibiotique. En général, cette activité est inférieure à celle exercée par les antibiotiques d'origine microbienne (**Tegos et al., 2002 ; Lewis et Ausubel, 2006**).

En ce qui concerne les différentes souches de *Fusarium* testées, toutes les quatre se sont révélées assez sensibles aux différentes concentrations de l'EM. La souche de *Fusarium graminearum* semble la plus affectée. En ce qui concerne toujours le genre *Fusarium* qui est réputé pour sa grande virulence et sa pathogénéicité, La seconde méthode, celle de l'incorporation de l'extrait dans le milieu de culture liquide employée dans nos recherches nous a permis d'enregistrer un effet fongistatique très notable de l'EMS sur *Fusarium verticilloides*. Les taux d'inhibition sont homologues à ceux obtenus par **Daferera et al. (2003)** mais en appliquant des doses plus élevées (1000µg/ml) d'huile essentielle de *Rosmarinus officinalis*.

En effet, de nombreux travaux antérieurs, ont signalé l'efficacité de certains extraits de certaines plantes contre le genre *Fusarium*. Dans ce contexte, nous pouvons citer les travaux réalisés par **Arici et al. (2013)** qui ont démontré un pouvoir inhibiteur des huiles essentielles de cumin, de thymus, de nigelle et d'aneth contre deux isolats de *Fusarium oxysporum*. Cette inhibition serait liée aux doses employées des extraits. Les meilleures réponses ont été obtenues sur *Fusarium oxysporum* traité par des concentrations importantes.

Il a été également démontré dans une autre étude réalisée très récemment par **Lorenzetti et al. (2018)** que le romarin (*Rosmarinus officinalis*) possède un potentiel important contre *Fusarium solani*, cependant cette réduction ne dépasse pas les 62,89%. Dans notre cas, la souche de *Fusarium oxysporum* paraît résistante à l'effet du *Rosmarinus eriocalyx* dont les taux d'inhibition n'arrivent à surpasser les 38,13%. Inversement, des études antérieures ont signalé l'efficacité de *Rosmarinus officinalis* sur la réduction de la croissance mycélienne d'une forme spéciale de pois chiche, celle du *Fusarium oxysporum* f.sp. *cicer* à des taux non négligeables (**Pawar et Thaker, 2007 ; Arici et al., 2013**). Cette inhibition pourrait être liée au pouvoir pathogène de la souche (sa virulence). En outre, la méthode d'extraction des composés du métabolisme secondaire peut intervenir dans la variabilité des résultats puisque la technique d'extraction est un des paramètres les plus importants dans la rentabilité des produits bioactifs composant les extraits végétaux. Plus la méthodologie est pertinente et plus l'extraction est meilleure avec un isolement des plusieurs composés de structures différentes et dotés de capacités antifongiques puissantes. Selon **Smith (2003)** et **Sasidharan et al., 2011**, les études qualitatives et quantitatives des composés bioactifs issus du matériel végétal reposent principalement sur la sélection d'une méthode d'extraction appropriée. Ainsi la plupart des chercheurs croient à l'importance de la préparation des échantillons lors de toute étude analytique. Pareillement, **Majors (1999)** a mis l'accent sur la l'importance de la préparation de l'échantillon et de la méthode suivie dans les biotests antimicrobiens.

Parmi les *Alternaria* testées, l'espèce *Alternaria Alternata* 1 et *Alternaria arborescens* ont été extrêmement altérées par les extraits végétaux. Des taux d'inhibition moindre ont été obtenus avec les autres souches d'*Alternaria*, *Alternaria alternata* 2 et *Alternaria tenuissima*. Le pesticide de synthèse l'Hymexazole a évalué des taux d'inhibition moins efficace que l'EM. Bien que les EM de *Rosmarinus eriocalyx* soit uniquement fongistatique en fonction de la dose testée, nous pouvons affirmer d'ores et déjà qu'ils sont intéressants pour la lutte contre certaines maladies des grandes cultures d'autant plus que cet effet pourrait être amélioré.

D'ores et déjà, nous pouvons considérer que le pouvoir antifongique des extraits de *Rosmarinus eryocalyx* qui est seulement fongistatique et non fongicide est assez intéressant et pourrait être amélioré en modifiant les facteurs d'expérimentation tels que, le milieu de culture, le pH, le temps d'incubation, la méthode d'extraction, la concentration testée etc ... Cet effet fongistatique spécifique aux extraits méthanolique est dû probablement à certaines classes de composés phénoliques, et en particulier, les flavonoïdes. En effet l'EM de *Rosmarinus eryocalyx* est plus riche en flavonoïdes que l'EA. Les flavonoïdes sont un groupe de métabolites secondaires ayant un grand potentiel antifongique, outre d'autres activités biologiques, leur présence pourrait servir de barrière chimique contre les micro-organismes envahisseurs. A notre avis, La présence de nombreuses molécules flavonoidiques détecté dans nos extraits ont beaucoup influencé sur la réduction de la croissance des champignons.

Selon **Soković et al. (2013)**, vingt-cinq flavonoïdes ont été analysés pour apprécier leur effet sur la croissance mycélienne d'un agent pathogène des cultures, *Verticillium alboatrum*. Les concentrations minimales inhibitrices (CMI) des deux composés les plus actifs, étaient la flavone et la flavanone, d'autres flavonoïdes inhibaient la croissance des hyphes. Le criblage et le dosage d'autres composés tels que, les tanins semblent également être la source des activités biologique et notamment l'effet biopesticide de extraits végétaux (**Soković et al., 2013**).

Effectivement, **Javaid et Samad. (2012)** ont trouvé des résultats similaire que les notre concernant *Alternaria alternata* 1, l'EM de *Syzygium cumini* s'est révélé très efficace pour supprimer la croissance *in vitro* des deux souches de *Alternaria alternata* avec des pourcentages de réduction de la biomasse de 82–88%, en raison de diverses concentrations de tanins et d'autres composés phénoliques au niveau de l'EM de *Syzygium cumini* (L.) qui est une espèce végétale réputée pour sa richesse en dérivés polyphénoliques d'acide gallique et d'acide ellagique (**Chattopadhyay et al., 1998**)

Autres genres sur lesquels nous avons réalisé nos investigations, *Colletotrichum coccodes*, *helminthosporium sp* et *Penicillium sp* qui ont été isolés à partir des plantes contaminées avec des populations peu abondantes et peu fréquentes. Parmi ces trois champignons, on dénote une sensibilité de la part de *Penicillium sp* aux différentes concentrations des extraits. Les réponses de chacune de ces espèces diffèrent selon la technique utilisée et la concentration de l'extrait ajoutée. *Colletotrichum coccodes* et *Helminthosprium sp* ont exhibé des taux d'inhibition très considérable en contact direct avec l'EM et l'EMS dans le milieu incorporé. *Colletotrichum coccodes* est une espèce fongique responsable de certaines maladies des cultures maraichères

qui est dans la plupart des cas, sensibles aux différents extraits de *Rosmarinus eriocalyx* actives d'origine végétale et/ou microbienne qui ont la propriété d'inhiber la croissance de certains champignons et c'est peut-être le cas de notre souche.

L'identification quantitative de l'EM a fait ressortir l'abondance des acides phénolique tel que l'acide rosmarinique qui un produit majoritaire ainsi que l'acide caféique, l'acide quinique, l'acide citrique, l'acide protocatechuique, l'acide isochlorogénique l'acide Coumaric-*O*-hexoside et l'acide sagerinique, sont des composés trouvés seulement dans l'EM ainsi une variété de composés flavoniques tel que la lutéoline. Ces molécules actives semblent être toxiques aux différentes espèces fongiques étudiées et à leur viabilité dans les conditions de notre expérimentation. En effet l'acide rosmarinique, l'acide caféique, la lutéoline, le carnosol et l'acide carnosique sont très réputés pour leur pouvoir antimicrobien (**Moreno *et al.*, 2005 ; Timothy, 2006 ; Yanli Su, 2014**).

Les espèces telles que *Penicillium*, *Aspergillus* sont des champignons toxigéniques produisant des toxines qui sont le plus souvent altérées par les substances actives des végétaux. En effet, ce résultat est fort intéressant et en parfaite concordance avec une multitude de travaux réalisés par (**Bluma et Etcheverry, 2008 ; Velluti *et al.*, 2004 ; Hope *et al.*, 2003 ; Cairns et Magan, 2002 ; Sinha *et al.*, 1993 ; Hitokoto *et al.*, 1980**) ; tous ces chercheurs ont signalé un fort potentiel inhibiteur des molécules bioactives isolées à partir des végétaux vis à vis des espèces fongiques toxigéniques comme l'*Aspergillus sp*, *Penicillium sp*, *Fusarium sp*.

Nos investigations sur l'effet anti-infectieux des extraits de la plante de *Rosmarinus eriocalyx*, n'ont pas seulement concerné les champignons mais également les bactéries. Les biotests ont été entrepris sur un genre très réputé pour sa pathogénicité et sa résistance aux différents pesticides chimique synthétique, le genre *Pseudomonas*. A priori, l'effet antibactérien de l'EM semble très intéressant, une activité antibactérienne très puissante de l'EM où aucune croissance bactérienne n'a été détecté concernant *Pseudomonas sp 2* et *Pseudomonas sp 5*. En revanche, l'EA s'est avéré moins efficace et n'a exprimé aucun ralentissement de la croissance des *Pseudomonas*. Pendant que les souchesensemencées en présence du pesticide de synthèse, deux d'entre elles (*Pseudomonas sp 2* et *Pseudomonas sp 5*) n'ont pas été affectées alors que la croissance des trois autres (*Pseudomonas sp 1*, *Pseudomonas sp 3*, et *Pseudomonas sp 4*) a été altérée.

Si l'on se réfère maintenant aux effets des extraits de notre plante sur les cinétiques de croissance évaluées à partir des trois paramètres, la turbidité, l'acidité du milieu de culture et le poids sec de l'inoculum calculé à la fin de l'expérimentation, il ressort que les densités optiques de toutes les souches testées y compris les souches bactériennes diminuent en fonction du temps. D'une manière globale, cette inhibition de la croissance est exprimée fortement en présence de l'EM. Ce potentiel antimicrobien à l'air d'être plus accentué que celui provoqué par le pesticide conventionnel l'Hyméxazole. L'EA quant à lui semble moins efficace sur toutes les souches des espèces étudiées. Cette diminution dans la turbidité (D.O faible) s'accompagnant toujours d'une acidité du milieu ainsi qu'une baisse dans la charge microbienne (faible Poids l'inoculum). Des fluctuations minimales dans tous ces paramètres ont été quelquefois enregistrées pour certaines souches aussi bien pour le pesticide de synthèse que pour l'extrait naturel de *Rosmarinus eriocalyx*. Parmi toutes les souches testées *Aspergillus terreus*, *Aspergillus nidulans* et *Fusarium verticilloides*, *Alternaria alternata* 1 et *Penicillium sp* sont celles les plus affaiblies par l'EM ajouté en culture batch alors que *Fusarium graminearum* *Aspergillus flavus*, *Alternaria alternata* 2 s'affichent moins sensibles lorsqu'elles sont mises en contact avec l'EM. En ce qui concerne le genre *Alternaria*, le degré de toxicité provoqué par l'extrait naturel sur la plupart des souches semble assez similaire à celui provoqué par la molécule synthétique d'Hyméxazole.

Cette baisse dans la densité optique (turbidité) due à une baisse de multiplication de l'inoculum traduit la sensibilité des souches fongiques vis à vis des composants de la plante. Généralement, Nos résultats sont concordants avec ceux de **Hasanvand et al. (2016)** qui confirment l'efficacité des produits naturels sur la croissance radiale d'*Aspergillus flavus* avec un taux de 73,9% en utilisant des concentrations de 500ppm de l'huile essentielle d'*Echinophora platyloba* et un effet fongicide pour la concentration supérieure de 2000ppm. L'action inhibitrice des extraits méthanoliques du romarin en culture en batch semble bien évidente sur toutes les souches de *Pseudomonas* en particulier *Pseudomonas sp* 3 et *Pseudomonas sp* 5.

L'extrait aqueux quant à lui, il n'a exercé qu'un effet modéré. La sensibilité des bactéries testées envers les traitements varie d'une souche à l'autre de telle sorte que certaines souches ont été inhibées au cours des premiers 48h alors que d'autres, leur inhibition a mis un temps plus prolongé (après 72h à 96h). Ceci pourra s'expliquer par la capacité de virulence et le degré de résistance des souches. Il est connu que Les *Pseudomonas* sont des bactéries à Gram négatives reconnues par leur résistance aux différents antibiotiques à cause de leurs parois de nature lipidique (**Burt, 2004**). D'autres parts, il semble aussi que les effets antimicrobiens des extraits des plantes

dépendent de leur hydrophobicité et de leur répartition dans les membranes cytoplasmiques des microorganismes. (Lambert *et al.*, 2001 ; Hyun *et al.*, 2014).

Des variations du pH significatives sur tous les milieux traités, ont été détectées mais ils ont tout de même gardé leur nature acide. Ces variations sont probablement dues aux différentes réactions chimiques entre les microorganismes testés et les produits actifs supplémentés aux milieux de cultures. La charge électrique et la polarité doivent être des facteurs d'activité importants. En théorie, le changement de pH du substrat pourrait influencer cela (Suhr et Nielsen, 2003). Des travaux réalisés par Del Campo *et al.* (2000) ont confirmé que la variation du pH était un facteur déterminant de l'activité antibactérienne de l'extrait de romarin. L'activité antibactérienne des extraits varie en fonction de la souche et du pH.

En revanche pour le changement de pH de 5 à 6 n'a pas eu d'effet significatif sur l'activité antifongique d'huile essentielle de thym sur *Aspergillus flavus*, *Penicillium roqueforti* et *Penicillium corylophilum* dans l'étude de Suhr et Nielsen (2003), Le pH du milieu et sa variation au cours du temps influe également sur la production des bactériotoxines et mycotoxines. Bien que la production d'aflatoxines, semble être influencée par le pH du milieu de croissance, des études portant sur la régulation du pH de ces toxines ont donné des résultats complexes et parfois contradictoires. Cotty (1988) a déterminé un lien entre la production d'aflatoxines et la morphogénèse sclérotique en se basant sur des modifications de la différenciation chimique et morphologique en réponse au pH. À un pH égal ou inférieur à 4,0, la production des organes de résistance ou des sclérotés chez les champignons est réduite de 50% tandis que la production d'aflatoxines est maximale (Cotty, 1988). Cependant, Buchanan *et al.* (1975) ont conclu à partir de leurs travaux que le pH initial du milieu de croissance n'était pas un facteur déterminant de la production des toxines.

En fait, l'effet du pH sur la biosynthèse des aflatoxines dépend de la composition du milieu de croissance. Le pH n'est pas le seul facteur qui entre en jeu dans l'efficacité des substances naturelles sur l'inhibition de la croissance bactérienne. A notre avis et à partir de nos recherches, il semble que la membrane est la cible principale de l'action inhibitrice de la substance sur la paroi bactérienne et sa composition chimique (paroi épaisse, fine résistante ou sensible). Une autre idée a été proposée par Gustafson *et al.* (1998) lors d'une étude sur l'huile essentielle de *Melaleuca alternifolia*. Cette dernière était efficace sur les bactéries en phase exponentielle de croissance tandis qu'elle est à moindre effet sur les bactéries en phase stationnaire, suggérant l'implication d'autres cibles que la membrane. Parallèlement, nos extraits ont incité une

réduction de la biomasse bactérienne qui suite à une action bactériolytique induisant ainsi une baisse du poids de l'inoculum en fonction du temps. Cet effet bactériolytique a été confirmé par une étude antérieure de **Carson et al. (2002)** qui ont mis en évidence une éventuelle bactériolyse d'huile essentielle de *Melaleuca alternifolia* (arbre à thé) sur *Staphylococcus aureus* suite à une diminution temporaire de l'absorbance à 620nm.

L'étude de l'activité antimicrobienne réalisés pendant 15 jours à partir des tests *in vivo* sur des fruits inoculés ex situ et traités par l'extrait naturel (EM) de *Rosmarinus eriocalyx*, nous a permis d'évaluer le taux de prolifération des agents pathogènes. Un potentiel inhibiteur de l'EM sur toutes les souches testées, toutefois son efficacité était plus importante sur *Aspergillus terreus* et *Penicillium sp.* Si l'on compare ces résultats à ceux obtenus *in vitro*, on constate que le pouvoir inhibiteur *in vitro* est d'une manière globale meilleur, ceci pourrait être due aux conditions expérimentales qui ne sont pas les mêmes, puisque les tests *in vitro* sont faites dans des conditions plus stériles. Aussi l'EM a été injecté après l'infection des fruits ce qui réduit l'efficacité du traitement, mais tout de même l'EM a exercé un effet antifongique ou antibactérien qui a freiné l'extension de la contamination des oranges infectées artificiellement. Ce qui confirme l'hypothèse émises par plusieurs chercheurs que le romarin est doté d'un pouvoir antimicrobien important. Le potentiel inhibiteur *in vivo* est conforme avec celui de **De Souza et al. (2013)** où L'application d'huile essentielle d'*Origanum vulgare* L. sur les fruits de raisin mises en stockage pendant 12jours à 24 jours a permis de conserver la qualité du raisin et également de supprimer les champignons pathogènes (notamment *Aspergillus flavus* et *Aspergillus niger*).

Il est connu, que l'activité antimicrobienne des plantes est due à la présence des métabolites secondaires aromatiques tels que des alcaloïdes, des flavonoïdes, des stérols et des tanins, etc., qui peuvent agir en tant que phytoalexines, toxines, inhibiteurs (**Tatli et Akdemir, 2005**). Plusieurs chercheurs ont signalé l'activité antimicrobienne de divers extraits de plantes, produits dérivés de plantes, huiles essentielles et autres produits naturels contre un large éventail de microorganismes nuisibles aux aliments, est en fonction de la concentration, des méthodes de test et des composants actifs présents (**Bourgaud et al., 2001 ; Thanaboripat et al., 2006**).

Ceci est vrai notamment pour les espèces végétales appartenant à la famille des Lamiacées qui dans la majorité possèdent un pouvoir biopesticide contre les agents pathogènes infectant les aliments. Cet effet biopesticide semble lié à la présence d'une multitude de biomolécules actives

qui agissent quelquefois en synergie pour l'élimination de l'agent pathogène d'une part et au pouvoir antioxydant spécifique à chaque biomolécule.

Conclusion

Sur la base des résultats obtenus, il ressort, que le *Rosmarinus eriocalyx* possède un effet inhibiteur qui varie en fonction de la nature de la souche et de la méthode d'extraction des substances testées et les biotests employés. Les *Aspergillus* semblent assez affectés par les extraits méthanoliques (EM et EM soumis aux ultrasons). Les deux sortes d'extraits ont réduit d'une manière significative la prolifération des *Aspergillus* et en particulier les deux espèces, *Aspergillus nidulans* et *Aspergillus terreus*. Ces deux souches semblent être sensibles aux contenus de l'extrait qui est riches en substances actives polyphénoliques telles que l'acide rosmarinique, l'acide cafeique, l'acide chlorogénique.

En ce qui concerne les différentes souches appartenant au genre *Fusarium*, toutes les quatre se sont révélées assez sensibles aux différentes concentrations de l'EM. La souche de *Fusarium verticilloides* semble la plus affectée. Cet effet sur *Fusarium verticilloides* s'est accru avec la méthode de l'incorporation de l'extrait dans le milieu de culture liquide où on il a été enregistré un effet fongistatique qui dépasse ceux des autres souches et à partir de toutes les méthodes d'investigations de l'activité antifongique.

De même *Alternaria alternata*¹ et *Alternaria arborescens* ont été extrêmement altérées par les extraits bruts. Des taux d'inhibition moindre ont été marqués avec les autres souches d'*Alternaria* ; *Alternaria alternata* 2 et *Alternaria tenuisima*. Autres genres sur lesquels nous avons concentré nos investigations, il s'agit encore de *Colletotrichum coccodes*, *helminthosporium sp* et *Penicillium sp* qui ont été isolés à partir des plantes contaminées avec des populations peu abondantes et peu fréquentes. Parmi ces trois champignons, on dénote une sensibilité de la part de *Penicillium sp* aux différentes concentrations des extraits.

Bien que les taux d'inhibition soient considérables et qui dépassent souvent ceux du pesticide de synthèse Hymexazole, nous n'avons pas pu enregistrer un effet fongicide provoquant l'arrêt presque complet de la croissance de la population fongique. Nous pouvons donc d'ores et déjà considérer que les extraits de *Rosmarinus eriocalyx* sont uniquement fongistatiques. En

revanche, cela pourrait être amélioré en modifiant les facteurs d'expérimentation tels que, le milieu de culture, le pH, le temps d'incubation, la méthode d'extraction et les biotest utilisés etc

Nos recherches sur l'effet anti-infectieux des extraits de la plante de *Rosmarinus eriocalyx*, ont également concerné les bactéries et notamment sur le genre *Pseudomonas* qui semble très réputé pour sa pathogénicité et sa résistance aux différents pesticides chimiques synthétiques. L'effet antibactérien de l'EM sur les souches de *Pseudomonas* testées semble très promoteur avec des résultats intéressants. Une réduction de la croissance bactérienne a été détectée pour *Pseudomonas sp 3* et *Pseudomonas sp 5*. L'EA s'est avéré moins efficace avec des taux de croissance quelquefois non négligeables. Le pesticide conventionnel Hymexazole quant à lui s'est avéré efficace face à aux trois souches (*Pseudomonas sp 1*, *Pseudomonas sp 2*, et *Pseudomonas sp 5*) alors que la croissance des deux autres souches (*Pseudomonas sp 3* et *Pseudomonas sp 4*) n'a pas été altérée.

Pour ce qui est de l'effet des extraits sur les cinétiques de croissance évaluées à partir des trois paramètres, la turbidité, l'acidité du milieu de culture et le poids sec des cultures en mode batch sur milieu discontinu non renouvelé, on dénote une variabilité dans les résultats de certaines souches testées. Des fluctuations importantes ont été quelquefois enregistrées dans les valeurs de tous les paramètres aussi bien pour le pesticide de synthèse que pour l'extrait naturel de *Rosmarinus eriocalyx*. D'une manière globale, une inhibition de la croissance de toutes les souches testées est exprimée fortement en présence de l'EM. Il est à signaler que les densités optiques diminuent en fonction du temps. Ce potentiel antimicrobien enregistré en présence des extraits naturels de la plante testée semble plus accentué que celui provoqué par le pesticide conventionnel Hyméxazole.

En revanche, L'EA semble moins efficace sur toutes les souches des espèces étudiées. Une diminution dans la turbidité s'accompagnant toujours d'une acidité du milieu ainsi qu'une baisse dans la charge microbienne. L'efficacité des extraits sur les agents pathogènes a été démontrée également *in vivo* sur des fruits de *Citrus sinensis* contaminés puis traités à base d'extraits de la plante. Ces derniers ont présenté de faibles nécroses sur une surface limitée de l'épicarpe par comparaison aux plages importantes nécrosées formées au niveau de l'épicarpe et le mésocarpe après traitement par le pesticide de synthèse Hymexazole.

CHAPITRE III
ETUDE DE L'EFFET HERBICIDE

Introduction

Les milliers de composés secondaires produits par les plantes et les micro-organismes fournissent une incroyable diversité de structures chimiques qui offrent des opportunités pour de nouveaux herbicides, pesticides, stimulants de la croissance ou régulateurs de la croissance (**Keeler, 1991**). L'isolement et l'essai de composés à des fins biologiques est une activité en cours de plusieurs sociétés du secteur de l'agrochimie. Les insecticides importants sont basés sur des produits naturels, mais l'acquisition d'herbicides d'origine végétale et microbienne a été plus difficile.

Dans l'ensemble, les composés microbiens semblent avoir un potentiel d'herbicide supérieur à celui de nombreux allélochimiques provenant de plantes supérieures (**Putnam, 1988**). La chimie de l'isolation et de l'identification des produits naturels est compliquée, le criblage d'essais biologiques visant à détecter des composés actifs est problématique, et de nombreux obstacles défient la synthèse et la production des structures plus complexes. Néanmoins, il est probable que les produits naturels fourniront des produits utiles pour aider la production agricole.

Dans son examen de l'utilisation potentielle des substances à action herbicide, **Putnam (1988)** a répertorié six classes de produits isolés parmi plus de 30 familles de plantes terrestres et aquatiques. Ces classes sont les alcaloïdes, les benzoxazinones, les dérivés de l'acide cinnamique, les composés cyanogènes, l'éthylène et d'autres stimulants de la germination des semences et les flavonoïdes. Tous ces produits chimiques possèdent une phytotoxicité réelle ou potentielle. De nombreuses substances phytotoxiques, suspectées de provoquer la germination et d'inhiber la croissance, ont été identifiées à partir de tissus végétaux et de sols. Ces substances sont appelées allélochimiques (**Whittaker et Feeny, 1977, Munir et tawaha, 2002**).

On sait que de nombreuses substances chimiques phytotoxiques sont exsudées par les plantes pour supprimer l'émergence ou la croissance des autres plantes. On estime que les plantes fabriquent plus de 10 000 produits chimiques pour se protéger contre les maladies, les insectes nuisibles et d'autres plantes, en particulier les mauvaises herbes. Ces produits sont généralement appelés produits végétaux secondaires ou déchets des principales voies métaboliques des plantes. La plupart des recherches sur ces composés à effet inhibiteurs ont porté sur l'effet des interactions entre les espèces de mauvaises herbes et les espèces cultivées (**Narwal, 1994 ; Rice, 1984 ; Hegde et Miller, 1990**).

Chapitre III : Etude de l'effet herbicide

Cette partie de notre travail visait à évaluer l'activité herbicide des différents extraits de la plante *Rosmarinus eriocalyx* sur la croissance du cresson alénois (*Lepidium sativum*) qui est une plante sauvage. Pour ce faire, la technique du milieu incorporé a été sélectionnée pour déterminer le pouvoir herbicide des extraits de *Rosmarinus eriocalyx*. Les paramètres pris en considération sont le taux de la germination, la taille des racines et la longueur des plantules.

1. Matériels et Méthodes

1.1. Fractions SPE de l'extrait méthanolique

À partir de l'EM dont le protocole a été détaillé auparavant dans le premier chapitre, des fractions SPE (solide phase extraction) sont réalisées en utilisant une colonne C-18 (colonne de cartouche : Waters Sep-Pack Vac 12cc C18-2g) à partir de 500 mg de l'EM. Le système utilisé est le méthanol / eau avec cinq gradients de polarité croissante : 35% (SPE1), 51% (SPE2), 54% (SPE3), 70% (SPE4), 100% (SPE5). Chaque système est ajouté à la colonne à trois reprises, la fraction est ensuite recueillie à un volume de 20 ml. Les cinq fractions récupérées sont évaporées dans un rotavapore (Rapidvap N₂) puis pesées pour calculer leur rendement. (Schnee *et al.*, 2013).

1.2. Les Graines de Cresson alénois (*Lepidium sativum* L.)

Les tests ont été réalisés sur les graines de Cresson ou *Lepidium sativum*. Le cresson est une plante annuelle, à saveur âcre, dont la tige haute de 20 à 50 cm est dressée et rameuse.

Les feuilles inférieures sont pennatiséquées, alors que les feuilles supérieures sont linéaires et entières. Les fleurs sont petites et blanches (Boullard, 2001). *Lepidium sativum* L. est une plante herbacée populaire rencontrée dans de nombreuses régions de l'Arabie saoudite, en Europe, en Amérique et dans divers pays d'Afrique telles que l'Algérie, Tunisie, Maroc. Cette plante est classée comme mauvaise herbe possède des propriétés pharmacologiques intéressantes ; elle se révèle efficace contre de nombreux troubles digestifs en raison de son action stimulante, laxative et diurétique.

Tab. 34 : La systématique de *Lepidium sativum* L.

Règne	<i>Plantae</i>
Sous-règne	<i>Tracheobionta</i>
Division	<i>Magnoliophyta</i>
Classe	<i>Magnoliopsida</i>
Ordre	<i>Capparales</i>
Famille	<i>Brassicaceae</i>
Genre	<i>Lepidium</i>
Espèce	<i>Lepidium sativum</i> L.



Fig. 81 : Cresson alénois *Lepidium sativum* L.

1.3. Etude de l'effet herbicide de l'extrait méthanolique et de ses fractions SPE sur le cresson (*Lepidium sativum* L.)

Les tests du pouvoir herbicide des quatre fractions isolées sont réalisés *in vitro* afin de déterminer, le taux de germination, la hauteur de la croissance aérienne et la longueur de la racine de *Lepidium sativum* L. Aux six flacons contenant 150ml de milieu de gélose bactériologique une concentration de 1mg/ml de l'extrait méthanolique et des différentes fractions SPE est incorporée dans chaque flacon. Un contrôle négatif est effectué en remplaçant l'extrait par de l'eau. Chaque flacon est distribué dans 200 µl d'embouts de pipettes stériles à l'aide d'une micropipette dont la pointe est chauffée en passant sur une plaque chauffante. Une graine de cresson stérile est déposée de manière aseptique dans chaque embout. 10 répétitions pour chaque fraction ainsi que pour l'extrait méthanolique. La plaque contenant la préparation est scellée avec du parafilm et incubée à 21 ° C avec une photopériode de 16 h jour / 8 h nuit pendant 3 jours. Le taux de germination, la longueur des racines et la taille des plantules de la partie aérienne sont ensuite calculés. Le taux de la germination des graines de cresson est déterminé à partir de la formule suivante :

$$TG\% = (\text{Nb graines témoin germées} - \text{Nb graines non germées traitées}) \times 100$$

Nb=nombre

2. Résultats et discussion

2.1. Evaluation du rendement des fractions SPE

Sur la base du rendement des fractions calculées, la SPE 5 et la SPE 2 ont enregistré les rendements les plus élevés avec les pourcentages de 31% (147,71 mg) et 30% (145,71 mg) respectivement. Quant aux SPE 3 et SPE 1 ont donné des rendements dont les valeurs moyennes sont de 20% (94, 94mg) et de 14% (67,89mg) respectivement. Le rendement le plus faible a été enregistré par La SPE 4 avec 5% (23, 59 mg).

Tab. 35 : Le rendement (RDT) des Fractions SPE et de l'EM de *Rosmarinus eriocalyx*

Les fractions SPE %	RDT mg	RDT%
Fraction SPE 1	67,89	14%
Fraction SPE 2	145,71	30%
Fraction SPE 3	94,94	20%
Fraction SPE 4	23,59	5%
Fraction SPE 5	147,71	31%

2.2. Effet de l'EM et des fractions SPE sur la germination des graines de *Lepidium sativum* L.

Sur l'optique des résultats présentés dans le **Tab. 36** et la **Fig. 82**, il est clair que les fractions SPE1 et SPE2 n'ont pas affecté la germination des graines, où le taux calculé est de l'ordre de 100% SPE1 et SPE 2. Les SPE 3, SPE 5 et l'EM ont entraîné par contre un effet inhibiteur assez faible sur la germination puisque les taux calculés sont de l'ordre de 90% et 80%. D'une manière globale, un effet inhibiteur très faible aussi bien pour l'extrait méthanolique que pour les fractions SPE3 et SPE 5.

- **N.B. Vu, son faible rendement, La fraction SP4 n'a pas été testée.**

Tab. 36 : Taux de germination (TG%) des graines de *Lepidium sativum* L sous l'effet des fractions SPE et de l'extrait méthanolique de *Rosmarinus eriocalyx*

Taux de germination des graines de <i>Lepidium sativum</i> L. en (%)	
Témoin	100%
Fraction SPE 1	100%
Fraction SPE 2	100%
Fraction SPE 3	90%
Fraction SPE 5	90%
Extrait Méthanolique (EM)	80%

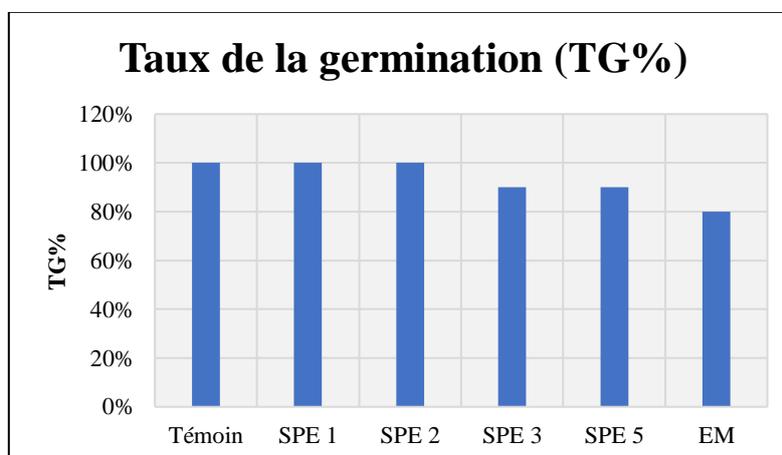


Fig.82 : Taux de germination des graines de *Lepidium sativum* L sous l'effet des fractions SPE et l'extrait méthanolique de *Rosmarinus eriocalyx*

2.3. Effet de l'extrait méthanolique et des fractions SPE sur la longueur des racines de *Lepidium sativum* L.

Concernant l'effet des fractions et l'EM sur la longueur des racines, on visualise nettement que la fraction SPE 5 a exhibé l'effet le plus prononcé sur la croissance des racines où elles ont été considérablement réduites avec une hauteur quasi-nulle. Aussi la fraction SPE 3 a réagi négativement sur la longueur des racines avec une taille la moyenne ne dépassant pas les 9,6 mm. Pour ce qui est de la fraction SPE 1 et l'EM, ils ont exhibé un effet herbicide assez modéré (**Tab 37, Fig. 83**).

Tab. 37 : Longueur des racines de *Lepidium sativum* L. sous l'effet des fractions SPE et l'extrait méthanolique de *Rosmarinus eriocalyx*.

Longueur des racines (mm)	
Témoin	17,2a±1,3
SPE 1	15,3a±2,4
SPE 2	12,6ab±1,6
SPE 3	9,6b±2,9
SPE 5	0,0c±0
EM	16,5a±7

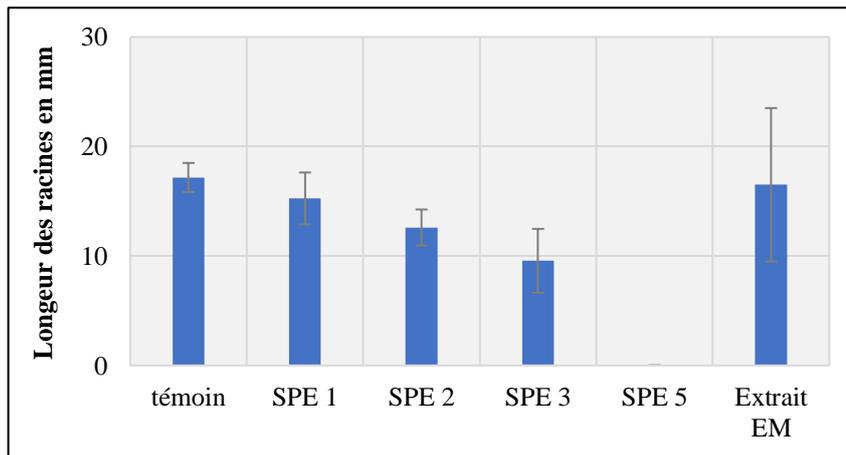


Fig. 83 : Histogramme représentant la longueur des racines de *Lepidium sativum* L. sous l'effet des fractions SPE et l'extrait méthanolique de *Rosmarinus eriocalyx*.

2.4. Effet de l'EM et les fractions SPE sur la croissance des plantules de *Lepidium sativum* L.

L'effet inhibiteur de la fraction SPE 1 est le plus faible sur la croissance des plantules avec une moyenne de 22,8 mm. La fraction SPE 2 a engendré un effet inhibiteur légèrement plus important que celui de la fraction SPE 1. La moyenne de la taille des plantules est de l'ordre de 19,3mm. L'inhibition est encore plus élevée sur la croissance des plantules soumises à l'effet de la fraction SPE 3 avec uniquement une longueur de 16mm (**Tab. 38**).

La toxicité la plus élevée a été enregistrée avec la fraction la plus concentrée de SPE 5 (**Fig. 84**) où la longueur n'a pas dépassé les 6,7mm. Le traitement des graines par l'EM a donné des plantules ayant une taille moyenne de 22,8mm devant une moyenne des plantules témoins de 26,7mm. Une différence de l'ordre de 25,05 % entre les plantules traitées et les témoins non traitées.



Fig. 84. Figure représentant l'effet herbicide de l'extrait méthanolique et de ses fractions SPE sur la croissance des plantules de *Lepidium sativum*L.

Tab.38. Longueur des plantules de *Lepidium sativum* L sous l'effet des fractions SPE et de l'extrait méthanolique de *Rosmarinus eriocalyx*

Longueur des plantules (mm)	
Témoin	26,7a ± 1,4
Fraction SPE 1	22,8ab ± 6,8
Fraction SPE 2	19,3ab ± 2,1
Fraction SPE 3	16,8bc ± 4,6
Fraction SPE 5	6,7c ± 2,9
Extrait éthanolique EM	22,8ab ± 8,2

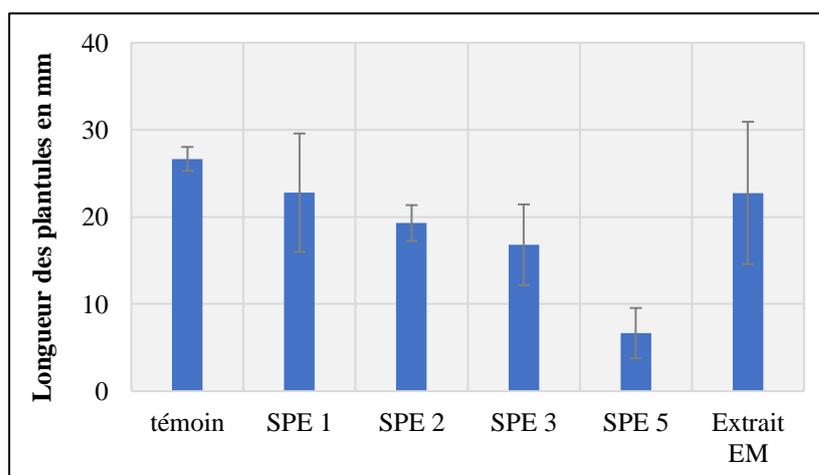


Fig. 85. Histogramme représentant la longueur des plantules de *Lepidium sativum* L. sous l'effet de l'extrait methanolique et des fractions SPE 1 de *Rosmarinus eriocalyx*

Chapitre III : Etude de l'effet herbicide

Sur la base de l'analyse des résultats il s'avère que les biotests réalisés sur l'activité herbicide des SPE et de l'EM sur la germination n'ont pas révélé une toxicité importante sur la faculté germinative des graines de cresson (*Lepidium sativum* L.). Toutes les graines ont germé avec des taux allant de 80% à 100%. Il n'y a pas de similitude entre nos résultats et ceux de **(Qasem et al., 2002)** démontrant que les extraits de *Rosmarinus officinalis* possèdent un effet inhibiteur élevé (aucune germination) sur *Amaranthus retroflexus*.

Les métabolites secondaires des plantes et leurs produits de dégradation peuvent avoir des effets bioherbicides sur certaines espèces de plantes. Par voie de conséquence, ils sont impliqués dans le processus d'inhibition des plantes. Parmi ces composés bioactifs, les terpénoïdes, les stéroïdes, les phénols, les coumarines, les flavonoïdes, les tanins, les alcaloïdes et les glycosides cyanogènes, ainsi que d'autres composés, ont des effets toxiques sur la croissance. **(Chang et al., 2002)**.

En revanche la croissance des plantules a été affectée par les fractions, ceci a été traduit par une diminution simultanée de la taille des pousses et des racines. La fraction SPE 5 s'est montrée la plus toxique en révélant un effet bioherbicide, agissant sur la croissance de l'appareil végétatif aérien du Cresson. Les substances bioherbicides sont libérées dans l'environnement par les organes de la plante tels que les racines, les rhizomes, les feuilles, les tiges, l'écorce, les fleurs, les fruits et les graines. Ces composés affectent la germination et la croissance des plantes avoisinantes en perturbant divers processus physiologiques, notamment la photosynthèse, la respiration, l'équilibre hydrique et hormonal. La cause sous-jacente de leur action est principalement l'inhibition de l'activité enzymatique. L'effet herbicide de cette fraction pourrait être lié à la présence de substances actives inhibitrices telles que les acides phénols à des concentrations élevées. Par ailleurs l'EM s'est révélé moins inhibiteur sur le cresson. Il est probable que son contenu qui est plus riche en principes actifs qui agissent d'une manière synergique en réduisant l'effet bioherbicide. En effet, Certains auteurs **(Khailov, 1975 ; Tukey, 1969)** ont indiqué que l'effet d'un composant donné ou de métabolites végétaux peut être inhibiteur ou stimulateur selon leur concentration dans le milieu environnant. Plusieurs études ont mentionné que l'effet allélopatique d'une plante est lié fortement de la dose utilisée d'une manière dose-réponse **(Arminante et al., 2006)**. Il semble que les doses les plus élevées des extraits de certaines Lamiacées entraînent une activité inhibitrice sur la germination et la taille radicalaire de cresson et de radis **(Arminante et al., 2006)**, Ainsi, **El-Kenany et Fakhry. (2016)** ont obtenu un effet similaire menée sur des extraits aqueux froids et chauds de *Rosmarinus officinalis* et *salvia officinalis* sur l'espèce

Chapitre III : Etude de l'effet herbicide

végétale de *Panicum turgidum*, l'effet estimé était de l'ordre de 92.21% et 83.43% respectivement sur la taille des plantules et des racines. Les effets bioherbicides dépendent à la fois de la nature du végétal et des facteurs environnementaux du biotope. En revanche, l'effet stimulant des extraits de certaines espèces peut indiquer la présence de certaines activités hormonales où les nutriments minéraux favorisent la croissance des mauvaises herbes (**Rice, 1979**).

Dans notre étude, la fraction SPE 5 est celle qui a donné le meilleur résultat en termes de réduction de la croissance et en particulier sur la longueur racinaire. Des potentialités d'inhibition analogues de la croissance aérienne de certaines plantes ont été observées dans des études antérieures telles que celles de **Bhowmik et Doll. (1984)** et **Issa (1996)** leurs études sont rapporté un effet inhibiteur plus important sur les racines. La réduction de la croissance des pousses et des racines peut être due à l'effet de certains agents allélochimiques sur la division et/ ou l'élongation des cellules, entraînant un système racinaire court et une croissance réduite des pousses.

D'autre part, il a été rapporté que les substances allélochimiques de différentes espèces végétales agissent sur les enzymes responsables de la synthèse des hormones végétales, ainsi que sur l'inhibition de l'absorption des nutriments et des ions en modifiant la perméabilité de la membrane plasmique ((**Rice, 1979**). Dans un autre contexte, les extraits de *Lavandula officinalis* et de *Capparis spinosa* testés in situ par application au sol, ont considérablement inhibé la germination des graines et la croissance de deux mauvaises herbes *Amaranthus retroflexus* et *Chenopodium murale* (**Batish, 2007**).

Il à noter par ailleurs que certains extraits qui manifestent un degré d'inhibition de la germination des graines lors d'expérimentations au laboratoire peuvent favoriser la croissance des mauvaises herbes en serre. Ces différences peuvent être dues à différents facteurs, notamment les microorganismes du sol, qui peuvent jouer un rôle dans la détoxification de l'extrait de la plante (**Quasem, 2002**).

L'effet herbicide est variable d'une plante à l'autre (**Quasem, 2002**) et cette variabilité pourrait être due aux différents mécanismes de défense des plantes qui peuvent réduire l'effet toxique de certaines molécules par des réactions enzymatiques. En ce qui concerne notre travail, les résultats auxquels nous nous sommes parvenus mettent en évidence une activité herbicide des fractions de *Rosmarinus eriocalyx* qui est à notre avis serait probablement corrélée à la solubilité de certaines composés polyphénoliques comme les flavonoïdes, les

Chapitre III : Etude de l'effet herbicide

tanins ou les acides phénoliques simples des fractions SPE récupérés dans l'eau qui est considérée comme étant le plus polaire parmi les solvants utilisés, cette solubilité diffère dans son analogue (extrait méthanolique). D'une manière générale, les stress abiotiques et biotiques stimulent souvent la production de certains composés biopesticides ou allélochimiques. Pour cela les mêmes espèces végétales avec les mêmes variétés provenant de biotopes différents soumis à des conditions environnementales différentes n'ont pas le même chémotype et n'ont donc pas les mêmes potentialités ni les mêmes activités biologiques.

Conclusion

Les biotests de l'effet herbicide de l'EM et les fractions SPE n'ont pas montré d'effet inhibiteur sur la faculté germinative des graines de cresson (*Lepidium sativum* L.) puisque les taux de germination. Cependant, les SPE ont affecté la croissance de cresson qui s'est traduite par une diminution de la longueur des racines et des plantules. Parmi les fractions SPE testées, la fraction SPE 5 dont le rendement est le plus élevé s'est montrée la plus toxique.

Cette toxicité vis à vis des racines et des plantules de cette SP5 pourrait être corrélée à son contenu composé de plusieurs biomolécules qui sont probablement dotées d'un pouvoir herbicide envers les graines, les racines et les petites plantules de cette espèce végétale de cresson. Ces résultats mettent l'action sur la présence probable de plusieurs molécules et entre autres les acides phénoliques simples à des concentrations considérables dans les fractions SPE 5. Ces molécules sont dans la plupart des cas, des inhibiteurs de croissance lorsqu'elles sont utilisées à des fortes doses. L'extrait méthanolique par contre, s'est révélé le moins inhibiteur et paraît quelquefois encore stimulateur de la croissance de l'espèce étudiée.

Les nouvelles recherches se concentreront probablement sur les moyens de tirer parti des produits herbicide pour améliorer la production végétale et développer une agriculture plus durable, y compris la lutte contre les mauvaises herbes et les ravageurs par la rotation des cultures, la gestion des résidus et diverses approches de lutte biologique. Il est temps de recourir aux produits biologiques tels que les extraits de plantes pour une agriculture écologique durable et trouver un équilibre entre les objectifs de productivité de l'agriculture conventionnelle et les pré-requis de l'agriculture purement biologique.

CHAPITRE IV

ETUDE DE LA TOXICITE DES

EXTRAITS SUR LES

ORGANISMES ANIMAUX NON

CIBLES

Chapitre IV : Etude de la toxicité des extraits sur les organismes animaux non cibles

Introduction

Dans le monde entier, 40% des produits agricoles sont perdus du fait des maladies des plantes, des mauvaises herbes et des ravageurs. S'il n'y avait pas eu de pesticides, les pertes de récolte auraient été beaucoup plus importantes. En outre, ces substances chimiques protègent non seulement les cultures des dommages causés par les organismes nuisibles, mais elles augmentent également considérablement les rendements des cultures. Selon (**Majewski et Capel, 1995**), en contrepartie, les risques liés à l'utilisation de pesticides ont dépassé leurs effets bénéfiques. Environ 80 à 90% des pesticides appliqués peuvent se volatiliser quelques jours après l'application et affectent la biodiversité animale et végétale, les réseaux trophiques aquatiques et terrestres ainsi que les écosystèmes. Selon l'**AFSAA (2008)**, les produits phytosanitaires et surtout les néonicotinoïdes sont pointés du doigt par les professionnels de la filière apicole. Ces insecticides mis sur le marché dans les années 1990 ont révolutionné les pratiques agricoles, mais leurs effets systémiques sur les espèces non-cibles comme les abeilles ainsi que leur longue persistance dans l'environnement sont à l'origine de la polémique autour de son utilisation (**Jeschke et Nauen 2008**).

Dans son examen de l'utilisation potentielle des substances à action pesticide (**Putnam, 1988**) a répertorié six classes de produits isolés parmi plus de 30 familles de plantes terrestres et aquatiques. Ces classes sont les terpènes, les alcaloïdes, les benzoxazinones, les dérivés de l'acide cinnamique, les flavonoïdes. Tous ces produits chimiques possèdent une toxicité réelle ou potentielle sur les différentes composantes de l'environnement (Plantes, animaux, insectes etc.)

Les abeilles domestiques sont les espèces les plus atteintes par l'application des molécules de pesticides selon **Majewski et Capel (1995)**. Ces dernières sont les plus distribuées et qui constituent le principal groupe de pollinisateurs et sont les insectes économiquement les plus importants pour l'agriculture dans de nombreuses régions du monde. Malheureusement, au cours des 10 dernières années, une mortalité élevée d'*Apis mellifera intermissa*, a été fréquemment signalée dans des pays d'Afrique. L'effet pervers des pesticides sur les abeilles est beaucoup plus perceptible dans les travaux de **Johansen (1977)**, lorsqu'il montrait que le carbaryl, un insecticide qui a été utilisé aux Etats Unis, a causé dans les années 1967, la destruction de 70000 colonies d'abeilles. Ces insecticides affectent aussi les aptitudes comportementales des abeilles (les performances d'apprentissage et de mémorisation (**Pham-Delègue et al., 1992 ; Masson et al., 1993**)).

Chapitre IV : Etude de la toxicité des extraits sur les organismes animaux non cibles

En Algérie, au cours des dernières années, la mortalité des abeilles mellifères, variant entre 11% et 90%, a été déclarée par les agriculteurs, principalement dans les régions agricoles (**Adjlane et al., 2012**). Or, depuis une vingtaine d'années, les apiculteurs et les scientifiques signalent une diminution significative des populations d'abeilles à l'échelle mondiale (**Van Der Sluijs et al., 2013**).

Outre les abeilles, les vers de terre représentent une proportion importante de la biomasse du sol, plus de 80% du poids frais (**Yasmin et D'Souza, 2010**) et assurent des fonctions agroécologiques importantes car ils influencent la dynamique de la matière organique et la structure du sol (**Edwards et Bohlen, 1996 ; Sims et Gerard, 1999**). Ils sont importants dans le développement et le maintien de la fertilité des sols, ils transforment les matériaux biodégradables et les déchets organiques en vermicompost riches en éléments nutritifs (**Jansirani et al., 2012**). Les vers de terre fournissent des fonctions clés du sol qui favorisent de nombreux services écosystémiques positifs. Ces services sont importants pour la durabilité des agroécosystèmes, mais peuvent être dégradés par des pratiques culturales intensives telles que l'utilisation de pesticides. Les pesticides peuvent montrer à la fois la toxicité directe contre les vers de terre et produire des effets latents sur la croissance et la fertilité.

Les fongicides sont généralement très toxiques pour les vers de terre, en particulier les résidus de cuivre et de zinc provenant du sulfate de cuivre et des carbamates, respectivement. Les fumigants, les nématicides et les fongicides tels que le mélange D-D dichloropropane dichloropropène, le méthan-sodium et le bromure de méthyle sont extrêmement toxiques pour les vers de terre. (**Edwards et Bohlen, 1992**).

Un autre insecte d'intérêt agricole qui peut être affecté par l'emploi des pesticides, il est question de l'auxiliaire *Nesidocoris tenuis*. L'effet néfaste de ces produits de synthèse conventionnels est notable sur les auxiliaires utilisées dans la lutte biologique comme *Nesidocoris tenuis* puisqu'elles s'alimentent des insectes nuisibles des cultures maraichères, mais lorsque ces derniers sont traités par des insecticides, elles disparaissent complètement.

Vu, toutes ces conséquences néfastes, l'emploi des pesticides de synthèse est à l'heure actuelle remis en cause pour être remplacé par l'utilisation des substances naturelles biologiques. Il est probable que les produits naturels fourniront des produits utiles pour aider la production agricole. Ces produits naturels issus des plantes ou encore des certains microorganismes constituent une alternative qui permettrait de diminuer considérablement l'utilisation des produits pesticides conventionnels (**Chomienne et al., 2017**). En controverse ces composés pourront eux aussi avoir des effets toxiques pour les organismes non ciblés.

Chapitre IV : Etude de la toxicité des extraits sur les organismes animaux non cibles

C'est donc pour toutes ces raisons, que nous nous sommes intéressés aux effets secondaires de différentes concentrations de notre extrait méthanolique issu de *Rosmarinus eriocalyx* sur les organismes animaux non cibles. Pour ce faire, des biotests de toxicité ont été réalisés sur des organismes utiles tels que les abeilles, les vers de terre, les punaises agricoles utilisées dans la lutte biologique. Ces essais ont porté sur la viabilité et la mortalité temporelles et l'évaluation de la DL 50 et la DL 100 de la population affectée par comparaison à la population témoin.

1. Matériel et Méthodes

1.1. Extrait méthanolique de *Rosmarinus eriocalyx*

La préparation de l'extrait méthanolique été détaillée dans le chapitre I

1.2. Fongicide Hymexazole

Toutes les données concernant cette molécule ont été présentées dans le chapitre II

1.3. Organismes non cibles

1.3.1. L'abeille *Apis mellifera intermissa*

L'abeille est une espèce clé et tous les scientifiques s'accordent aujourd'hui pour dire que sa disparition entrainerait de graves problèmes pour la nature et donc pour l'homme. L'abeille est essentielle à la vie sur terre. Elle présente un intérêt économique indéniable : nous pensons bien évidemment aux produits de la ruche, mais aussi et surtout à son rôle fondamental dans la pollinisation et, par conséquent, dans la survie des cultures.

La pollinisation est donc indispensable à la reproduction sexuée. Une bonne pollinisation peut aussi permettre de réduire les délais entre floraison et nouaison, et ainsi atténuer les risques d'exposition des fruits aux nuisibles, aux maladies, aux intempéries, aux produits agrochimiques, et diminuer la consommation d'eau (PNUE, 2010). On estime à environ 20 000, le nombre de végétaux dont la pérennité dépend de la pollinisation des abeilles. En agronomie, la pollinisation assurée par les abeilles augmente le rendement qualitatif et quantitatif de 40% de plantes cultivées telles que les fruits, les légumes et les oléagineux, ce qui représenterait, au niveau européen, 84% des espèces cultivées tributaires des pollinisateurs, parmi lesquels les abeilles sauvages et domestiques comptent pour plus de 90% (Charpentier, 2013).

Chapitre IV : Etude de la toxicité des extraits sur les organismes animaux non cibles

Une étude de **Vaissière (2005)** a mis en relief le rôle prépondérant des abeilles dans la pollinisation du cotonnier. En effet, le pollen du coton est lourd et ne peut être transporté par le vent, aussi, les fleurs du cotonnier restent ouvertes une seule journée.

Vu, son utilité, nous avons réalisé les tests de toxicité sur une espèce mellifère, *Apis mellifera intermissa* provenant d'une ruche de la région de Seraidi

Tab. 39 : La systématique d'*Apis mellifera intermissa* d'après (**Buttel-Reepen ,1906 ; Marchenay et Laurence, 2007**).

Embranchement	Arthropodes
Sous embranchement	Mandibulates
Classe	Insectes
Sous classe	Ptérygotes
Ordre	Hyménoptères
Famille	Apidés
Genre	<i>Apis</i>
Espèce	<i>mellifera</i>
Sous-espèce :	<i>intermissa</i>



Fig. 86 : *Apis millefera intermissa*

1.3.2. *Lumbricus terrestris* L.

Les vers de terre jouent un rôle fondamental dans la fertilité des sols en matière organique. Les activités alimentaires et de rejet des vers de terre affectent différemment la matière organique du sol en fonction de l'échelle de temps considérée puisqu'à court terme, l'activité des vers de terre favorise la minéralisation de la matière organique alors qu'à long terme, ils participent à la formation de l'humus et à la stabilité structurale. La création de galeries des vers de terre augmente la macroporosité du sol et, par conséquent, contribuent à son aération (**Lavelle, 1997**) et à l'infiltration de l'eau. Elles facilitent aussi la pénétration des racines, ainsi que les mouvements des invertébrés (**Jégou et al., 2002**). Une meilleure infiltration de l'eau peut minimiser le ruissellement, l'érosion et le transport d'éléments dissous dans l'eau de surface, ce qui réduit les risques de pollution des sols.

L'espèce de vers de terre utilisée dans cette expérimentation est une espèce provenant d'un sol agricole de la région de Berrahal

Chapitre IV : Etude de la toxicité des extraits sur les organismes animaux non cibles

Tab. 40 : La systématique de *Lumbricusterrestris* L., 1758)

Règne	Animalia
Embranchement	Annelida
Classe	Clitellata
Ordre	Haplotaxida
Famille	<i>Lumbricidae</i>
Genre	<i>Lumbricus</i>
Espèce	<i>terrestris</i>



Fig. 87 : *Lumbricus terrestris* L.

1.3.3. *Nesidiocoris tenuis*

Les punaises utilisées dans cette partie de notre travail proviennent de l'INPV (Institut Nationale de la Protection des Végétaux) la station de Ben M'hidi. C'est une espèce d'auxiliaire utilisée dans la lutte biologique des cultures maraichères sous serre de la station de la protection des végétaux.

Nesidiocoris tenuis est une espèce prédatrice très importante dans le contrôle biologique des aleurodes rencontrés dans les cultures légumières, comme la tomate et l'aubergine. On la retrouve naturellement dans les cultures protégées dans les pays du Bassin méditerranéen. C'est un prédateur polyphage très actif à tous les stades de développement, ce qui lui permet de se déplacer très rapidement à la recherche de proies. Ils attaquent les ravageurs des cultures et ne provoquent aucun dégât sur la plante hôte. *Nesidiocoris tenuis* a fait l'objet de plusieurs travaux récents en raison de son importance économique et de sa dualité en tant que prédateur et phytophage. Plusieurs groupes de chercheurs ont également signalé ses attributs de prédateur, soulignant sa contribution à la réduction des populations d'organismes nuisibles à la mouche blanche et au lépidoptère. La libération accrue et la conservation de *Nesidiocorus tenuis* ont été encouragées pour lutter contre les ravageurs des cultures de tomates.

Chapitre IV : Etude de la toxicité des extraits sur les organismes animaux non cibles

Tab. 41 : La systématique de *Nesidiocoris tenuis* (Reuter, 1895)

Règne	Animalia
Phylum	Arthropodes
Subphylum	Uniramia
Classe	Insecta
Ordre	Hemiptera
Famille	Miridae
Genre	<i>Nesidiocoris</i>
Espèce	<i>Nesidiocoris tenuis</i>



Fig. 88 : *Nesidiocoris tenuis*



Fig. 89 : Elevage *Nesidiocoris tenuis* sur feuille de *Nicotiana tabacum* (INPV, 2016)

1.4. Méthodes suivies

1.4.1. Toxicité de l'extrait méthanolique sur *Apis mellifera intermissa*

Un nombre de 100 abeilles réparties en 5 lots de 20 individus chacun est maintenu dans des cages puis alimenté de 100ml d'une solution nutritive à base de saccharose et d'eau (50% p/v) dans laquelle est ajoutée une concentration de l'extrait méthanolique de *Rosmarinus eriocalyx* ou de pesticide (**Tab. 42**) Les taux de mortalité et de viabilité sont calculés toutes les 12 heures. Après 48 heures les DL 50 et DL 100 sont déterminées selon une courbe de tendance.

- La DL50 est une mesure pour évaluer la toxicité d'une substance. La DL50 définit la dose nécessaire d'une substance pour tuer 50% d'un groupe d'animaux testés
- La DL 100 est la dose nécessaire pour tuer 100% d'un groupe de population

Chapitre IV : Etude de la toxicité des extraits sur les organismes animaux non cibles

Tab. 42 : Protocole expérimental du test de toxicité sur *Apis mellifera intermissa*

Nombre d'abeilles dans chaque lot	100 abeilles				
	Lot 1	Lot 2	Lot 3	Lot 4	Lot 5
	20	20	20	20	20
Concentration de la solution nutritive (Sacharose+Eau)	50%	50%	50%	50%	50%
Ajout de l'EM ou du Hymexazole, ou Eau	20ml Eau	1mg/ml EM	5mg/ml EM	10mg/ml EM	2µl /ml Hymexazole

1.4.2. Toxicité de l'extrait méthanolique sur *Lumbricus terrestris* L.

Les vers de terre (n= 100) sont répartis en 5 lots de 20 vers de terre chacun, sont placés dans des bacs en plastique contenant un sol pulvérisé de pesticide ou des différentes concentrations de l'extrait méthanolique (**Tab. 43**). Les taux de viabilité et de mortalité sont déterminés dans le temps toutes les 12 heures. La DL 50 et la DL100 sont évaluées après 48heures.

Tab. 43 : Protocole expérimentale du test de toxicité sur *Lumbricus terrestris* L.

Nombre total de vers de terre	100 vers de terre				
	Lot 1	Lot 2	Lot 3	Lot 4	Lot 5
Nombre De vers de terre par lot	20	20	20	20	20
Sol additionné d'EM à différentes concentrations ou l'Hymexazole, ou eau	500g + 20ml Eau/g sol	500g+ 1mg EM/g sol	500g+ 5mg EM/g sol	500g+10mg EM/g sol	500g+2µl Hymexazole/g sol

1.4.3. Toxicité de l'extrait méthanolique sur *Nesidiocori stenvis*

Les punaises au nombre de 100 sont également divisées en 5 lots de 20 punaises chacun. Les punaises testées sont élevées sur des feuilles de tabac préalablement trempées dans la solution de l'extrait méthanolique préparé à différentes concentrations (*Nicotiana tabaccum*) ou dans la solution du pesticide (**Tab. 44**). Après un suivi de la viabilité et de la mortalité, les DL50 et DL 100 sont déterminées après 48heures.

Chapitre IV : Etude de la toxicité des extraits sur les organismes animaux non cibles

Tab. 44 : Protocole expérimental du test de toxicité sur *Nesidiocoris tenuis*

Nombre total de <i>Nesidiocoris tenuis</i>	100 de punaises				
	Lot 1	Lot 2	Lot 3	Lot 4	Lot 5
Nombre de <i>Nesidiocoris tenuis</i> par lot	20	20	20	20	20
Fragments de feuilles de <i>Nicotiana tabacum</i> +EM ou, Hymexazole, ou eau	+20ml eau	+1mg/ml EM	+5mg/ml EM	+10mg/ml EM	2µl/ml Hymexazole

2. Résultats et discussion

2.1. Toxicité sur *Apis mellifera intermissa*

Sur la base des taux de mortalité enregistré après 48h (**Tab. 45**), toutes les concentrations testées utilisée ont prononcé un effet toxique pour les abeilles. La concentration 1mg/ml a montré le taux de mortalité le plus faible qui est de 40%. La concentration de 5mg/ml quant à elle a provoqué une mortalité de 80%.

La concentration de 10mg/ml est celle qui a induit le plus haut pourcentage de mortalité et qui correspond 95% après 48h. Plus la dose est élevée, plus la toxicité est importante, ce qui traduit un effet dose-réponse. L'effet du pesticide a été enregistré plus tôt que celui de l'extrait puisque les abeilles ont présenté une toxicité aiguë au bout de 24h sous l'action de l'Hymexazole (**Fig. 90**). D'après les résultats enregistrés, la valeur de la DL50 correspond à 1,49mg/ml et la DL 100 est de 11,95 mg/ml (**Tab.48**)

Tab.45 : Taux de mortalité d'*Apis mellifera intermissa* soumises à l'effet de l'extrait méthanolique de *Rosmarinus eriocalyx*

Différents lots d' <i>Apismellifera</i>	Lot témoin	Lot 1	Lot 2	Lot 3	Lot 4
Viabilité/ T _{0h} (NID)	20	20	20	20	20
Viabilité/ T _{12h} (NID)	20	19	14	13	8
Viabilité/ T _{24h} (NID)	20	15	11	5	0
Viabilité/ T _{36h} (NID)	20	12	7	2	0
Viabilité/ T _{48h} (NID)	20	12	4	1	0
Taux de mortalité/48h (ND)en pourcentage	0%	40%	80%	95%	100%

NID : Nombre d'individu

Chapitre IV : Etude de la toxicité des extraits sur les organismes animaux non cibles

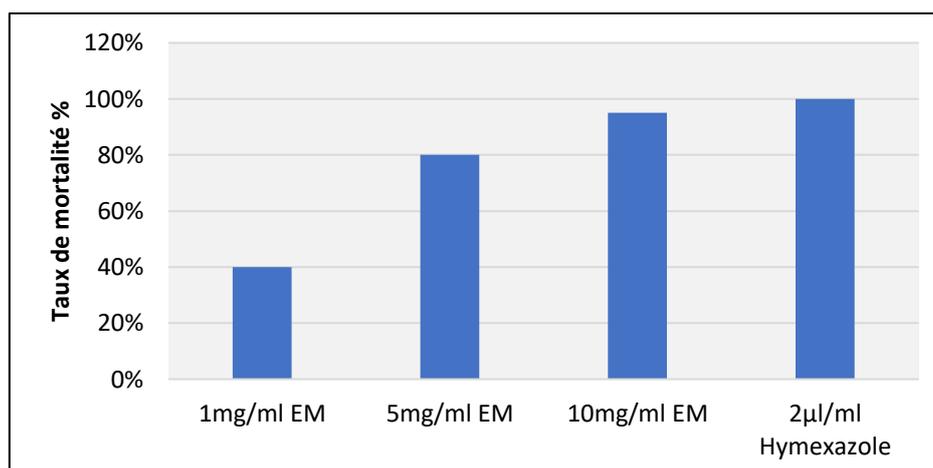


Fig.90 : Taux de mortalité d'*Apis mellifera intermissa* (les abeilles) sous l'effet de l'extrait méthanolique de *Rosmarinus eriocaly*

2.2. Toxicité sur *Lumbricus terrestris* L.

Sur l'optique des résultats présentés dans le (Tab.46), il est bien clair que toutes les concentrations ont montré une toxicité sur les vers de terre testés avec des taux de mortalité variables. La dose 1mg/g de sol a exprimé l'effet le moins faible avec un taux de mortalité de 20%. La concentration 10mg/ml a manifesté le taux léthal le plus élevé avec un pourcentage de 55%. Le produit de référence, L'Hymexazole a prononcé l'effet toxique le plus fort où la mortalité des vers de terre a été de 100% après les 48h (Fig. 91). Sur la base de l'équation déterminé, la DL50 et DL100 ont été calculées en se référant à l'équation de la courbe de tendance. Les valeurs respectives retrouvées sont de l'ordre de 8,14mg/g et de 243,77mg/g (Tab.48)

Tab.46 : Taux de mortalité de *Lumbricus terrestris*L. Soumises à l'effet de l'extrait méthanolique de *Rosmarinus eriocalyx*

<i>Différents lots de Lumbricus terrestris</i>	Lot témoin	Lot 1	Lot 2	Lot 3	Lot 4 Hymexazole
Viabilité/ T _{0h} (ND)	20	20	20	20	20
Viabilité/ T _{12h} (ND)	20	20	20	20	18
Viabilité/ T _{24h} (ND)	20	20	16	13	10
Viabilité/ T _{36h} (ND)	20	17	13	9	0
Viabilité/ T _{48h} (ND)	20	16	12	9	0
Taux de mortalité/T _{48h} (ND)	0%	20%	40%	55%	100%

Chapitre IV : Etude de la toxicité des extraits sur les organismes animaux non cibles

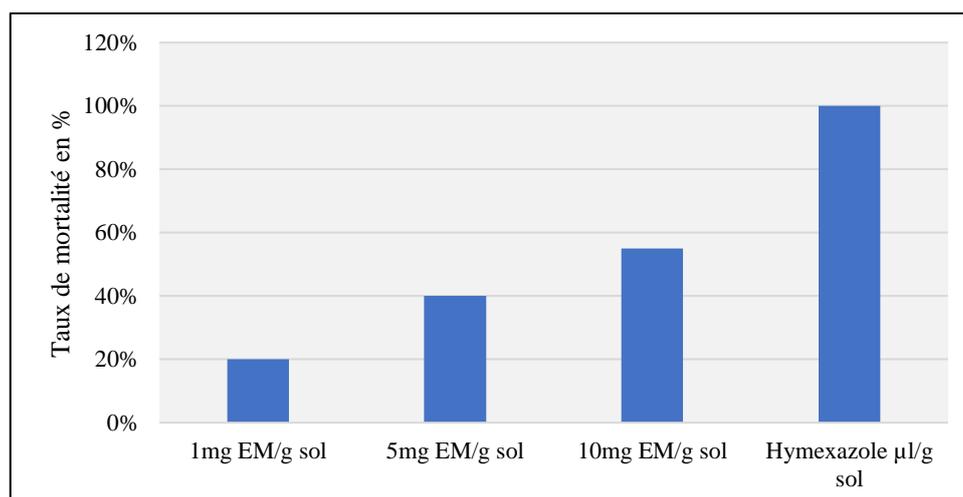


Fig. 91 : Taux de mortalité *Lumbricus terrestris* L. sous l'effet de l'extrait méthanolique de *Rosmarinus eriocalyx*

2.3. Toxicité sur *Nesidiocoris tenuis*

Toutes les punaises testées se sont montrées sensibles à l'effet aussi bien de l'EM que pour l'Hymexazole (**Tab. 47**). Un taux de mortalité de 100% a été enregistré au niveau du pesticide. Selon les taux de mortalité calculés, on constate que les trois concentrations de l'EM testées ont évalué une toxicité variable vis-à-vis des insectes de *Nesidiocoris tenuis* 24 heures après ingestion.

Là aussi, le taux de mortalité est proportionnel à la concentration. Plus la concentration est importante, plus le taux de mortalité est élevé. La concentration 1mg/ml a provoqué le taux de mortalité le moins élevé (30%), quant à la concentration 5mg/ml a provoqué un taux de 70%. La concentration 10mg/ml s'est avéré la plus toxique avec un pourcentage de mortalité de l'ordre de 90% (**Fig. 92**). La DL 50 calculé est de 2,43mg/ml tandis que la DL 100 est presque quatre fois plus élevée que la DL 50 avec une valeur de 11,44 mg/ml (**Tab.48**)

Tab. 47 : Taux de mortalité de *Nesidiocoris tenuis* soumises à l'effet de l'extrait méthanolique de *Rosmarinus eriocalyx*

<i>Différents lots de Nesidiocoris tenuis</i>	Lot 1	Lot 2	Lot 3	Lot 4	Lot 5
Viabilité/ T _{0h} (ND)	20	20	20	20	20
Viabilité/T _{12h} (ND)	20	17	11	9	0
Viabilité/T _{24h} (ND)	20	14	6	2	0
Taux de mortalité/24h _(ND)	0%	30%	70%	90%	100%

Chapitre IV : Etude de la toxicité des extraits sur les organismes animaux non cibles

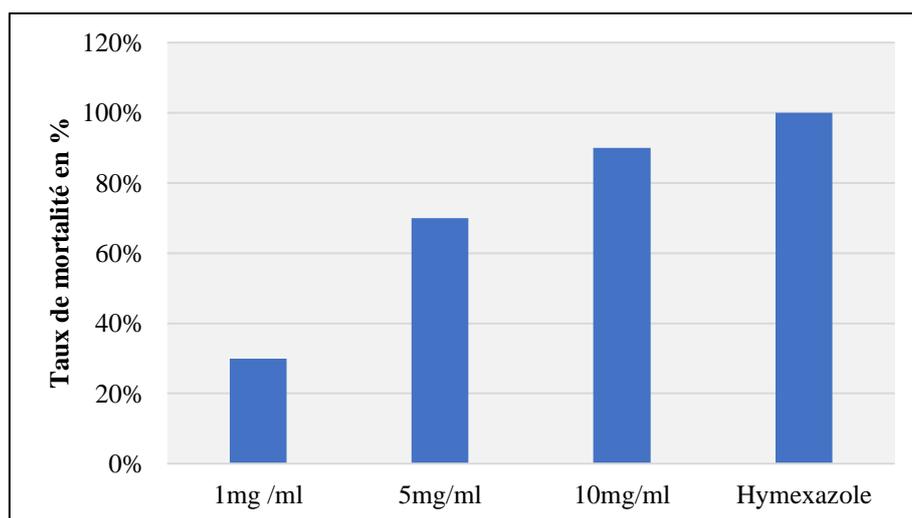


Fig. 92 : Taux de mortalité de *Nesidiocoris tenuis* sous l'effet de l'extrait méthanolique de *Rosmarinus eriocalyx*

Tab. 48 : DL 50 et DL 100 des organismes animaux non cibles.

Organisme non cibles	DL 50 (mg/ml)	DL100 (mg/ml)
<i>Apis mellifera intermissa</i>	1,49	11,95
<i>Lumbricus terrestris</i> L	8,14	243,77
<i>Nesidiocoris tenuis</i>	2,43	11,44

Les concentrations testées ont exhibé une toxicité sur les abeilles avec des taux de mortalité assez élevées allant de 40% à 95% après les 48h par la consommation des abeilles du saccharose supplémenté de l'extrait méthanolique de la plante de *Rosmarinus eriocalyx*. Cet effet toxique sur les abeilles a été signalé dans des travaux antérieurs sur les huiles essentielles de certaines plantes. Nous pouvons citer à titre d'exemple, les huiles essentielles de *Salvia officinalis*. Les huiles concernées par cet effet et possédant un pouvoir de toxicité sur les organismes non cibles sont l' α -thujone (27%), le camphre (11%), l' α -humulène (8%), l'eucalyptol (8%), le caryophyllène (6%) et la β -thujone (6%). Ces huiles utilisées à des concentrations comprises entre 300 μ g et 500 μ g induisent des taux de mortalité s'échelonnant entre 10% et 22% (Flesar *et al.*, 2010). Nous remarquons que les taux de mortalité sont assez faibles par rapport à ceux enregistrés à partir de notre extrait. Ceci est probablement en rapport avec les concentrations ingérées qui sont plus élevées dans notre travail.

Chapitre IV : Etude de la toxicité des extraits sur les organismes animaux non cibles

Nos résultats semblent concorder avec ceux de **Flesar et al. (2010)** où la toxicité des produits testés (la capsaïcine, de l'acide nordihydroguaiarétique, de la thymoquinone, du trans-2-hexénal) de *Humulus lupulus*, *Myrtus communis* exprimés en DL50 n'a pas pu être déterminée avec précision car la plupart d'entre eux ont montré des effets létaux de l'ordre de (100%) chez les abeilles à des concentrations très élevées (valeurs DL50 de la capsaïcine, de l'acide nordihydroguaiarétique, de la thymoquinone, du trans-2-hexénal, *Humulus lupulus*, *Myrtus communis* étaient respectivement > 100, > 200, > 100, > 200, > 100 et > 100 mg par abeille). L'huile de thym pour sa part, a provoqué une mortalité totale de près de 100%. Les produits toxiques des huiles en question sont les p-cymol (32%), thymol (22%) et γ -terpinène (12%). Cependant la létalité des abeilles était comprise entre 20 et 40%.

Cette toxicité sur les abeilles des extraits naturels employés comme biopesticides a été également enregistrée à partir des huiles essentielles (Eucalyptol et B pinène) de l'hyssope (*Hyssopus officinalis* L.). Ces huiles à puissante action acaricide (100%) lorsqu'elles sont utilisées à une concentration de 500 μ g/l ont cependant un effet toxique assez élevé (mortalité de 70%) sur les organismes non cibles, entre autres, les abeilles (**Imdorf et al., 1995**). La toxicité de cette huile d'hyssope est due à la présence de l'eucalyptol (43%) puisqu'il a été constaté lors de cette étude que la biomolécule de l'eucalyptol pur provoquait à elle seule un effet similaire à celui de toute l'huile brute de l'hyssope (**Imdorf et al., 1995**).

Les abeilles semblent très sensibles aux effets de nombreuses huiles essentielles. Parmi celles-ci, le thymol et le menthol sont les biomolécules de l'huile de girofle qui possèdent le plus haut pouvoir de toxicité sur les abeilles (**Lindberg et al., 2000, Ellis et Baxendal, 1997**).

Ces résultats semblent en désaccord avec les travaux récents de **Ebert et al. (2007)** qui signalent que parmi les produits testés que le menthol et l'huile de girofle figuraient parmi les moins toxiques. La toxicité des composants naturels sur les insectes est liée à leur composition chimique. Les substances naturelles et les huiles essentielles sont lipophiles et cette affinité pour les graisses les rend perméables au niveau des membranes entraînant une dysfonction biochimique. Par conséquent, ils peuvent pénétrer et traverser rapidement et facilement à l'intérieur des tissus causant ainsi la mortalité (**Lee et al., 2004**).

La toxicité des huiles ne dépend pas seulement des composés chimiques qui agissent comme des toxines, mais également de nombreux autres facteurs jouant un rôle important dans la toxicité. Le poids moléculaire, les mécanismes d'action, le point d'entrée de la toxine sont des facteurs de ces huiles essentielles induisant la toxicité. En effet, il a été signalé que ces huiles

Chapitre IV : Etude de la toxicité des extraits sur les organismes animaux non cibles

ayant des activités insecticides peuvent être inhalées, ingérées ou absorbées par la peau des insectes (Zols et Bicevskis, 1979).

Les vers de terre sont des organismes sensibles aux changements dans la composition du sol, lorsque que ce dernier est pollué ou il contient des substances toxiques ceci se répercute sur la viabilité et les activités des vers de terre. Beaucoup de travaux ont signalé l'effet toxiques des pesticides sur la vitalité de ces organismes et que leur absence a été un des causes de la dégradation des sols agricole.

Nos résultats obtenus ont révélé que les concentrations élevées de l'EM de *Rosmarinus eriocalyx* ont exhibé un effet toxique sur les vers de terre après les 48h, la DL50 calculée est de l'ordre de 8,14mg/ml. Peu d'études ont étudié l'effet des substances naturels sur les organismes non cibles, notamment les vers de terres malgré leur importance agroécologique. Les résultats obtenus à partir de notre plante sont assez hétérogènes par rapport à une étude récente réalisée par Hussain *et al.* (2017) ont étudié sur la toxicité de l'extrait de feuilles de Neem vis-à-vis des vers de terre. La DL 50 de l'extrait de feuilles de neem enregistrée est de l'ordre de 5,47 ppm. Tandis que La mortalité moyenne après une exposition de 48 heures varie de 10, 20, 30, 40 et 60% pour 0,50, 1,0, 2,0, 4,0 et 8,0 ppm, respectivement. D'après ces chiffres, nous pouvons déduire que les concentrations utilisées de l'extrait de *Rosmarinus eriocalyx* semblent plus toxiques sur les vers de terre. Ceci pourrait être expliqué par l'utilisation de concentration plus élevée et la nature les espèces des vers terre utilisés dans l'expérimentation. Par ailleurs, dans une autre étude signalée par Vasantha-Srinivasan *et al.* (2017), les concentrations létales de l'huile essentielle nom scientifique de *Piper bitele* L (Bétel) contre deux espèces de vers terre *Eudrilus eugeniae* et *Eisenia fetida*. L'huile essentielle des feuilles se sont avérées très élevées (3149mg/kg et 4081 mg/kg). D'après les chiffres obtenus, on pourrait avancer que l'extrait de cette plante de *Piper bitele* ne possèdent pas une vraie toxicité létale pour ce type de vers de terre. Ceci semble également en parfaite concordance avec nos résultats.

Si maintenant, nous essayons d'estimer la toxicité de notre EM sur un autre type d'insecte tels que les punaises *Nesidiocoris tenuis*, nous constatons que l'effet toxique a été très rapide, et ce, dès l'utilisation de la plus faible concentration (1mg/ml) avec 30% pourcentages 24h après l'ingestion. En général, toutes les concentrations testées ont manifesté une mortalité au niveau de la population des punaises testées. Le taux le plus important a été enregistré avec concentration de 10mg/ml (90%). Ce résultat vient confirmer la toxicité de l'extrait brut de

Chapitre IV : Etude de la toxicité des extraits sur les organismes animaux non cibles

Rosmarinus eriocalyx. Ceci nous laisse supposer que la plante possède des biomolécules ayant un effet biocide vis-à-vis de ces insectes lorsqu'elles sont utilisées à forte dose comme c'est le cas de nos recherches. *Nedidiocoris tenuis* est en réalité utilisée dans la lutte biologique contre les ravageurs des cultures maraichères, de ce fait, les recherches concernant sa sensibilité ou résistance vis-à-vis des extraits naturels, sont quasi-nulles.

Pour cela, nous n'avons pas pu comparer nos résultats avec des études antérieures. Cependant, il a été signalé dans la littérature, que les pesticides chimiques conventionnels provoquent des effets très toxiques entraînant une mortalité considérable. Dans le traitement biologique à base de ces punaises, il est conseillé de ne pas employer d'autres traitements à base de pesticide de synthèse. En effet, dans notre cas, l'Hyméxazole utilisé a induit une mortalité totale de 100% après 12h. D'ailleurs, **Mahmood et al. (2016)** a étudié l'effet de sept pesticides sur cet insecte et il a prouvé que toutes les molécules pesticides testées ont exercé un effet toxique aigu avec des taux de mortalité qui ont atteint plus de 55% après 24h.

Les effets secondaires de trois formulations de neem (Neem-Amin EC, Stardoor et B.P. 20 / S) ont été testés en laboratoire sur le prédateur *miride Macrolophus caliginosus* Wagner. Les essais de toxicité directe menés sur des nymphes du premier stade exposées à des doses différentes de résidus secs ont montré que tous les produits étaient nocifs pour les insectes, avec des valeurs de DL50 très inférieures au taux maximal recommandé (0,264, 1,083, 1,217 mg / l au lieu de 15, 31,5 et 80 mg / l pour Neem-Amin EC, Stardoor et BP 20 / S, respectivement. Des tests de persistance ont été effectués sur des plants de poivrons coupés traités au taux maximum recommandé. Une mortalité élevée de 70% et 90% a été enregistrée lorsque les insectes ont été introduits sur les plantes juste après le traitement.

On peut déduire à partir de tous ces biotests sur les organismes animaux non cibles que l'extrait naturel de *Rosmarinus eriocalyx* exerce une toxicité très faible voire même nulle à faible dose. La toxicité ne commence à apparaître qu'à partir des doses ou des concentrations élevées, ce qui est le cas de tous les composés naturels qui ne sont toxiques qu'à fortes doses. Nos résultats se concorobent avec celles trouvées par **Tedeschi et al. (2001)**

Chapitre IV : Etude de la toxicité des extraits sur les organismes animaux non cibles

Conclusion

Le test de la toxicité de l'EM de la plante de *Rosmarinus eriocalyx* sur les différents organismes non cibles utilisés dans notre expérimentation ont provoqué des effets létaux à forte dose, plus la dose est élevée, plus la toxicité est importante et le taux de mortalité est accru. C'est une réponse à effet dose-dépendante. Les abeilles *Apis mellifera intermissa* ont été sensiblement affectées par les doses ingérées de l'EM. Les taux de mortalité ont été assez élevés et ont atteint les 95% après les 48h avec des DL 50 de l'ordre de 1,49 mg/ml et des DL 100 plus importantes de l'ordre de 11,95 mg/ml. De même nos résultats obtenus ont révélé que les concentrations élevées de l'EM de *Rosmarinus eriocalyx* ont exhibé un effet toxique sur les vers de terre après les 48 h avec une DL50 plus haute 8,14 mg/ml que celle des abeilles et une DL100 très grande de l'ordre de 243,77mg/g avec des taux de mortalité enregistrés s'échelonnent de 20% à 55% moins élevés que celles des abeilles après les 48h.

Les punaises *Nesidiocoris tenuis*, paraissent les plus sensibles à l'effet des extraits naturels. Les punaises soumises à l'action des extraits semblent très affectées par les concentrations ingérées où les taux de mortalité enregistrés ont dépassé les 90% après peu de temps, juste après les 24h de contact. Cette toxicité aiguë provoquée par l'extrait de la plante confirme la sensibilité de ces petits insectes à tous les composés aussi bien les substances chimiques de synthèse (pesticides) ou naturelle (extraits) et qui sont habituellement utilisés uniquement dans la lutte biologique en l'absence de produit chimique - synthétique.

Les DI 50 et DL100 sont également faibles et varient respectivement entre 2,43mg/ml et 11,44mg/ml. En revanche l'Hymexazole s'est montré plus toxique où il a induit un effet léthal sur *Apis mellifera intermissa* et *Nesidiocoris tenuis* au bout de 24h.

***CONCLUSION GENERALE ET
PERSPECTIVES***

Conclusion générale et perspectives

Le pouvoir biopesticide de l'espèce végétale *Rosmarinus eriocalyx* qui est jusqu'à présent peu connu, a été évalué au travers de ses extraits bruts foliaires alcooliques et aqueux ainsi que de ses fractions SPE. Le travail dans son ensemble visait à estimer les potentialités de ces extraits contre les ravageurs nuisibles (bactéries, champignons, mauvaises herbes) des cultures agricoles. Les différentes expérimentations entreprises dans le but déterminer le pouvoir antimicrobien et herbicide des extraits ont été menées *in vitro* et *in vivo-ex situ*.

La première partie de notre travail a consisté en la mise en évidence des grands groupes de métabolites secondaires par le biais d'un criblage phytochimique de la plante qui a révélé la présence des polyphénols, les flavonoïdes, les tanins, les terpènes, les coumarines et les saponosides avec une absence des alcaloïdes, anthocyanes et leuco-anthocyanes. Ces résultats ont été confirmés par une CCM utilisant plusieurs systèmes d'élutions à polarité croissante qui a permis de détecter une abondance des flavonoïdes et des terpènes. Nous notons ici que nous n'avons pas pu les observer dans le cas de l'extrait aqueux par aucun système utilisé. Suite à cette prédominance des flavonoïdes qui bien évidemment font partie des polyphénols, nous avons réalisé un dosage quantitatif des polyphénols totaux, des flavonoïdes totaux et des tanins totaux par une série de réactions colorimétriques. En effet, les teneurs en polyphénols et flavonoïdes ont été décelés en abondance dans l'extrait méthanolique ce qui montre la richesse de cette plante en polyphénols totaux et flavonoïdes. Toutefois, ces métabolites ont été rencontrés à des teneurs moindres dans l'extrait aqueux ; ceci est probablement lié à la polarité du produit de solubilisation ou d'extraction utilisé.

Les analyses de criblage et de séparation ont été complétées par une technique d'identification utilisant des équipements de grande qualité tels que la chromatographie liquide à haute performance couplée à la spectrophotométrie de masse ou HPLC-DAD- ESI / MS. Cette technique combine le pouvoir séparateur de la HPLC sur les matériaux de masse moléculaire élevée aux capacités du MS à détecter et à confirmer de façon sélective l'identité des molécules. L'UHPLC-DAD- ESI / MS a permis d'identifier trente molécules différentes dont quatorze sont des dérivés d'acides phénoliques et douze sont des flavonoïdes dans l'extrait méthanolique et uniquement dix-huit composés ont été séparés au niveau de l'extrait aqueux. La liste de l'extrait aqueux diffère cependant légèrement de celle de la liste de l'extrait aqueux. En outre, l'extrait méthanolique semble posséder un chemotype représenté par l'acide phénolique simple qui est l'acide rosmarinique qui constitue le composant majoritaire avec ([M-H] - à m / z 359). Tandis

Conclusion générale et perspectives

qu'il a été détecté en quantité mineure dans l'extrait aqueux. Le composé majoritaire déterminé dans l'extrait aqueux est représenté par un flavonoïde luteolin-3-O-glucuronide ($[(M-H)^-]$ à m/z 461). Cette analyse montre une variabilité qualitative et quantitative au niveau des extraits qui est dû essentiellement au solvant utilisé.

Les activités biologiques ont été par la suite notre point d'intérêt ; différentes approches méthodologiques ont été effectuées afin de mieux explorer la capacité biopesticide des extraits de la plante. Nous avons focalisé nos recherches sur les activités antifongique, antibactérienne et herbicide de la plante et de ses extraits vis-à-vis d'une gamme d'agent pathogènes des sols agricoles et de plantes infectées. Avant d'entamer cette grande partie de notre travail, nous avons jugé nécessaire de travailler sur des agents bactériens autochtones qui contaminent nos sols agricoles et nos plantes cultivées. Ainsi, nous avons procédé en premier lieu, à un isolement, purification et identification des espèces fongiques et bactériennes. Les agents phytopathogènes isolés et supposés être responsables des dégâts importants sur les cultures ont été sélectionnés et ont servi aux différents biotests *in vivo* ou *in vitro* de l'activité antifongique et antibactérienne.

De tous les résultats de l'activité antifongique, il ressort, que le *Rosmarinus eriocalys* possède un effet inhibiteur plus ou moins important qui varie en fonction de la nature de la souche et de la méthode d'obtention de l'extrait et de la concentration utilisée. L'extrait méthanolique semble le plus efficace vis-à-vis de la plupart des souches testées et en l'occurrence les souches phytopathogènes douées de virulence accentuée telles que les *Fusarium*, les *Alternaria*, les *Aspergillus*, les *colletotrichum*, et les *Helminthosporium*, *Penicillium*. Ce résultat pourrait être attribué à la présence d'un nombre élevée de composés phénoliques et de molécules flavonoidiques et tanniques identifiés par UHPLC-DAD-ESI / MS au niveau de l'extrait méthanolique foliaire. Par ailleurs l'extrait méthanolique soumis aux ultrasons s'est montré très actif vis-à-vis de certaines souches et en particulier *Fusarium verticilloides*. Il semble que ce pouvoir inhibiteur est à l'origine de la méthode de sonication de l'extrait qui lui confère une meilleure solubilisation.

L'activité antibactérienne semble également intéressante pour l'extrait méthanolique vis-à-vis de la plupart des souches testées avec une inhibition importante des souches appartenant au genre *Pseudomonas*. Aucune croissance des espèces : *Pseudomonas sp 2* et *Pseudomonas sp 5* en présence de l'extrait alcoolique. Nous pouvons attribuer d'ores et déjà ce pouvoir bactéricide sur les *Pseudomonas* à la présence du composé majoritaire, l'acide rosmarinique et à l'action synergique des autres molécules polyphénoliques.

Conclusion générale et perspectives

L'activité antimicrobienne (antifongique et antibactérienne) testée pour la première fois en mode batch, sur milieu discontinu non renouvelé, nous a permis de suivre la cinétique de trois paramètres permettant d'évaluer la croissance et le devenir de l'extrait dans le milieu de culture. Le développement et l'amélioration de cette nouvelle méthodologie en vue d'évaluer les activités antimicrobiennes des substances naturelles nous a permis de confirmer les résultats obtenus par les autres techniques de routine. Nous tenons à signaler dans ce contexte que cette technique a donné des résultats assez satisfaisants, et a permis d'évaluer la sensibilité des souches lorsqu'elles sont soumises à l'action de ces biopesticides naturels. Nous pensons également que cette nouvelle méthodologie appliquée dans ce domaine est d'autant plus intéressante puisqu'elle permet de comprendre le mode d'action des composés testés sur les souches microbiennes d'une part, puis d'apprécier la viabilité ou la lyse des cellules bactériennes ou fongiques en arrêt de croissance, d'autre part. L'efficacité des extraits sur les souches microbiennes responsables des dégâts au niveau des cultures agricoles a été également démontrée *in vivo* sur des fruits de *Citrus sinensis* infectées. Les extraits ont arrêté rapidement la prolifération de l'inoculum bactérien et fongique au niveau des tissus ; de faibles nécroses sur une surface limitée de l'épiderme ont été enregistrées par comparaison aux plages importantes nécrosées formées au niveau de l'épiderme et le mésocarpe après traitement par le pesticide de synthèse Hyméxazole. Ce fort pouvoir antimicrobien des extraits naturels de *Rosmarinus eriocalyx* est confirmé par des CMI, CMB et CMF assez faibles.

En dépit de tous ces résultats encourageants, l'action des extraits méthanoliques soumis à ultrasons ou extrait aqueux n'est que fongistatique et bactériostatique. Cet effet fongistatique/bactériostatique pourrait être amélioré « un effet fongicide/bactéricide » en modifiant les méthodes de travail et facteurs d'expérimentation tels que, le milieu de culture, le pH, le temps d'incubation, la méthode d'extraction et la dose testée.

Nous avons également abordé dans ce travail une étude sur les propriétés herbicide de la plante par l'intermédiaire de son extrait brut méthanolique et les fractions séparées à partir de cet extrait. L'extrait méthanolique et ses fractions n'ont pas inhibé la faculté germinative de *Lepidium sativum* L.(cresson) en contrepartie une toxicité intense s'est manifestée en présence de la fraction SPE5 sur la longueur des plantules et celle des racines.

Conclusion générale et perspectives

Afin de faire le tour de la question, il était donc nécessaire de tester ces extraits naturels sur les organismes animaux utiles non ciblés qui sont souvent exposés aux effets des traitements des sols et des cultures agricoles (abeilles, vers de terre et punaises). Les traitements que nous avons préconisés dans cette expérimentation ont engendré une toxicité élevée uniquement à forte doses sur les abeilles, les vers de terre, et les punaises ; les taux de mortalité des vers de terre ont été relativement les moins élevés. Nous pouvons avancer à posteriori que l'extrait méthanolique ingéré par les insectes est comme tout autre produit chimique de traitement bien toléré, inoffensif et non redoutable tant qu'il est employé avec discernement et à des doses prescrites. Par conséquent, son utilisation en tant que biopesticide pourrait être envisagée. Cependant, ces résultats préliminaires méritent d'être confirmés ou infirmés sur terrain et dans les conditions naturelles.

Ils semblent à posteriori que les extraits de *Rosmarinus eriocalyx* sont prometteurs quant à leur pouvoir antifongique, antibactérien et herbicide. Néanmoins avant d'envisager de les employer comme alternatifs aux pesticides conventionnels, il serait judicieux de :

- continuer les investigations sur l'étude phytochimique en essayant de performer les extraits en utilisant plusieurs solvants ayant des polarités croissantes.
- réaliser une identification complète de toutes les molécules existantes. Séparer, purifier et isoler les composés individuellement et tester leurs activités biologiques séparément.
- développer de nouvelles méthodes d'isolement et d'identification
- développer et performer la nouvelle approche méthodologique de la culture en batch
- élargir les tests *in vivo* in situ et ex situ à grande échelle afin de confirmer la capacité biopesticide de notre plante.

Enfin, il serait également souhaitable de mener une étude sur le mécanisme d'action des extraits de *Rosmarinus eriocalyx* sur les souches fongiques ou bactériennes pour une meilleure compréhension et de précision de son effet sur des fonctions ou structures cellulaires, sur l'activité enzymatique, l'activité respiratoire et les changements ultra-structuraux tels que la perméabilité membranaire.

REFERENCES
BIBLIOGRAPHIQUES

Références bibliographiques

- Abutbul, S., Golan-Goldhirsh, A., Barazani, O., & Zilberg, D. (2004).** Use of *Rosmarinus officinalis* as a treatment against *Streptococcus iniae* in tilapia (*Oreochromis sp.*). *Aquaculture*, 238(1-4), 97-105.
- Adam, A. (2008).** Elicitation de la résistance systémique induite chez la tomate et le concombre et activation de la voie de la lipoxygénase par des rhizobactéries non-pathogènes. Thèse doctorat. Université de Liège.
- Adjlane, N., Doumandji, S. E., & Haddad, N. (2012).** Situation de l'apiculture en Algérie : facteurs menaçant la survie des colonies d'abeilles locales *Apis mellifera intermissa*. *Cahiers Agricultures*, 21(4), 235-241.
- AFSSA (Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments). (2008).** Mortalités, effondrements et affaiblissement des colonies d'abeilles. 222p.
- Akhtar, M. A., Rahber-Bhatti, M. H., & Aslam, M. (1997).** Antibacterial activity of plant diffusate against *Xanthomonas campestris* pv. *citri*. *International Journal of Pest Management*, 43(2), 149-153.
- Akila, R., Rajendran, L., Harish, S., Saveetha, K., Raguchander, T. and Samiyappan, R. (2011)** Combined application of botanical formulations and biocontrol agents for the management of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (Foc) causing *Fusarium* wilt in banana. *Biological Control* 57, 175–183.
- Al-Fatimi, M., Wurster, M., Schröder, G., & Lindequist, U. (2007).** Antioxidant, antimicrobial and cytotoxic activities of selected medicinal plants from Yemen. *Journal of ethnopharmacology*, 111(3), 657-666.
- Ali, T. E. S., Nasir, M. A., & Shakir, A. S. (1992).** In vitro evaluation of certain neem products as mould inhibitors against post-harvest fruit rotting fungi of tomato. *Pakistan Journal of Phytopathology*, 4(1-2), 58-61.
- Andersson, P. F. (2012).** Secondary metabolites associated with plant disease, *plant defense and biocontrol* (Vol. 2012, No. 52).
- Antunes, M. D. C., & Cavaco, A. M. (2010).** The use of essential oils for postharvest decay control. A review. *Flavour and fragrance journal*, 25(5), 351-366.
- Arici, S. E., Bozat, G., & Akbulut, I. (2013).** Investigation of potential biological control of *Fusarium oxysporum* f. sp. *Radici lycopersici* and *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* by essential oils, plant extract and chemical elicitors in vitro. *Pak. J. Bot.*, 45(6), 2119-2124.
- Arminante, F., De Falco, E., De Feo, V., De Martino, L., Mancini, E., & Quaranta, E. (2006).** Allelopathic activity of essential oils from Mediterranean Labiatae. In *I International Symposium on the Labiatae: Advances in Production, Biotechnology and Utilisation* 723. 347-356.
- Arnold, N., Valentini, G., Bellomaria, B., & Hocine, L. (1997).** Comparative study of the essential oils from *Rosmarinus eriocalyx* Jordan & Fourr. from Algeria and *Rosmarinus officinalis* L. from other countries. *Journal of essential oil Research*, 9(2), 167-175.
- Azmir, J., Zaidul, I. S. M., Rahman, M. M., Sharif, K. M., Mohamed, A., Sahena, F., Omar, A. K. M. (2013).** Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: a review. *Journal of Food Engineering*, 117(4), 426-436
- Batish, D. R., Lavanya, K., Singh, H. P., & Kohli, R. K. (2007).** Phenolic allelochemicals released by *Chenopodium murale* affect the growth, nodulation and macromolecule content in chickpea and pea. *Plant Growth Regulation*, 51(2), 119-128.
- Ben Farhat, M., Jordán, M. J., Chaouech-Hamada, R., Landoulsi, A., & Sotomayor, J. A. (2009).** Variations in essential oil, phenolic compounds, and antioxidant activity of tunisian cultivated *Salvia officinalis* L. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(21), 10349-10356.

Références bibliographiques

- Benbelaïd, F., Khadir, A., Bendahou, M., Zenati, F., Bellahsene, C., Muselli, A., & Costa, J. (2016).** Antimicrobial activity of *Rosmarinus eriocalyx* essential oil and polyphenols: an endemic medicinal plant from Algeria. *Journal of Coastal Life Medicine*, 4(1), 39-44.
- Beneddouch, M. S., Benhassaini, H., Hazem, Z., & Romane, A. (2011).** Essential oil analysis and antibacterial activity of *Rosmarinus tournefortii* from Algeria. *Natural product communications*, 6(10), 1934578X1100601026.
- Bendif, H. (2017).** Caractérisation phytochimique et détermination des activités biologiques *in vitro* des extraits actifs de quelques *Lamiaceae*: *Ajugaiva* (L.) Schreb., *Teucrium polium* L., *Thymus munbyanus* sub sp. *coloratus*(Boiss. & Reut.) Greuter & Burdetet *Rosmarinus eriocalyx* Jord & Fourr. These Doctorat ENS de Kouba, Alger
- Bendif, H., Boudjeniba, M., Miara, M. D., Biqiku, L., Bramucci, M., Caprioli, G., ... & Vittori, S. (2017).** *Rosmarinus eriocalyx*: An alternative to *Rosmarinus officinalis* as a source of antioxidant compounds. *Food chemistry*, 218, 78-88.
- Bettaieb, A., Moujahed, N., Ksouri, R. (2012).** Secondary compounds characterization in some autochthonous species from a North-Eastern region of Tunisia. In : Acar Z. (ed.), López-Francos A. (ed.), Porqueddu C. (ed.). New approaches for grassland research in a context of climate and socio-economic changes. Zaragoza : CIHEAM, 371-374. (*Options Méditerranéennes : Série A. Séminaires Méditerranéens* ; n. 102).
- Bhowmik, P. C., & Doll, J. D. (1984).** Allelopathic Effects of Annual Weed Residues on Growth and Nutrient Uptake of Corn and Soybeans 1. *Agronomy journal*, 76(3), 383-388.
- Bluma, R. V., & Etcheverry, M. G. (2008).** Application of essential oils in maize grain : Impact on *Aspergillus section Flavi* growth parameters and aflatoxin accumulation. *Food Microbiology*, 25(2), 324-334.
- Bodde, T. (1982).** Entomologists probe chemical defenses and natural enemies [USA]. *BioScience American Institute of Biological Sciences*, 32, 308-311
- Bolou, G. E. K., Bagré, I., Ouattara, K., & Djaman, A. J. (2011).** Evaluation of the antibacterial activity of 14 medicinal plants in Côte d'Ivoire. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 10(3).
- Bordjiba, O. (2003).** Effets des pesticides sur la microflore fongique du sol : biodégradation des herbicides par les souches isolées. Thèse d'Université : Méthode de recherche sur l'environnement et la santé : Grenoble1. 84.
- Bordjiba-Haddad, O. (1988).** Etude de la phase épiphyllé de trois *Pseudomonas* associés au dépérissement de l'abricotier (*Prunus armeniaca*) et rôle du froid dans l'apparition des symptômes (Doctoral dissertation, Aix-Marseille 2).
- Botton, B., Breton, A., Fevre, M., Gauthier, S., Gury P Larpent, P., Reymondj, P., Sanglier, J. J., Vayssier, Y et Veau, P. (1990).** Moisissures utiles et nuisible importance industrielle. Ed. MASSON 2 ème édition, Paris.
- Boullard, B. (2001).** Dictionnaire des plantes médicinales du monde. Edition ESTEM Paris, 10 :29.
- Boulogne, I. (2011).** Evaluation du potentiel insecticide et antifongique sur *Acromyrmex octospinosus* (Reich) d'une sélection de plantes à usages ethnopharmacologiques TRAMIL. Université des Antilles et de la Guyane.
- Bourgaud, F., Gravot, A., Milesi, S., & Gontier, E. (2001).** Production of plant secondary metabolites: a historical perspective. *Plant science*, 161(5), 839-851.

Références bibliographiques

- Bouzid, W. (2009).** Etude de l'Activité Biologique des Extrait du Fruit de *Crataegus monogyna* Jacq. These magister. Université Batna.
- Brain, K.R., Turner, T.D., Wright. (1975).** Scientifica. 1st Ed. Bristol: Practical evaluation of phytopharmaceuticals; p. 144
- Buchanan, R. L., & Ayres, J. C. (1975).** Effect of initial pH on aflatoxin production. *Appl. Environ. Microbiol.*, 30(6), 1050-1051.
- Burt, S. (2004).** Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. *International journal of food microbiology*, 94(3), 223-253.
- Butt, V. S., Lamb, C. J. (1981).** Oxygenase and the metabolism of plant products. Stumpf PK, Conn EE, The Biochemistry of plants, Vol 7. Secondary Plant products. (eds) Academic Press, New York, pp, 627-665.
- Buttel-Reepen, H, V. (1906).** Apistica Beitragezur Systematik, Biologie, sowie zurgeschichtlichenund geographischen Verbreitung der Honigbiene(*Apis mellifera* L.), ihrer Varietaten und der ilbrigen *Apis*-Arten. *MitteilWigen aus dem Zoologischen Museum im Berlin*, 3, 121-196.
- Cairns, V., & Magan, N. (2002).** Impact of essential oils on growth and ochratoxin A production by *Penicillium verrucosum* and *Aspergillus ochraceus* on a wheat-based substrate. *Advances in Stored Product Protection*, 479-485.
- Calvet, C., Pinochet, J., Camprubí, A., Estaún, V., & Rodríguez-Kábana, R. (2001).** Evaluation of natural chemical compounds against root-lesion and root-knot nematodes and side-effects on the infectivity of arbuscular mycorrhizal fungi. *European Journal of Plant Pathology*, 107(6), 601-605.
- Canillac, N., & Mourey, A. (2001).** Antibacterial activity of the essential oil of *Picea excelsa* on *Listeria*, *Staphylococcus aureus* and coliform bacteria. *Food Microbiology*, 18(3), 261-268.
- Carson, C. F., Mee, B. J., & Riley, T. V. (2002).** Mechanism of action of Melaleuca alternifolia (tea tree) oil on *Staphylococcus aureus* determined by time-kill, lysis, leakage, and salt tolerance assays and electron microscopy. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 46(6), 1914-1920.
- Castro-Vázquez, L., Díaz-Maroto, M. C., González-Viñas, M. A., & Pérez-Coello, M. S. (2009).** Differentiation of monofloral citrus, rosemary, eucalyptus, lavender, thyme and heather honeys based on volatile composition and sensory descriptive analysis. *Food Chemistry*, 112(4), 1022-1030.
- Celiktas, O. Y., Kocabas, E. H., Bedir, E., Sukan, F. V., Ozek, T., & Baser, K. H. C. (2007).** Antimicrobial activities of methanol extracts and essential oils of *Rosmarinus officinalis*, depending on location and seasonal variations. *Food Chemistry*, 100(2), 553-559.
- Chang, K. S., & Ahn, Y. J. (2002).** Fumigant activity of (E)- anethole identified in *Illicium verum* fruit against *Blattella germanica*. *Pest Management Science : formerly Pesticide Science*, 58(2), 161-166.
- Charpentier, G., (2013).** Étude des effets létaux et sublétaux d'une intoxication au thymol sur le développement et l'immunité des larves d'*Apis mellifera* élevées *in vitro*. Thèse doctorat. Université Toulouse III Paul Sabatier (UT3 Paul Sabatier).
- Chattopadhyay, D., Sinha, B. K., & Vaid, L. K. (1998).** Antibacterial activity of *Syzygium species*. *Fitoterapia*, 69(4), 365-367.
- Chemat, F., & Khan, M. K. (2011).** Applications of ultrasound in food technology: processing, preservation and extraction. *Ultrasonics sonochemistry*, 18(4), 813-835.

Références bibliographiques

- Chen, F., Sun, Y., Zhao, G., Liao, X., Hu, X., Wu, J., & Wang, Z. (2007).** Optimization of ultrasound-assisted extraction of anthocyanins in red raspberries and identification of anthocyanins in extract using high-performance liquid chromatography–mass spectrometry. *Ultrasonics Sonochemistry*, 14(6), 767-778.
- Chen, X., Wang, W., Li, S., Xue, J., Fan, L., Sheng, Z., & Chen, Y. (2010).** Optimization of ultrasound-assisted extraction of Lingzhi polysaccharides using response surface methodology and its inhibitory effect on cervical cancer cells. *Carbohydrate Polymers*, 80(3), 944-948.
- Chomienne, J.-P., Dutartre, S., Larguier, M., Pinçonnet, D. and Tessier, R.. (2017).** *Les produits de biocontrôle pour la protection des cultures* 1–87.
- Combrinck, S., Regnier, T., & Kamatou, G. P. P. (2011).** In vitro activity of eighteen essential oils and some major components against common postharvest fungal pathogens of fruit. *Industrial Crops and Products*, 33(2), 344-349.
- Cotoras, M., Logos, C., Garcia, C., Folch, C. and Mendoza, L. (2001)** Antifungal activity on *Botrytis cinerea* of flavonoids and diterpenoids isolated from the surface of *Pseudognaphalium* spp. *Boletín de la Sociedad Chilena de Química* 46, 433–440.
- Cotty, P. J. (1988).** Aflatoxin and sclerotial production by *Aspergillus flavus*: influence of pH. *growth*, 4, 11.
- Cowan, M. M. (1999).** Plant products as antimicrobial agents. *Clinical microbiology reviews*, 12(4), 564-582.
- Cristani, M., D'Arrigo, M., Mandalari, G., Castelli, F., Sarpietro, M. G., Micieli, D., ... & Trombetta, D. (2007).** Interaction of four monoterpenes contained in essential oils with model membranes : implications for their antibacterial activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(15), 6300-6308.
- Da Porto, C., Decorti, D., & Kikic, I. (2009).** Flavour compounds of *Lavandula angustifolia* L. to use in food manufacturing: Comparison of three different extraction methods. *Food Chemistry*, 112(4), 1072-1078.
- Daferera, D. J., Ziogas, B. N., & Polissiou, M. G. (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.
- Dahmane, E. M., Eddarir, S., Aubert, G., Bouamama, H., & Taourirte, M. (2010).** Essential Oil Composition and Antimicrobial Activity of *Rosmarinus tournefortii* De Noe., an Endemic Species in Morocco. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, 13(3), 336-339.
- Dalgaard, T., Hutchings, N.J., Porter, J.R. (2003).** Agroecology, scaling and interdisciplinarity, *Agr. Ecosyst. Environ.*, 100 : 39–51.
- De Sousa, L. L., de Andrade, S. C. A., Athayde, A. J. A. A., de Oliveira, C. E. V., de Sales, C. V., Madruga, M. S., & de Souza, E. L. (2013).** Efficacy of *Origanum vulgare* L. and *Rosmarinus officinalis* L. essential oils in combination to control postharvest pathogenic *Aspergilli* and autochthonous mycoflora in *Vitis labrusca* L. (table grapes). *International journal of food microbiology*, 165(3), 312-318.
- Dehimat, A. (2014).** Activité antimicrobienne des huiles essentielles de *Matricaria pubescens*. These. Université de Biskra.
- Del Campo, J., Amiot, M.J., Nguyen-The, C. (2000).** Antimicrobial effect of rosemary extracts. *Journal of Food Production* 63, 1359– 1368.

Références bibliographiques

- Dixon, R. A. (2001).** Natural products and plant disease resistance. *Nature*, 411(6839), 843.
- Djeridane A., Yousfi M., Najemi B., Vidal N., Lestards JF., and Stocker P. (2007).** Screening of some Algerian medicinal plants for the phenolic Compounds and their antioxidant activity. *Eur. Food Res. Technol.* 224, 801-809.
- Do, Q. D., Angkawijaya, A. E., Tran-Nguyen, P. L., Huynh, L. H., Soetaredjo, F. E., Ismadji, S., & Ju, Y. H. (2014).** Effect of extraction solvent on total phenol content, total flavonoid content, and antioxidant activity of *Limnophila aromatica*. *Journal of food and drug analysis*, 22(3), 296-302.
- Domsch, K.H., Gams, W. et Traute-Heidi, A. (1980).** Compendium of soil fungi. Academic Press, London. vol 1 et 2.
- Dutruc-Rosset, G. 2003.** Techniques analytiques et de contrôle (Codex œnologique). Partie microbiologique. Office International de la Vigne et du Vin. 23 pp.
- Ebert, T. A., Kevan, P. G., Bishop, B. L., Kevan, S. D., & Downer, R. A. (2007).** Oral toxicity of essential oils and organic acids fed to honey bees (*Apis mellifera*). *Journal of apicultural research*, 46(4), 220-224.
- Edwards, C.A., Bohlen, P.J. (1992).** The effects of toxic chemicals on earthworms. *Rev. Environ. Contam. Toxicol.* 125, 23–99.
- Edwards, C.A., Bohlen, P.J. (1996).** Biology and Ecology of Earthworms, 3rd ed. Chapman and Hall, London.
- El-Kenany, E. T., & Fakhry, A. M. (2016).** Phytotoxicity of *Rosmarinus officinalis* L. and *Salvia officinalis* L. to Control the Noxious Weed, *Panicum turgidum* Forssk. *Egyptian Journal Of Botany*, 56(2), 381-393.
- Ellis, M. D., & Baxendale, F. P. (1997).** Toxicity of seven monoterpenoids to tracheal mites (Acari: Tarsonemidae) and their honey bee (Hymenoptera: Apidae) hosts when applied as fumigants. *Journal of economic entomology*, 90(5), 1087-1091.
- Elumalai, L. K., & Rengasamy, R. (2012).** Synergistic Effect of Seaweed Manure and *Bacillus* sp. on Growth and Biochemical Constituents of *Vigna radiata* L. *Journal of Biofertilizers & Biopesticides*, 3(3), 121-128.
- EUCAST (European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing) of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ESCMID). (2003).** Determination of minimum inhibitory concentrations (MICs) of antibacterial agents by broth dilution. *Clinical Microbiology and Infection*, 9(8), 1-7.
- Fadel, O., Ghazi, Z., Mouni, L., Benchat, N., Ramdani, M., Amhamdi, H., Wathelet, J. P., et al. (2011).** Comparison of microwave-assisted hydrodistillation and traditional hydrodistillation methods for the *Rosmarinus eriocalyx* essential oils from Eastern Morocco. *Journal of Materials and Environmental Science*, 2, 112–117.
- Fadel, O., Ghazi, Z., Mouni, L., Benchat, N., Ramdani, M., Amhamdi, H., Wathelet, J. P., et al. (2011).** Comparison of microwave-assisted hydrodistillation and traditional hydrodistillation methods for the *Rosmarinus eriocalyx* essential oils from Eastern Morocco. *Journal of Materials and Environmental Science*, 2, 112–117.
- Falleh, H., Ksouri, R., Chaieb, K., Karray-Bouraoui, N., Trabelsi, N., Boulaaba, M., & Abdely, C. (2008).** Phenolic composition of *Cynara cardunculus* L. organs, and their biological activities. *Comptes Rendus Biologies*, 331(5), 372-379.

Références bibliographiques

- Fernández-Cruz, M. L., Mansilla, M. L., & Tadeo, J. L. (2010).** Mycotoxins in fruits and their processed products: Analysis, occurrence and health implications. *Journal of Advanced Research*, 1(2), 113-122.
- Flesar, J., Havlik, J., Kloucek, P., Rada, V., Titera, D., Bednar, M., & Kokoska, L. (2010).** In vitro growth-inhibitory effect of plant-derived extracts and compounds against *Paenibacillus* larvae and their acute oral toxicity to adult honey bees. *Veterinary microbiology*, 145(1-2), 129-133.
- Gaamoune, S., Nouioua, W. (2018).** In Vitro Antioxidant and Anti-Inflammatory Activities Valorisation of Methanol Extract of *Rosmarinus eriocalyx* Jord. & Fourr. *International Research Journal of Pharmacy and Medical Sciences. (IRJPMS)*, 1(4), 34-36.
- Gachango, E., Kirk, W., Schafer, R., & Wharton, P. (2012).** Evaluation and comparison of biocontrol and conventional fungicides for control of postharvest potato tuber diseases. *Biological control*, 63(2), 115-120.
- Gatto, M. A., Ippolito, A., Linsalata, V., Cascarano, N. A., Nigro, F., Vanadia, S., & Di Venere, D. (2011).** Activity of extracts from wild edible herbs against postharvest fungal diseases of fruit and vegetables. *Postharvest Biology and Technology*, 61(1), 72-82.
- Georgé, S., Brat, P., Alter, P., Amiot, J.M. (2005).** Rapid determination of polyphénols and vitamin C in plant-derived products. *J. Agric. and Food Chemist.*53, 1370-1373.
- Gibbons, S. (2008).** Phytochemicals for bacterial resistance-strengths, weaknesses and opportunities. *Planta medica*, 74(06), 594-602.
- Girijashankar, V. Et Thayumanavan, B. (2005).** Evaluation of lawsonia inermis leaf extracts for their in vitro fungitoxicity against certain soilborne pathogens. *Indian Journal of Plant Protection*, vol. 33, no 1, p. 111.
- Gómez-Caravaca, A. M., Gómez-Romero, M., Arráez-Román, D., Segura-Carretero, A., & Fernández-Gutiérrez, A. (2006).** Advances in the analysis of phenolic compounds in products derived from bees. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 41(4), 1220-1234.
- Gottlieb, O. R., de MB Borin, M. R., & de Brito, N. R. S. (2002).** Integration of ethnobotany and phytochemistry: dream or reality?. *Phytochemistry*, 60(2), 145-152.
- Guinoiseau, E. (2010).** Molécules antibactériennes issues d'huiles essentielles : séparation, identification et mode d'action. Thèse (Doctoral dissertation, Université de Corse).
- Gustafson, J. E., Liew, Y. C., Chew, S., Markham, J., Bell, H. C., Wyllie, S. G., & Warmington, J. R. (1998).** Effects of tea tree oil on *Escherichia coli*. *Letters in applied microbiology*, 26(3), 194-198.
- Hadacek, F., & Greger, H. (2000).** Testing of antifungal natural products: methodologies, comparability of results and assay choice. *Phytochemical analysis*, 11(3), 137-147.
- Hagerman, A. E., Muller-Harvey, I., & Makkar, H. P. S. (2000).** Quantification of tanins in tree foliage. *Viena: FAO/IAEA Working Document*.
- Halama, P., & Van Haluwin, C. (2004).** Antifungal activity of lichen extracts and lichenic acids. *BioControl*, 49(1), 95-107.
- Harborne, J.B. (1973)** *Phytochemical Methods*. Chapman and Hall Ltd, London, pp. 49–188.
- Harrar, A. N. (2012).** Activités antioxydante et antimicrobienne d'extraits de *Rhamnus alaternus* L. Magister. Université de Sétif.

Références bibliographiques

- Hasanvand, H., Moshtaghi, H., Heshmati, A., Boniadian, M., & Abbasvali, M. (2016).** Inhibitory effect of *echinophora platyloba* essential oil on *Aspergillus flavus* in culture media and cheese. *Journal of food quality and hazards control*, 3(4), 122-127.
- Hayouni, E., Abedrabba, M., Bouix, M. and Hamdi, M. (2007).** The Effect of Solvents and Extraction Method on the Phenolic Compounds Contents and Biological Activities in Vitro of Tunisian *Quercus coccifera* L. and *Juniperus phoenicea* L. Fruit Extract. *Journal of Food Chemistry*, 105, 1126-1134.
- Hedge, R. S., & Miller, D. A. (1990).** Allelopathy and autotoxicity in alfalfa: characterization and effects of preceding crops and residue incorporation. *Crop science*, 30(6), 1255-1259.
- Hershman D.E., Vincelli P. et Kaiser C.A. (2011).** Foliar Fungicide Use in Corn and Soybeans. Plant Pathology Fact Sheet, University of Kentucky, Plant Pathology.
- Hitokoto, H., Morozumi, S., Wauke, T., Sakai, S., & Kurata, H. (1980).** Inhibitory effects of spices on growth and toxin production of toxigenic fungi. *Appl. Environ. Microbiol.*, 39(4), 818-822.
- Holley, R. A., & Patel, D. (2005).** Improvement in shelf-life and safety of perishable foods by plant essential oils and smoke antimicrobials. *Food Microbiology*, 22, 273–292.
- Hope, R., Jestoi, M., & Magan, N. (2003).** Multitarget environmental approach for control of growth and toxin production by *Fusarium culmorum* using essential oils and antioxidants. *Advances in Stored Products Protection*, 486-492.
- Hussain, A., Khan, M. F., Faheem, M., & Rana, H. (2017).** Toxicity of nitenpyram and neem leaf extract against earthworm. *Int J Biol Biotechnol*, 13(4), 581-585.
- Hyun, J. E., Bae, Y. M., Song, H., Yoon, J. H., & Lee, S. Y. (2014).** Antibacterial effect of various essential oils against pathogens and spoilage microorganisms in fresh produce. *Journal of Food Safety*, 35(2), 206-219.
- Iida, Y., Tuziuti, T., Yasui, K., Towata, A., & Kozuka, T. (2008).** Control of viscosity in starch and polysaccharide solutions with ultrasound after gelatinization. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 9(2), 140-146.
- Imdorf, A., Kilchenmann, V., Bogdanov, S., Bachofen, B., & Beretta, C. (1995).** Toxizität von thymol, campher, menthol und eucalyptol auf *Varroa jacobsoni* oud und *Apis mellifera* L im labortest. *Apidologie*, 26(1), 27-31.
- Issa, N. N. (1996).** Allelopathic Effect of Some Vegetable Crops on Certain Weed Species in Jordan. M.Sc. Thesis. Amman, Jordan : University of Jordan.
- Janisiewicz, W. J., & Korsten, L. (2002).** Biological control of postharvest diseases of fruits. *Annual review of phytopathology*, 40(1), 411-441.
- Jansirani D, Nivethitha S, Singh MVP. (2012).** Production and utilization of vermic ast using organic wastes and its impact on *Trigonella foenum* and *Phaseolus aureus*. *Int J Res Biol*.
- Javaid, A., & Samad, S. (2012).** Screening of allelopathic trees for their antifungal potential against *Alternaria alternata* strains isolated from dying-back *Eucalyptus* spp. *Natural product research*, 26(18), 1697-1702.
- Jégou, D., Brunotte, J., Rogasik, H., Capowicz, Y., Diestel, H., Schrader, S. et Cluzeau, D. (2002).** Impact of soil compaction on earthworm burrow systems using X-ray computed tomography: preliminary study. *Eur. J. Soil Biol.* 38, 329-336.

Références bibliographiques

- Jeschke, P., & Nauen, R. (2008).** Neonicotinoids—from zero to hero in insecticide chemistry. *Pest Management Science: formerly Pesticide Science*, 64(11), 1084-1098.
- Johansen, C. A. (1977).** Pesticides and pollinators. *Annual review of entomology*, 22(1), 177-192.
- Jones, J. D., & Dangl, J. L. (2006).** The plant immune system. *Nature*, 444(7117), 323.
- Jordán, M. J., Lax, V., Rota, M. C., Lorán, S., & Sotomayor, J. A. (2013).** Effect of the phenological stage on the chemical composition, and antimicrobial and antioxidant properties of *Rosmarinus officinalis* L essential oil and its polyphenolic extract. *Industrial crops and products*, 48, 144-152.
- Karapinar, M. (1985).** The effects of citrus oils and some spices on growth and aflatoxin production by *Aspergillus parasiticus* NRRL 2999. *International Journal of Food Microbiology*, 2(4), 239-245.
- Kebe, I., Mpika, J., N'guessa, K. F., Hebbar, P. K., Samuels, G. S., & 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.
- Keeler, R. F. (1991).** *Handbook of natural toxins: Toxicology of plant and fungal compounds* (Vol. 6). CRC Press.
- Kennedy, D. O., & Wightman, E. L. (2011).** Herbal extracts and phytochemicals: plant secondary metabolites and the enhancement of human brain function. *Advances in Nutrition*, 2(1), 32-50.
- Khailov, K., M. (1974).** Biochemecal Trapho dynamics in Marine Coastal Ecosystems. Kiev, URSS: Naukova Dumka
- Khallil, A. R. M. (2001).** Phytofungitoxic properties in the aqueous extracts of some plants. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 4(4), 392-394.
- Kimbaris, A. C., Siatis, N. G., Daferera, D. J., Tarantilis, P. A., Pappas, C. S., & Polissiou, M. G. (2006).** Comparison of distillation and ultrasound-assisted extraction methods for the isolation of sensitive aroma compounds from garlic (*Allium sativum*). *Ultrasonics sonochemistry*, 13(1), 54-60.
- Kirk, P.M., Cannon, P.F., Minter, D.W. et Stalpers, J.A. (2008).** Dictionary of the Mycota. 10th Edition. Cromwell Press, Trowbridge.
- Knowles, L. M., Zigrossi, D. A., Tauber, R. A., Hightower, C., & Milner, J. A. (2000).** Flavonoids suppress androgen-independent human prostate tumor proliferation. *Nutrition and cancer*, 38(1), 116-122.
- Kouassi, M. D. (2001).** La lutte biologique : une alternative viable à l'utilisation des pesticides ? *Vertigo-la revue électronique en sciences de l'environnement*, 2(2).
- Kroymann, J. (2011).** Natural diversity and adaptation in plant secondary metabolism. *Current opinion in plant biology*, 14(3), 246-251.
- Kumar, A., & Tripathi, S. C. (1991).** Evaluation of the leaf juice of some higher plants for their toxicity against soil borne pathogens. *Plant and soil*, 132(2), 297-301.
- Kumar, G. S., Jayaveera, K. N., Kumar, C. K., Sanjay, U. P., Swamy, B. M., & Kumar, D. V. (2007).** Antimicrobial effects of Indian medicinal plants against acne-inducing bacteria. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 6(2), 717-723

Références bibliographiques

- Lambert, R. J. W., Skandamis, P. N., Coote, P. J., & Nychas, G. J. (2001).** A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. *Journal of applied microbiology*, 91(3), 453-462.
- Lavelle, P., 1997.** Faunal activities and soil processes: adaptive strategies that determine ecosystem function. *Adv. Ecol. Res.* 27, 93-132.
- Lee, B. H., Annis, P. C., & Choi, W. S. (2004).** Fumigant toxicity of essential oils from the Myrtaceae family and 1, 8-cineole against 3 major stored-grain insects. *Journal of Stored Products Research*, 40(5), 553-564.
- Lee, S., Tsao, R., Peterson, C., & Coats, J. R. (1997).** Insecticidal activity of monoterpenoids to western corn rootworm (Coleoptera: Chrysomelidae), twospotted spider mite (Acari: Tetranychidae), and house fly (Diptera: Muscidae). *Journal of Economic Entomology*, 90(4), 883-892.
- Lee, Y., Kim, H., Liu, C., & Lee, H. (2003).** A simple method for DNA extraction from marine bacteria that produce extracellular materials. *Journal of Microbiological Methods*, 52(2), 245–250.
- Leng P., Zhiming Z., Guangtang P. & Maojun Z., (2011).** Applications and development trends in biopesticides. *Afr. J. Biotechnol.*, 10(86), 19864-19873.
- Lewis, K., & Ausubel, F. M. (2006).** Prospects for plant-derived antibacterials. *Nature biotechnology*, 24(12), 1504.
- Lindberg, C. M., Melathopoulos, A. P., & Winston, M. L. (2000).** Laboratory evaluation of miticides to control *Varroa jacobsoni* (Acari: Varroidae), a honey bee (Hymenoptera: Apidae) parasite. *Journal of economic entomology*, 93(2), 189-198.
- Lorenzetti, E., Stangarlin, J. R., & Kuhn, O. J. (2018).** Antimicrobial activity against *Macrophomina phaseolina* and the control of charcoal rot in soybeans using the homoeopathic drugs *Sepia* and *Arsenicum album*. *Arquivos Do Instituto Biológico*, 84.
- Louat, F. (2013).** *Etude des effets liés à l'exposition aux insecticides chez un insecte modèle, Drosophila melanogaster* (Doctoral dissertation, Université d'Orléans).
- Ma, Y. Q., Ye, X. Q., Fang, Z. X., Chen, J. C., Xu, G. H., & Liu, D. H. (2008).** Phenolic compounds and antioxidant activity of extracts from ultrasonic treatment of Satsuma mandarin (*Citrus unshiu* Marc.) peels. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(14), 5682-5690.
- Mahmood, I., Imadi, S. R., Shazadi, K., Gul, A., & Hakeem, K. R. (2016).** Effects of pesticides on environment. In *Plant, Soil and Microbes* (pp. 253-269). Springer, Cham.
- Majewski, M.S., and P.D. Capel. (1995).** Pesticides in the atmosphere: Distribution, trends, and governing factors. *Ann Arbor Press, Chelsea, MI*.
- Majors, R. E. (1999).** An overview of sample preparation methods for solids. *LC GC*, 17(6), 8-13.
- Mangena, T., & Muyima, N. Y. O.** Comparative evaluation of the antimicrobial activities of essential oils of *Artemisia afra*, *Pteronia incana* and *Rosmarinus officinalis* on selected bacteria and yeast strains. *Letters in applied microbiology*, 28(4), 291-296.
- Marchal N. et Bourdon J. L. (1982).** Les milieux de cultures pour l'isolement et l'identification biochimique des bactéries. Ed. Doin, Paris.
- Marchenay, P., & Bérard, L. (2007).** L'homme, l'abeille et le miel (p. 224). Editions De Borée.
- Martínez-Romero, D., Serrano, M., Bailén, G., Guillén, F., Zapata, P. J., Valverde, J. M., Valero,**

Références bibliographiques

- D. (2008).** The use of a natural fungicide as an alternative to preharvest synthetic fungicide treatments to control lettuce deterioration during postharvest storage. *Postharvest Biology and Technology*, 47(1), 54-60.
- Masson, C., Phm-Delègue, M. H., Fonta, C., Gascuel, J., Arnild, G., Nicolas, G., Kerszberg, M. (1993).** Recent advances in the concept of adaptation to natural odor signals in the honeybee, *Apis mellifera* L. *Apidologie*, 24 : 169-194.
- Matthews, J. S. (1963).** Steroids. CCXXIII. Colorreagent for steroids in thin-layer chromatography. *Biochimica et biophysica acta*, 69, 163-165.
- Mayer, A. M. (1987).** Polyphenols oxidase in plants-recent progress. *Phytochemistry*, 26, 11-20.
- Mazid, M., Khan, T. A., & Mohammad, F. (2011).** Role of secondary metabolites in defense mechanisms of plants. *Biology and medicine*, 3(2), 232-249.
- Menaceur, F. (2011).** Composition chimique et activité biologique des huiles essentielles et extraits du romarin (*Rosmarinus eriocalyx*) et de la lavande (*Lavandula stoechas*). Mémoire de magister. Ecole Nationale Supérieure Agronomique Al-Harrache-Alger.
- Menaceur, F. (2014).** Comparative study of chemical composition and antioxidant activity of ethanolic extracts from Algerian *Lavandula stoechas* L. and *Rosmarinus tournefortii* de Noé. *International Journal of Agricultural Science and Research*, 4, 139-146
- Menaceur, F. (2014).** Comparative study of chemical composition and antioxidant activity of ethanolic extracts from Algerian *Lavandula stoechas* L. and *Rosmarinus tournefortii* de Noé. *International Journal of Agricultural Science and Research*, 4, 139-146.
- Meshra, M., & Tewari, S. N. (1990).** Ethanolic extract toxicity of three botanicals against five fungal pathogens of rice. *National Academy Science Letters*, 13(11), 409-412.
- Metherel, A. H., Taha, A. Y., Izadi, H., & Stark, K. D. (2009).** The application of ultrasound energy to increase lipid extraction throughput of solid matrix samples (flaxseed). *Prostaglandins, leukotrienes and essential fatty acids*, 81(5-6), 417-423.
- Mishra, J., Tewari, S., Singh, S., & Arora, N. K. (2015).** Biopesticides : where we stand ? In *Plant microbes symbiosis: applied facets* (pp. 37-75). Springer, New Delhi.
- Moreno, S., Scheyer, T., Catalina, S. Romano, & Adriañ A. Vojnov, (2005).** Antioxidant and antimicrobial activities of rosemary extracts linked to their polyphenol composition. *Free Radical Research, February*; 40(2): 223–231.
- Moreno, S., Scheyer, T., Romano, C. S., & Vojnov, A. A. (2006).** Antioxidant and antimicrobial activities of rosemary extracts linked to their polyphenol composition. *Free radical research*, 40(2), 223-231.
- Muchuweti, M., C. Mupure, A. Ndhlala, T. Murenje and M.A.N. Benhura , (2007).** Screening of antioxidant and radical scavenging activity of *Vigna unguiculata*, *Bidens pilosa* and *Cleome gynandra*. *American Journal of Food Technology*, 2, 161- 168.
- Mueller, G. M., & Schmit, J. P. (2007).** Fungal biodiversity: what do we know? What can we predict?. *Biodiversity and Conservation*, 16(1), 1-5.
- Munir, A. T., & Tawaha, A. R. M. (2002).** Inhibitory effects of aqueous extracts of black mustard on germination and growth of lentil. *Pakistan Journal of Agronomy*, 1(1), 28-30.

Références bibliographiques

- N'Guessan K., Kadja B., Zirihi G., Traore D., AkéassiL., (2009).** Screening phytochimique de quelques plantes médicinales ivoiriennes utilisées en pays Krobou (Agboville, Côte-d'Ivoire). *Sciences & Nature*, 6 (1), 1-15.
- Nanir, S. P., Kadu , B. B. (1987).** Effect of some medicinal plants extract on some fungi. *Acta Botanica India*, 15, 170-175.
- Narwal, S.S., 1994.** Allelopathy in crop production. *Scientific Publishers, Jodhpur*, p 288.
- Okwu, D. E. et Okwu, M. E. (2004).** Chemical composition of Spondias mombin Linn plant parts. *J Sustain Agric Environ*, vol. 6, no 2, p. 140-147.
- Omojate Godstime, C., Enwa Felix, O., Jewo Augustina, O., & Eze Christopher, O. (2014).** Mechanisms of antimicrobial actions of phytochemicals against enteric pathogens—a review. *J Pharm Chem Biol Sci*, 2(2), 77-85
- Paster, N., Juven, B. J., Shaaya, E., Menasherov, M., Nitzan, R., Weisslowicz, H., & Ravid, U. (1990).** Inhibitory effect of oregano and thyme essential oils on moulds and foodborne bacteria. *Letters in Applied Microbiology*, 11(1), 33-37.
- Pawar, V. C., & Thaker, V. S. (2007).** Evaluation of the anti-*Fusarium oxysporum* f. sp cicer and anti-*Alternaria porri* effects of some essential oils. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 23(8), 1099-1106.
- Pham-Delège, M. H., Etievant, P., Masson, C. (1992).** Allelochemicals mediating foraging behaviour: the bee-sunflower model. In : The behavior and Physiology of bees. Ed. L. J. Goodman & R.C. Fisher. Chap, 13 : 163-164.
- Pieman, A. K., Ranieri, R. L., Towers, G.H.N., Lam, J.: J. Chromatogr. (1980),189, 187-198**
- PNUE 2010.** UNEP Emerging Issues : Global Honey Bee Colony Disorder And Other Threats To Insect Pollinators. United Nations Environment Programmer.
- Popp, J., Petó, K., & Nagy, J. (2013).** Pesticide productivity and food security. A review. *Agronomy for sustainable development*, 33(1), 243-255.
- Putnam, A. R. (1988).** Allelochemicals from plants as herbicides. *Weed technology*, 2(4), 510-518
- Qasem, J. R. (2002).** Allelopathic effects of selected medicinal plants on *Amaranthus retroflexus* and *Chenopodium murale*. *Allelopathy Journal*, 10 (2): 105-122.
- Quézel, P., Santa, S. (1962).** [New flora of the Algeria and southern desert regions. Paris : National Centre for Scientific Research; French.
- Rapilly, F. (1968).** Les techniques de mycologie en pathologie végétales. *Ann. Epiphyt.*, vol. 9, numéro hors-série, Institut de la Recherche Agronomique, Paris, 102p.
- Rawal, P. and Thakore, B.B.L. (2003).** Investigation on *Fusarium* rot of sponge gourd fruits. *Journal of Mycology and Plant Pathology* 33,15–20.
- Rees, C.E.D., Dodd, C.E.R., Gibson, P.T., Booth, I.R., Stewart, G.S.A.B. (1995).** The significance of bacteria in stationary phase to food microbiology. *International Journal of Food Microbiology* 28, 263– 275.
- Regnault-Roger, C., Philogène, B. J., & Vincent, C. (2002).** Biopesticides d'origines végétales. *Paris*, 337.

Références bibliographiques

- Rezaire, A. (2012).** Activité anti-oxydante, et caractérisation phénolique du fruit de palmier amazonien *Oenocarpus bataua* (patawa). Thèse de doctorat Université des Antilles et de la Guyane.
- Ribérrreau G.P. (1968)** Les composés phénoliques des végétaux. Edition Dunod.
- Rice, E. L. (1979).** Allelopathy an update. *The Botanical Review*, 45(1), 15-109.
- Sahayarani, S. (2003).** Management of *powdery mildew* (*Oidium phyllanthi*) disease in *Phyllanthus niruri* Linn. MSc. (Ag.) thesis, Tamil Nadu Agricultural University, Coimbatore, India
- Santoyo, S., Caverro, S., Jaime, L., Ibanez, E., Senorans, F. J., & Reglero, G. (2005).** Chemical composition and antimicrobial activity of *Rosmarinus officinalis* L. essential oil obtained via supercritical fluid extraction. *Journal of food protection*, 68(4), 790-795.
- Sasidharan, S., Chen, Y., Saravanan, D., Sundram, K.M., Latha, Y.L. (2011).** Extraction, isolation and characterization of bioactive compounds from plants' extracts. *African Journal of Traditional Complementary and Alternative Medicines* 8 (1), 1–10.
- Scheuerell, S., & Mahaffee, W. (2002).** Compost tea: principles and prospects for plant disease control. *Compost Science & Utilization*, 10(4), 313-338.
- Schnee, S., Queiroz, E. F., Voinesco, F., Marcourt, L., Dubuis, P. H., Wolfender, J. L., & Gindro, K. (2013).** *Vitis vinifera* canes, a new source of antifungal compounds against *Plasmopara viticola*, *Erysiphe necator*, and *Botrytis cinerea*. *Journal of agricultural and food chemistry*, 61(23), 5459-5467.
- Sims, R.W., Gerard, B.M., (1999).** Earthworms—Synopsis of the British Fauna, No. 31. The Dorset Press, Dorchester, Great Britain.
- Singleton V. L., Orthofer R., Lamuela-Raventos R. M. (1999);** Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciotalcu reagent. *Methods in Enzymology*, 299, 152-178.
- Sinha, K. K., Sinha, A. K., & Prasad, G. (1993).** The effect of clove and cinnamon oils on growth of and aflatoxin production by *Aspergillus flavus*. *Letters in Applied Microbiology*, 16(3), 114-117.
- Smith, R.M., 2003.** Before the injection—modern methods of sample preparation for separation techniques. *Journal of Chromatography A* 1000 (1–2), 3–27.
- Sodipo, D. A., Akani, M. A., Kolawale, F. B. and Odutuga, A. A. (1991)** Saponins as the active antifungal principle in *Garcinia kola* Heckel seed. *Bioscience Research Communication* 3, 151.
- Soković, M. D., Glamočlija, J. M., & Ćirić, A. D. (2013).** Natural products from plants and fungi as fungicides. In *Fungicides-showcases of integrated plant disease management from around the world*. IntechOpen. 185-231.
- Solfo R.R., 1973.** Etude d'une Plante Médicinale Malgache *Buxus madagascariensis* Bail et ses Variétés. Ed : O.R.S.T.O.M.
- Soriano Cano, M. C., Sotomayor Sanchez, J. A., Gomez, P. S., & Garcí Vallejo, M. C. (1993).** Essential oils of the *Rosmarinus eriocalyx-tomentosus* complex in Southeast Spain. *Journal of Essential Oil Research*, 5(3), 243-246.
- Stah l , Egon , ed. (1969).** Thin-Layer Chromatography: A Laboratory Handbook. 2d ed. Berlin: Springer-Verlag.
- Sturz A.V., Lynch, D.H., Martin, R.C., Driscoll, A.M. (2006).** Les effets d'un thé de compost, de la poudre de varech et du Manzate® 75 sur la composition des communautés bactériennes et leur capacité

Références bibliographiques

d'antibiose contre *Phytophthora infestans* dans la phyllosphère de la pomme de terre. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 28, 52- 62.

Suberu, H. (2004). Preliminary studies of inhibitions in *Aspergillus flavus* with extracts of two lichens and Bentex-T fungicide. *African Journal of Biotechnology*, 3(9), 468-472.

Suhr, K. I., & Nielsen, P. V. (2003). Antifungal activity of essential oils evaluated by two different application techniques against rye bread spoilage fungi. *Journal of Applied Microbiology*, 94(4), 665-674.

Sun, T., Xu, Z., & Godber, J. S. (2006). Ultrasound assisted extraction in quantifying lutein from chicken liver using high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography B*, 830(1), 158-160.

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.

Takeuchi, H., Morino, Y., Matsukage, T., Masuda, N., Kawamura, Y., Kasai, S., ... & Ikari, Y. (2009). Impact of vascular remodeling on the coronary plaque compositions : an investigation with in vivo tissue characterization using integrated backscatter-intravascular ultrasound. *Atherosclerosis*, 202(2), 476-482.

Tatli, I. I., & Akdemir, Z. S. (2005). Antimicrobial and antimalarial activities of secondary metabolites from some Turkish *Verbascum* species. *FABAD Journal of Pharmaceutical Sciences*, 30(2), 84.

Tedeschi, R., Alma, A., & Tavella, L. (2001). Side- effects of three neem (*Azadirachta indica* A. Juss) products on the predator *Macrolophus caliginosus* Wagner (Het., Miridae). *Journal of Applied Entomology*, 125(7), 397-402.

Tegos, G., Stermitz, F. R., Lomovskaya, O., & Lewis, K. (2002). Multidrug pump inhibitors uncover remarkable activity of plant antimicrobials. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 46(10), 3133-3141.

Thakore, Y. (2006). The biopesticide market for global agricultural use. *Industrial Biotechnology*. 2(3), 294-208.

Thanaboripat, D., Chareonsettasilp, S., Pandee, K., & Udomwongsup, K. (2006). Inhibitory effect of kaffir lime, bitter cucumber and tobacco extracts on the growth of *Aspergillus flavus*. *KMITL Science and Technology Journal*, 6(1), 18-24.

Tian, J., Ban, X., Zeng, H., Huang, B., He, J., & Wang, Y. (2011). In vitro and in vivo activity of essential oil from dill (*Anethum graveolens* L.) against fungal spoilage of cherry tomatoes. *Food Control*, 22(12), 1992-1999.

Timothy L. Widmer and Nathalie Laurent. (2006). Plant extracts containing caffeic acid and rosmarinic acid inhibit zoospore germination of *Phytophthora* spp. pathogenic to *Theobroma cacao*. *European Journal of Plant Pathology*, 115, 377-388.

Trease E., Evans W.C. 1987- Pharmacognosie, BilliaireTindall. London 13 th Edition. In Karumi Y, Onyeyili PA et Ogugduaja VO, 2004. Identification des principes actifs de l'extrait de feuilles de *M. balsamia* (Baume du pommé). *Journal of Medicine and scintific. Nigeria*, 4(3): 179-182.

Tripathi, P., Dubey, N. K., & Shukla, A. K. (2008). Use of some essential oils as post-harvest botanical fungicides in the management of grey mould of grapes caused by *Botrytis cinerea*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 24(1), 39-46.

Références bibliographiques

- Tukey, H. B. (1969).** Implications of allelopathy in agricultural plant science. *The botanical review*, 35(1), 1-16.
- Tyihak, E., Vagujfalvi, D., & Hagony, P. L. (1963).** Die gas-und dünnschichtchromatographische trennung der stereoisomeren farnesole und ihrer derivate I. Mitteilung. trans-trans und cis-trans-farnesol und derivate. *Journal of Chromatography A*, 11, 45-49.
- Vaissière, B., Morison, N., Carre, G., 2005.** Abeilles, pollinisation et biodiversité. *Abeilles et colonies*, 106 (3), 10-14.
- Van der Sluijs, J. P., Simon-Delso, N., Goulson, D., Maxim, L., Bonmatin, J. M., & Belzunces, L. P. (2013).** Neonicotinoids, bee disorders and the sustainability of pollinator services. *Current opinion in environmental sustainability*, 5(3-4), 293-305.
- Vasantha-Srinivasan, P., Senthil-Nathan, S., Ponsankar, A., Thanigaivel, A., Chellappandian, M., Edwin, E. S., & Al-Dhabi, N. A. (2017).** Acute toxicity of chemical pesticides and plant-derived essential oil on the behavior and development of earthworms, *Eudrilus eugeniae* (Kinberg) and *Eisenia fetida* (Savigny). *Environmental Science and Pollution Research*, 1-12.
- Velluti, A., Sanchis, V., Ramos, A. J., Turon, C., & Marin, S. (2004).** Impact of essential oils on growth rate, zearalenone and deoxynivalenol production by *Fusarium graminearum* under different temperature and water activity conditions in maize grain. *Journal of applied microbiology*, 96(4), 716-724.
- Verpoorte, R., & Memelink, J. (2002).** Engineering secondary metabolite production in plants. *Current opinion in biotechnology*, 13(2), 181-187.
- Vickery, B., Vickery, M., L. (1981).** Secondary plant metabolism. University Park Press, Baltimore.
- Vilkhu, K., Mawson, R., Simons, L., & Bates, D. (2008).** Applications and opportunities for ultrasound assisted extraction in the food industry—A review. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 9(2), 161-169.
- Vuorela, S. (2005).** Analysis, isolation and bioactivities of rapeseed phenolics. Ed. University of Helsinki, Helsinki.
- Waksmundzka-Hajnos, M., Sherma, J., & Kowalska, T. (2008).** *Thin layer chromatography in phytochemistry*. CRC Press.
- Wang, W., Ben-Daniel, B. H., & Cohen, Y. (2004).** Control of plant diseases by extracts of *Inula viscosa*. *Phytopathology*, 94(10), 1042-1047. of *Aspergillus flavus* in maize with plant essential oils and their components. *Journal of Food Protection*, 61(5), 616-619.
- Watanabe, T. (2002).** Pictorial atlas of soil and seed fungi -morphologies of cultured fungi and key to species. 2nd ed. Boca Raton: CRC Press.
- Wei, X., Chen, M., Xiao, J., Liu, Y., Yu, L., Zhang, H., & Wang, Y. (2010).** Composition and bioactivity of tea flower polysaccharides obtained by different methods. *Carbohydrate polymers*, 79(2), 418-422.
- Whittaker, R. H., & Feeny, P. P. (1971).** Allelochemicals: chemical interactions between species. *Science*, 171(3973), 757-770.
- Wilkins, K. M., Board, R.G. (1989).** Natural antimicrobial system. In : Gould GW (ed) Mechanism of Action of Food Preservation Procedures. Elsevier, New York, pp 285–362.

Références bibliographiques

- Williams J.H., Phillips T.D., Jolly P.E., Stiles J.K., Jolly C.M., Aggarwal D. (2004).** Human aflatoxicosis in developing countries : a review of toxicology, exposure, potential health consequences, and interventions. *American Journal of Clinical Nutrition*. 80: 1106-1122.
- Wilson, C. L., Solar, J. M., El Ghaouth, A., & Wisniewski, M. E. (1997).** Rapid evaluation of plant extracts and essential oils for antifungal activity against *Botrytis cinerea*. *Plant disease*, 81(2), 204-210.
- Wome, 1985 :** Recherche ethnopharmacologique sur les plantes médicinales utilisées en médecine traditionnelle à Kisangani. Tom I, Thèse inédit, Faculté des sciences, Université libre de Bruxelles. P 164. 306
- Wuyts, N., De Waele, D., & Swennen, R. (2006).** Extraction and partial characterization of polyphenol oxidase from banana (*Musa acuminata* Grande naine) roots. *Plant Physiology and Biochemistry*, 44(5-6), 308-314
- Yan, Y. L., Yu, C. H., Chen, J., Li, X. X., Wang, W., & Li, S. Q. (2011).** Ultrasonic-assisted extraction optimized by response surface methodology, chemical composition and antioxidant activity of polysaccharides from *Tremella mesenterica*. *Carbohydrate Polymers*, 83(1), 217-224.
- Yanli, S., Ma, L., Wen, Y., Wang, H., & Zhang, S. (2014).** Studies of the in vitro antibacterial activities of several polyphenols against clinical isolates of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Molecules*, 19(8), 12630-12639.
- Yasmin, S., & D'Souza, D. (2010).** Effects of pesticides on the growth and reproduction of earthworm: a review. *Applied and Environmental Soil Science*, 1-9.
- Yi, Z., Yu, Y., Liang, Y., & Zeng, B. (2008).** In vitro antioxidant and antimicrobial activities of the extract of *Pericarpium Citri Reticulatae* of a new Citrus cultivar and its main flavonoids. *LWT-Food Science and technology*, 41(4), 597-603.
- Yue, X., Xu, Z., Prinyawiwatkul, W., & King, J. M. (2006).** Improving extraction of lutein from egg yolk using an ultrasound-assisted solvent method. *Journal of food science*, 71(4), C239-C241.
- Zain, M. E. (2011).** Impact of mycotoxins on humans and animals. *Journal of Saudi Chemical Society*, 15(2), 129-144.
- Zhao, J., Davis, L. C., & Verpoorte, R. (2005).** Elicitor signal transduction leading to production of plant secondary metabolites. *Biotechnology advances*, 23(4), 283-333.
- Zhu, Z., Liang, Z., Han, R., & Wang, X. (2009).** Impact of fertilization on drought response in the medicinal herb *Bupleurum chinense* DC.: growth and saikosaponin production. *Industrial crops and products*, 29(2-3), 629-633.
- Zols, G., M. Bicevskis. (1979).** Respects for the use of IPS *Tyroglyphus* Attractant. In : *Biologia Aktualis Veshchestva Zashchiva Rastenij*, Shumakov, E.M., S.Y. Chekmenev and T.V. Ivanova (Eds.), Izd. Kolos, Moscow, pp : 49-51

Annexe I

Screening chimique

1. Les flavonoïdes

10g de drogue pulvérisée sont macérés dans 150ml d'HCl à 1% pendant 24h, après avoir filtré le mélange, nous avons procédé au test suivant : nous avons pris 10ml du filtrat, après l'avoir rendu basique par l'ajout du NH₄OH, après un repos de 3h → l'apparition d'une couleur jaune claire dans la partie supérieure du tube indique la présence des flavonoïdes. **Bruneton J. 1993**

2. Recherche des leuco anthocyanes

Un volume de 5 ml de l'infusé est mélangé à 4 ml d'alcool chlorhydrique (Ethanol/ HCl pur 3/1 v/v). Après chauffage au bain marie à 50°C pendant quelques minutes, l'apparition d'une couleur rouge cerise indique la présence des leuco anthocyanes (**Solfo, 1973**).

3. Détection des tannins

A 5 ml du décocté précédant, on laisse tomber quelques gouttes de chlorure ferrique 1%. L'apparition d'une coloration particulière ou d'un précipité indique la présence de tanins dans la drogue (**DISASI, 1988 ; DELAUDE, 1969**).

4. Tanins (Cathéchique ou Gallique)

Préparation de l'infusé

Préparation de l'infusé à 10% : 10g de drogue broyée sont placés dans 100ml d'eau bouillante, après 15mn on filtre et on recueille l'infuser

On met 1 ml de l'infusé avec 2 ml H₂O et on ajoute 2 à 3 gouttes de FeCl₃ 1%. En présence de tanins, il se développe une coloration bleu-vert (tanins Cathéchique) ou bleu noire (tanins Gallique) (**Trease et Evans, 1987**).

5. Les coumarines

On pèse 1 g de matériel végétal sec broyé et on le place dans un tube à essai, couvert par du papier filtre imbibé avec NaOH dilué. Le tube est ensuite placé dans un bain marie bouillant pendant quelques minutes. Le papier filtre est ensuite examiné sous lumière UV. Une fluorescence jaune indique la présence des coumarines (**Rizk, 1982**).

6. Les quinones

On met dans les 4 tubes 2ml extrait :

Dans le premier tube, 2ml de l'extrait méthanolique (témoin)

Dans le deuxième tube, 2ml de l'extrait méthanolique

Dans le troisième tube, 2ml de l'extrait aqueux (témoin)

Dans le quatrième tube, 2ml de l'extrait aqueux

près agitation, l'apparition d'une coloration qui vire au jaune, rouge ou violet de la phase aqueuse confirme la présence des quinones (**Ribérreau,1968**)

7. Recherche des alcaloïdes

Après macération de 5g de feuilles séchées et broyées dans 50 ml d'HCl à 1 %, on filtre la solution obtenue et on lui ajoute quelques gouttes de réactif de Mayer qui provoque un précipité blanc indiquant la présence des alcaloïdes (**Bouquet, 1972**).

8. Saponines (Test de Froth)

Chaque extrait est dilué avec l'eau distillée, ces extraits sont agités dans un tube cylindrique, la formation d'une mousse de 1 cm d'hauteur indique la présence des saponines (**Brain et Turner, 1975**).

9. Les cardinolides

1g de poudre sèche est macéré dans 20ml d'eau distillée pendant 3h, après filtration on prélève 10ml de filtrat qu'on mélange avec une solution de 10ml de CHCl_3 (chloroforme) et de $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ (éthanol pur), on évapore la phase organique dans un bain de sable à 90°C , après le précipité est dissout dans 3ml de CH_3COOH glacial (acide acétique glacial), en ajoutant quelques gouttes de FeCl_3 suivi de 1ml d' H_2SO_4 concentré sur les parois du tube. L'apparition d'une couleur verte bleue dans la phase acide indique la présence des cardinolides. (**Bruneton , 1993**)

10. Recherche des Terpènes et des Stérols

5 g de la poudre sont macérés dans 20 ml d'éther de pétrole, Après filtration, la phase organique est évaporée dans un bain de sable à une 0°C de 90°C . Le résidu est dissout dans 0.5 ml d'acide acétique (CH_3COOH) en ajoutant 1 ml d'Acide Sulfurique (H_2SO_4) concentré, dans la zone de contact entre les deux liquides. S'il y a apparition d'un cercle violé ou marron devenant gris par la suite, ceci indique la présence des terpènes et stérols. (**Bruneton, 1993**).

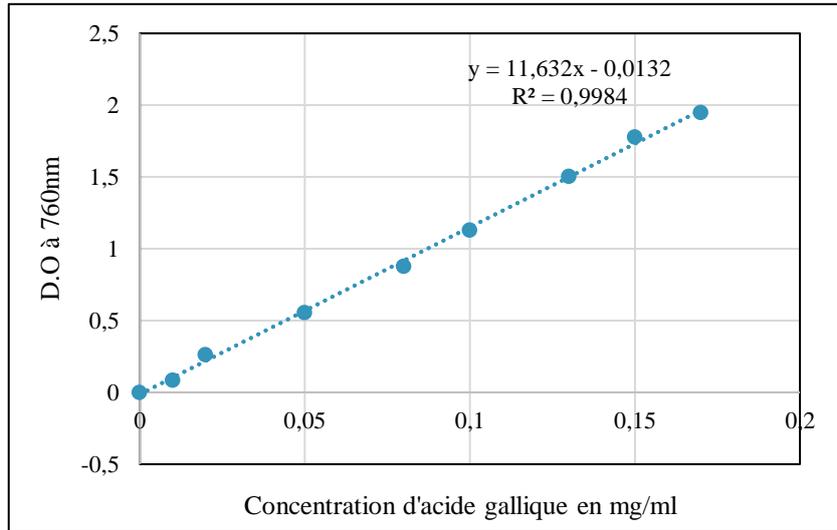


Fig. 1: Courbe d'étalonnage de l'acide gallique

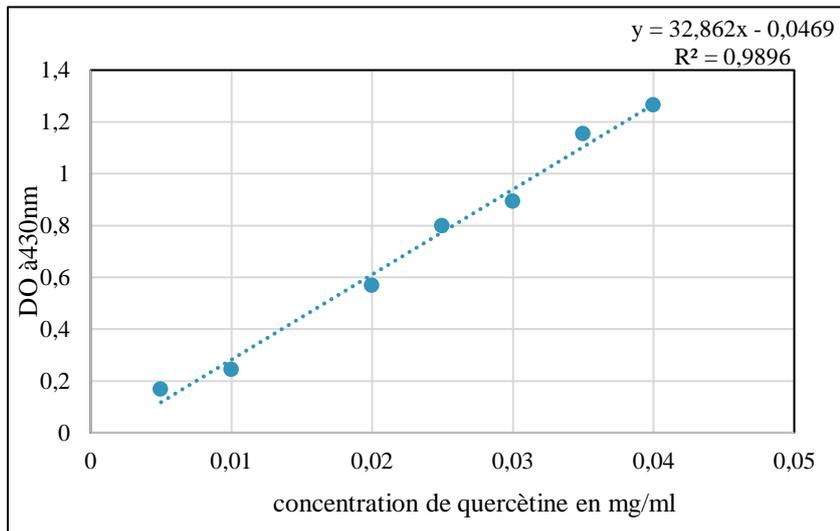


Fig.2 : Courbe d'étalonnage de la quercétine

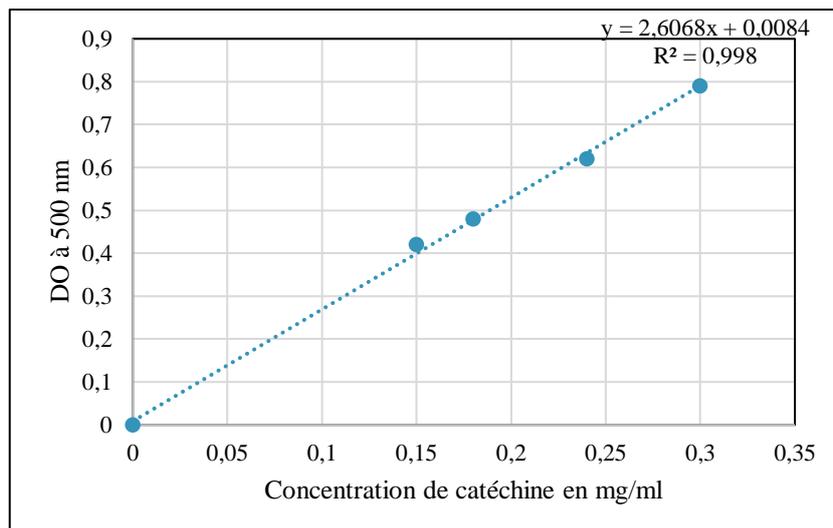


Fig. 3 : Courbe d'étalonnage de la catéchine.

Annexe II

Tab. 1 : les zone d'inhibition en mm de l'activité des extraits *Rosmarinus eriocalyx* sur genre *Aspergillus*

Les souches fongiques	[] (EM)			[] (EA)			Hymexazole 20µl/ml
	1mg/1m	0.5mg/ml	0,25mg/ml	1mg/ml	0,5mg/ml	0,25mg/ml	
<i>Aspergillus nidulans</i>	12b±1	13b±1,52	14b±2	6c±0	6c±0	8c±0	18,66±1,52
<i>Aspergillus ochraeus</i>	20,67 ab ±3,06	16,66 bc ±1,52	15 c ±2,00	8,66 d ±0,57	6 d ±0,00	6 d ±0,00	21 a ±1,52
<i>Aspergillus terreus</i>	21,33 c±1	12 c ±1,00	14 b±1,00	6,33a ±0,00	6 a ±0,00	6 a ±0,00	12,66 a±0,00
<i>Aspergillus flavus</i>	21,3 a ±0,88	14 c ±0,57	12,7 b ±0,33	8,33a ±0,66	6 a ±0,00	8,33 a ±0,33	6,33 a±0,33

Tab. 2 : les zone d'inhibition en mm de l'activité des extraits *Rosmarinus eriocalyx* sur le genre *Fusarium*

Les souches fongiques	[] (EM)			[] (EA)			Hymexazole 20µl
	1mg/1m	0.5mg/ml	0,25mg/ml	1mg/ml	0,5mg/ml	0,25mg/ml	
<i>Fusarium graminearum</i>	14,66b ± 1,52	16,66b ±1,52	15b ±2,00	8,66c ±0,57	6 c ±0,00	6c ±0,00	21,66a ±1,52
<i>Fusarium verticilloides</i>	13,66a ± 1,52	11,33a ±1,52	13a ±1,73	13a ±2,00	6b ±0,00	6 b ±0,00	12,67a ±2,52
<i>Fusarium proliferatum</i>	13,16a ±1,04	11,83 a ±1,04	11,5ab ±0,86	9,16bc ±0,76	6,66d ±0,15	6,33d ±0,57	8 cd ±0,00
<i>Fusarium oxysporum</i>	6,66c ±0,57	13,83 a ±1,52	10,833 b±1,04	6c ±0,00	6 c ±0,00	6 c ±0,00	6 c ±0,66

Tab. 3 : les zone d'inhibition en mm de l'activité des extraits *Rosmarinus eriocalyx* sur le genre *Alternaria*

Les souches fongiques	[] (EM)			[] (EA)			Hymexazole
	1mg/1ml	0,5mg/ml	0,25mg/ml	1mg/ml	0,5mg/ml	0,25mg/ml	20µl
<i>Alternaria alternata 1</i>	20c±1,00	17 c ±0,57	23,33 d ±1,52	7,33 a b ±1,15	9,33 b ±0,57	6 a ±0,00	24,66 d ±1,52
<i>Alternaria alternata 2</i>	10,66 b ±0,33	10,66 b ±0,3	8 a ±0,00	7,33 a ±0,33	7 a ±1,00	7,33 a ±0,33	24,33 c ±0,33
<i>Alternaria tenuisima</i>	14,66 c ±0,33	24,33 d ±0,66	10 b ±0,57	10,33 b ±0,33	6,33 a ±0,3	8,66 b ±0,33	22 ,33 d ±0,3
<i>Alternaria arborescens</i>	21c±0,57	16 b ±0,57	13,66 b ±0,66	6,33 a ±0,33	7,33 a ±0,33	6 a ±0,00	24,33 d ±0,88

Tab. 4: les zones d'inhibition en mm de l'activité des extraits *Rosmarinus eriocalyx* sur d'autre genre

Les souches fongiques	[] (EM)			[] (EA)			Hymexazole
	1 mg/1ml	0,5mg/ml	0,25 mg/ml	1 mg/ml	0,5 mg/ml	0,25 mg/ml	20µl
<i>Colletotrichum coccodes</i>	12 ab ± 2	13a ±2,1	12,67ab ±2,08	8.66abc ±1,52	6,66c ±1,15	6,33c ±0,57	8,33bc ±1,52
<i>Helminthosporium sp</i>	6,66c ± 0,57	12,67ab ±2,52	11b ±1,52	6,00c ±0	6,66c ±1,15	6,66c ±0,00	15,66a ±0,57
<i>Penicillium sp</i>	16b ±2	21a ±2,65	13,33bc ±1,52	6,00e ±0	6,66de ±1,15	6,00e ±0,00	10,66cd ±1,52

Tab. 5 : Les zones d'inhibition en mm de l'activité des extraits de *Rosmarinus eriocalyx* sur le genre *Pseudomons*

Les souches bactériennes	[] (EM)			[] (EA)			Hymexazole
	1 mg/1ml	0,5 mg/ml	0,25 mg/ml	1 mg/ml	0,5 mg/ml	0,25 mg/ml	20µl/ml
<i>Pseudomonas sp 1</i>	19,66a ± 0,57	12,66c ±0,57	16,00b ±1,00	6,00d ±0,00	6,00d ±0,00	6,00d ±0,00	18,00a ±1,52
<i>Pseudomonas sp2</i>	22,33a ± 2,08	21,33a ±1,52	14,33b ±0,57	7,66d ±1,52	9,00cd ±0,00	8,33d ±0,00	12,00bc ±1,00
<i>Pseudomonas sp3</i>	22,00a ±1,00	18,33ab ±1,52	16,00bc ±2,00	11,33de ±0,57	7,66 ^e ±0,57	9,00de ±0,00	12,67cd ±2,52
<i>Pseudomonas sp 4</i>	19,66a ±0,57	11,66b ±0,57	15,66b ±1,52	6,00c ±0,00	6,66c ±1,15	7,00c ±1,00	19,66a ±1,52
<i>Pseudomonas sp5</i>	21,00a ±1,00	18,66a ±1,52	17,33a ±1,52	7,33b ±1,15	7,00b ±1,73	6,00b ±0,00	23,00a ±2,89

Tab. 6 : Le taux d'inhibition de la croissance mycélienne des souches d'*Aspergillus* avec les trois extraits de *Rosmarinus eriocalyx*

Les souches fongiques	T% ME	T%MES	T%AE	T%Hymexazole
<i>Aspergillus nidulans</i>	77,57a±1,58	75,47a±2,54	37,36b±3,54	69,74 a ± 3,36
<i>Aspergillus terreus</i>	76,19a±2,69	73,47ab±2,37	64,21b±8,10	5,3c± 2,7
<i>Aspergillus flavus</i>	64,60a±1,21	58,43a±2,70	29,88b±2,17	39b,11 ± 12,2
<i>Aspergillus ochraceus</i>	62,7a±6,67	65,67a±6,62	23,88b±1,86	62,52a ± 11,27

Tab. 7 : Le taux d'inhibition de la croissance mycélienne des souches fongiques avec les trois extraits de *Rosmarinus eriocalyx*

Les souches fongiques	T% ME	T%MES	T%AE	T%Hymexazole
<i>Fusarium verticillioides</i>	75,19a±3,93	78,53a±2,20	8,05c±4,66	52,64b ± 3,41
<i>Fusarium graminearum</i>	56,66a±4,16	55,33a±3,05	3,33c±5,773	44,09b ± 2,25
<i>Fusarium proliferatum</i>	65,33a±1,15	56b±5,29	0±0c	66,07a± 1,57
<i>Fusarium oxysporum</i>	28,48b±3,54	38,13b±8,53	26,26b±4,27	44,48a± 5,47

Tab. 8 : Le taux d'inhibition de la croissance mycélienne des souches d'*Alternaria sp*

Souche Alternaria	T%ME	T%AE	T% Hymexazole
<i>Alternaria alternata 2</i>	52,89b ±0,64	20c ±2.23	60,73a ±1.70
<i>Alternaria alternata 1</i>	83,11a ±2.31	26,66 c ±1.11	65,55 b ±2.22
<i>Alternaria tenuissima</i>	76,66 a ±2.57	20,85 c ±3.83	65,55 b ±2.22
<i>Alternaria arborescens</i>	79,02 a ±0.63	72.79a ±5.75	63,3 b ±0.607

Tabl. 9 : Le taux d'inhibition de la croissance mycélienne des souches fongiques avec les trois extraits de *Rosmarinus eriocalyx*

Les souches fongiques	T% ME	T% MES	T%AE	T%Hymexazole
<i>Helminthosporium sp</i>	81,08a±0,94	77,03a±2,22	61,45b±5,67	75,18 a± 2.4
<i>Colletotrichum coccodes</i>	88,66a±1,15	78,66b±1,15	30,66c±1,15	77,81b ± 5.23
<i>Penicillium sp</i>	74,10a±1,07	54,47b±4,99	38,95c±5,52	36,62 c±4,15

Tab10. : Cinétique de la densité optique d'*Aspergillus terreus* sous l'effet des extraits de *Rosmarinus eriocalyx* et d'Hymexazole

D.O	EM	EA	Hymexazole	Témoin	P
48h	0,249c ± 0	0,717 a±0.014	0,222d ± 0,007	0,319 b±0,044	0,000
72h	0,41a ± 0.11	1,337b ± 0,24	0,259a ± 0,036	1,179b ± 0,02	0,000
96h	0,332c± 0	1,656b ± 0,05	0,342c ±0,004	2,367a ±0,07	0,000

Tab. 11 : Cinétique du pH d'*Aspergillus terreus* sous l'effet des extraits de *Rosmarinus eriocalyx* et d'Hymexazole

pH	EM	EA	Hymexazole	Témoin	P
48h	5,508a± 0,002	5,526a ±0	5,526a ±0,03	5,605a± 0,103	0,390
72h	3,801b± 0,94	5,403a ±0,05	5,691a ± 0,03	5,435a± 0,03	0,045
96h	3,14b ± 0,02	5,371a±0,08	5,463a±0,146	5,47a±0,11	0,000

Tab. 12 : Cinétique de la densité optique d'*Aspergillus ochraceus* sous l'effet des extraits de *Rosmarinus eriocalyx* et d'Hymexazole

D.O	EM	EA	Hymexazole	Témoin	P
48h	0,303b± 0,024	0,275b ±0,021	0,032c± 0	1,049a± 0,014	0,000
72h	0,454b± 0,03	0,491b±0,032	0,066c±0,023	1,267a±0,014	0,000
96h	0,411c±0	0,731b±0,002	0,006d±0,02	1,442a±0,039	0,000

Tab. 13 : Cinétique de pH d'*Aspergillus ochraceus* sous l'effet des extraits de *Rosmarinus eriocalyx* et d'Hymexazole

pH	EM	EA	Hymexazole	Témoin	P
48h	5,883a± 0,03	5,846a±0,02	5,888a±0,02	5,851a± 0,07	0,351
72h	5,855ab± 0,07	5,855ab±0,07	5,833b± 0,014	5,904a± 0,03	0,056
96h	5,789a± 0,05	5,866a±0,014	5,826a±0,01	5,861a±0,07	0,153

Tab. 14 : Cinétique de la densité optique d'*Aspergillus nidulans* sous l'effet des extraits de *Rosmarinus eriocalyx* et d'Hymexazole

D.O	EM	EA	Hymexazole	Témoin	P
48h	0,152b± 0,007	0,188a± 0,005	0,105c ± 0,003	0,171ab± 0,011	0.002
72h	0,180c± 0,005	1,031b ± 0,011	0,058d ± 0,018	1,151 a± 0,09	0.000
96h	0,109b ± 0,001	1,18a ± 0,064	0,049c ± 0,004	1,274a± 0,06	0.000

Tab. 15 : Cinétique de pH d'*Aspergillus nidulans* sous l'effet des extraits de *Rosmarinus eriocalyx* et d'Hymexazole

pH	EM	EA	Hymexazole	Témoin	P
48h	5,786a±0,019	5,724a±0,125	5,803a±0,014	5,68a±0,08	0,427
72h	5,887a±0,05	5,696a±0,04	5,799a±0,037	5,603a±0,131	0,064
96h	5,811a±0,068	5,419b±0,075	5,77a±0,084	5,6ab±0,079	0,022

Tab. 16 : la Cinétique de croissance d'*Aspergillus flavus* sous l'effet des extraits et du pesticide

D.O	EM	EA	Hymexazole	Témoin	P
48h	0,121b ±0,006	0,136ab ±0,005	0,04c± 0,019	0,178a± 0,013	0,002
72h	0,19b±0,04	0,222b±0,07	0,143b±0,011	1,067a±0,019	0.000
96h	0,447b±0,021	0,553a±0,02	0,117c±0,005	1,168a±0,036	0.000

Tab. 17 : cinétique de pH d'*Aspergillus nidulans* sous l'effet des extraits de *Rosmarinus eriocalyx* et d'Hymexazole

pH	EM	EA	Hymexazole	Témoin	P
48h	5,759a ± 0,019	5,853a± 0,094	5,741a± 0,012	5,654a± 0,025	0,071
72h	5,721a± 0,026	5,703a ±0,018	5,709a ±0,047	5,668 a±0,011	0,404
96h	5,97 a±0,007	5,855b± 0,002	5,743c± 0,018	5,684d ±0,002	0,000

Tab. 18 : Cinétique de la densité optique de *Fusarium verticilloides* sous l'effet des extraits de *Rosmarinus eriocalyx* et d'Hymexazole

D.O	EM	EA	Hymexazole	Témoin	P
48h	1,036c± 0,03	0,07 d±0	2,441a ±0,03	2,125b± 0,08	0.000
72h	0,405c ±0,009	0,515c ±0,05	1,339b ±0,003	1,937a ±0,238	0.001
96h	0,31c ±0,012	0,549c ±0,04	1,424b± 0,153	2,458a ±0,02	0.000

Tab. 19 : Cinétique de pH de *Fusarium verticilloides* sous l'effet des extraits de *Rosmarinus eriocalyx* et d'Hymexazole

pH	EM	EA	Hymexazole	Témoin	P
48h	5,273b±0,024	6,016a±0,047	5,185b±0,12	5,086b±0,042	0.000
72h	5,884a±0,016	5,891a±0,031	5,128b±0,031	5,275b±0,071	0.001
96h	5,84a±0,084	5,809a±0,023	5,213c±0,0283	5,566b±0,0332	0.000

Tab. 20 : Cinétique de la densité optique de *Fusarium oxysporum* sous l'effet des extraits de *Rosmarinus eriocalyx* et d'Hymexazole

D.O	EM	EA	Hymexazole	Témoin	P
48h	1,352bc± 0,117	2,162a±0,191	1,083c±0,019	1,659b±0,06	0.003
72h	0,918c±0,062	2,227a±0,007	1,302b±0,028	2,004a±0,138	0.000
96h	0,635c±0,022	1,568a±0,083	1,278b±0,069	1,675a±0,057	0.000

Tab. 21 : Cinétique de pH de *Fusarium oxysporum* sous l'effet des extraits de *Rosmarinus eriocalyx* et d'Hymexazole

pH	EM	EA	Hymexazole	Témoin	P
48h	6,736a±0,014	6,688a±0,039	6,798a±0,073	6,759a±0,03	0.26
72h	6,843a±0,029	6,735a±0,017	6,809a±0,065	6,761a± 0,072	0.295
96h	6,961b±0,007	6,66a±0,004	6,862b±0,086	6,629a±0,005	0.004

Tab. 22 : Cinétique de la densité optique de *Fusarium graminearum* sous l'effet des extraits de *Rosmarinus eriocalyx* et d'Hymexazole

D.O	EM	EA	Hymexazole	Témoin	P
48h	1,458b± 0,021	2,049a±0,075	1,366b±0,009	1,94a±0,01	0.000
72h	1,408b±0,022	2,223a±0,016	1,167c±0,034	2,126a±0,041	0.001
96h	1,225c±0,033	2,43a±0,125	1,076c±0,004	2,292a±0,008	0.000

Tab. 23 : Cinétique de pH de *Fusarium graminearum* sous l'effet des extraits de *Rosmarinus eriocalyx* et d'Hymexazole

pH	EM	EA	Hymexazole	Témoin	P
48h	5,73a±0,042	5,66ab±0,084	5,709ab±0,019	5,526b±0,004	0.044
72h	5,799a±0,006	5,566b±0,056	5,764a±0,002	5,559b±0,061	0.008
96h	5,742ab±0,026	5,5b±0,003	5,974a±02	5,623ab±0,004	0.036

Tab. 24 : Cinétique de la densité optique de *Fusarium proliferatum* sous l'effet des extraits de *Rosmarinus eriocalyx* et d'Hymexazole

D.O	EM	EA	Hymexazole	Témoin	P
48h	0,434b± 0,013	0,749b±0,082	0,281b±0,045	1,688a±0,233	0.001
72h	0,36c±0,053	1,282b±0,231	0,217c±0,009	2,266a±0,119	0.000
96h	0,781d±0,017	1,679b±0,074	0,558c±0,019	2,675a±0,068	0.000

Tab. 25 : Cinétique de pH de *Fusarium proliferatum* sous l'effet des extraits de *Rosmarinus eriocalyx* et d'Hymexazole

pH	EM	EA	Hymexazole	Témoin	P
48H	6,754a±0,012	6,233b±0,014	6,889a±0,065	6,116b±0,028	0.000
72H	6,874a±0,012	6,508b±0,017	6,879b±0,094	6,329a±0,094	0.003
96H	6,778ab±0,013	6,723b±0,018	6,821a±0,016	6,568c±0,011	0.000

Tab. 26 : Cinétique de la densité optique *d'Alternaria alternata 1* sous l'effet des extraits de *Rosmarinus eriocalyx* et d'Hymexazole

D.O	EM	EA	Hymexazole	Témoin	P
48 h	0.431c±0.014	1.631a±0.017	0.035d±0.003	1.329b±0.009	0.000
72 h	0.046b±0.011	1.764a±0.076	0.023b±0.007	1.592a±0.043	0.000
96 h	0.052c±0.009	2.219a±0.007	0.022c±0.003	1.646b±0.015	0.000

Tab. 27 : Cinétique de pH *d'Alternaria alternata 1* sous l'effet des extraits de *Rosmarinus eriocalyx* et d'Hymexazole

pH	EM	EA	Hymexazole	Témoin	P
48 h	6.213b ± 0.018	6.844a± 0.026	5.935d ±0.007	6.139c ±0.009	0.000
72h	6.154b ± 0.002	6.915a±0.049	5.726d ±0.028	5.971c ±0.002	0.000
96h	6.125b ± 0.007	6.811a± 0.003	5.64d ±0.00	5.941c±0.007	0.000

Tab. 28 : Cinétique de la densité optique *d'Alternaria alternata 2* sous l'effet des extraits de *Rosmarinus eriocalyx* et d'Hymexazole

D.O	EM	EA	Hymexazole	Témoin	P
48 h	0.241c ±0.004	1.248a±0.019	0.142d±0.01	1.578b±0.02	0.000
72 h	0.031c± 0.009	1.558a±0.123	0.015c±0.00	1.996b±0.066	0.000
96 h	0.135b±0.004	1.914a±0.069	0.019b±0.004	2.069a±0.06	0.000

Tab. 29 : Cinétique de la densité optique *d'Alternaria alternata 2* sous l'effet des extraits de *Rosmarinus eriocalyx* et d'Hymexazole

pH	EM	EA	Hymexazole	Témoin	P
48 h	6,151a±0,0304	5,801c± 0,026	5,934b±0,016	5,933b±0,004	0.000
72h	6,193a± 0,056	5,695c±0,007	5,936b±0,023	6,04ab±0,099	0.004
96h	6,311a±0,096	5,739b±0,019	5,866ab±0,028	5,78b±0,216	0.027

Tab. 30 : Cinétique de la densité optique *d'Alternaria tenuissima* sous l'effet des extraits de *Rosmarinus eriocalyx* et d'Hymexazole

D.O	EM	EA	Hymexazole	Témoin	P
48 h	0.685c±0.007	1.073b±0.053	0.043d±0.002	1.915a±0.004	0.000
72 h	0.342a±0.219	1.539b±0.217	0.047b±0.028	1.982a±0.007	0.000
96 h	0.482b±0.07	2.159a±0.252	0.027b±0.013	2.296a±0.021	0.000

Tab. 31 : Cinétique de pH *d'Alternaria tenuissima* sous l'effet des extraits de *Rosmarinus eriocalyx* et d'Hymexazole

pH	EM	EA	Hymexazole	Témoin	P
48 h	5,9145a±0,012	5,861ab±0,012	5,643b±0,009	5,983a±0,113	0.015
72h	5,883b±0,024	5,93ab±0,014	5,543c±0,018	5,9595a±0,004	0.000
96h	5,863a±0,004	5,911a±0,058	5,628 b±0,002	5,949a±0,004	0.001

Tab. 32 : Cinétique de la densité optique *d'Alternaria arborescens* sous l'effet des extraits de *Rosmarinus eriocalyx* et d'Hymexazole

D.O	EM	EA	Hymexazole	Témoin	P
48 h	0.736c±0.019	1.153a±0.006	0.148d±0.001	1.303b±0.00b	0.000
72 h	0.616b±0.096	1.436a±0.151	0.027c±0.002	1.480a± 0.003	0.000
96 h	0.053c±0.001	1.431a±0.019	0.03d±0.003	1.586b±0.016	0.000

Tab. 33: Cinétique de pH *d'Alternaria arborescens* sous l'effet des extraits de *Rosmarinus eriocalyx* et d'Hymexazole

pH	EM	EA	Hymexazole	Témoin	P
48 h	6,060a±0,099	5,893a±0,070	5,933a±0,004	5,948a±0,0028	0.176
72h	6,019a±0,1039	5,744b±0,016	5,511c±0,012	5,788b±0,017	0.003
96h	6,416a± 0,212	5,736bc±0,004	5,348c±0,002	5,8b±0,028	0.003

Tab. 34 : Cinétique de la densité optique de *Penicillium sp* sous l'effet des extraits de *Rosmarinus eriocalyx* et d'Hymexazole

D.O	EM	EQ	Hymexazole	Témoin	P
48h	0,219b± 0,001	0,280b± 0,012	0,131b± 0,004	1,434a ±0,146	0.027
72h	0,329b± 0,04	0,346b± 0,02	0,168c± 0,00	1,288a± 0,06	0.000
96h	0,274bc± 0,007	0,364b± 0,004	0,118c± 0,016	1,725a± 0,084	0.000

Tab. 35 : Cinétique de pH de *Penicillium sp* sous l'effet des extraits de *Rosmarinus eriocalyx* et d'Hymexazole

pH	EM	EA	Hymexazole	Témoin	P
48h	5,973a± 0,014	5,933a± 0,066	5,87a± 0,014	5,829a± 0,019	0.054
72h	5,813a± 0,04	5,84a± 0,028	5,743ab± 0,004	5,688b± 0.031	0,017
96h	5,82a ±0,028	5,83a± 0,014	5,736b± 0,004	5,774b± 0,002	0.013

Tab. 36 : Cinétique de la densité optique d'*Helminthosporium sp* sous l'effet des extraits de *Rosmarinus eriocalyx* et d'Hymexazole

D.O	EM	EA	Hymexazole	Témoin	P
48h	0,273a ±0,055	0,303a ±0,066	0,364a± 0,071	0,456a± 0,01	0,102
72h	0,426c ±0,002	0,784b± 0,135	0,319c± 0,009	1,217a ±0,038	0,001
96h	0,588c± 0,024	0,784 b±0,135	0,319c± 0,009	1,217a± 0,038	0,000

Tab. 37 : Cinétique de pH d'*Helminthosporium sp* sous l'effet des extraits de *Rosmarinus eriocalyx* et d'Hymexazole

pH	EM	EA	Hymexazole	Témoin	P
48h	5,689ab ±0,009	5,734a± 0,02	5,691ab ±0,007	5,625b ±0,035	0.038
72h	5,6b± 0,014	5,626ab± 0,004	5,649a± 0,009	5,538c± 0,002	0.001
96h	5,653a ±0,000	3,973a ± 1,093	5,653a± 0,014	5,436a± 0,07	0.093

Tab. 38 : Cinétique de la densité optique de *Colletotrichum coccodes* sous l'effet des extraits de *Rosmarinus eriocalyx* et d'Hymexazole

D.O	EM	EA	Hymexazole	Témoin	P
48h	0,352a ±0,017	0,452a± 0,07	0,469a± 0,067	0,371a± 0,016	0,187
72h	0,387b± 0,007	0,691a± 0,067	0,384b± 0,082	0,866a ±0,032	0,001
96h	0,278c ±0,067	2,016a ±0,148	0,449c± 0,079	1,236 b±0,087	0,000

Tab. 39 : Cinétique de pH de *Colletotrichum coccodes* sous l'effet des extraits de *Rosmarinus eriocalyx* et d'Hymexazole

pH	EM	EA	Hymexazole	Témoin	P
48h	5,623a±0,024	5,623a±0,018	5,636a±0,004	5,471b±0,021	0.002
72h	5,634a±0,026	5,336b±0,075	5,654a±0,054	5,566a±0,042	0.012
96h	5,616a±0,047	5,513ab±0,08	5,451ab±0,021	5,374b±0,012	0,003

Tab. 40 : Cinétique de la densité optique de *Pseudomonas sp 1* sous l'effet des extraits de *Rosmarinus eriocalyx* et d'Hymexazole

D.O	EM	EA	Hymexazole	Témoin	P
48h	0,465b±0,012	2,509a±0,118	2,37a±0,07	2,68a±0,141	0,000
72h	0,741d±0,024	1,258c±0,075	1,691b±0,138	2,86a±0,077	0,000
96h	0,79b±0,077	2,501a±0,212	2,389a±0,103	2,854a±0,05	0,000

Tab. 41 : Cinétique de pH de *Pseudomonas sp 1* sous l'effet des extraits de *Rosmarinus eriocalyx* et d'Hymexazole

pH	EM	EA	Hymexazole	Témoin	P
48h	6,889a±0,004	5,566b±0,042	6,624b±0,016	6,617b±0,015	0,001
72h	6,696a±0,0615	6,658a±0,181	6,754a±0,002	6,781a±0,002	0,06
96h	6,211b±0,016	6,746a±0,084	6,734a±0,068	6,763a±0,056	0,002

Tab. 42 : Cinétique de la densité optique de *Pseudomonas sp 2* sous l'effet des extraits de *Rosmarinus eriocalyx* et d'Hymexazole

D.O	EM	EA	Hymexazole	Témoin	P
48h	1,493b±0,099	1,705b±0,077	2,52a±0,018	2,575a±0,064	0,000
72h	0,611c±0,082	2,216b±0,056	0,381c±0,029	2,895a±0,073	0,000
96h	0,321b±0,055	2,329a±0,036	0,181b±0,002	2,092a±0,108	0,000

Tab. 43 : L'effet des extraits et du pesticide sur le pH du milieu de la culture *Pseudomonas sp 2*

pH	EM	EA	Hymexazole	Témoin	P
48h	6,279a±0,061	6,256a±0,056	5,481c±0,035	5,751b±0,012	0,000
72h	6,748a±0,012	5,785b±0,106	6,734a±0,072	5,751b±0,012	0,000
96h	6,678a±0,007	5,721a±0,058	6,328a±0,7	5,691a±0,049	0,117

Tab. 44 : Cinétique de la densité optique de *Pseudomonas sp 3* sous l'effet des extraits de *Rosmarinus eriocalyx* et d'Hymexazole

D.O	EM	EA	Hymexazole	Témoin	P
48h	1,566ab±0,004	1,170a±0,034	1,333b±0,137	1,662ab±0,083	0,035
72h	0,486b±0,021	1,882a±0,235	0,95b±0,818	2,294a±0,067	0,001
96h	0,542d±0,002	1,755b±0,016	1,146c±0,005	2,157a±0,034	0,000

Tab. 45 : L'effet des extraits et du pesticide sur le pH du milieu de la culture *Pseudomonas sp 3*

pH	EM	EA	Hymexazole	Témoin	P
48h	6,783d±0,00	6,86b±0,00	6,92a±0,00	6,806c±0,004	0.000
72h	6,243c±0,07	6,711a±0,012	6,431b±0,002	6,704a±0,026	0.001
96h	6,093b±0,231	6,726a±0,033	6,526ab±0,136	6,716a±0,042	0,028

Tab 46: Cinétique de la densité optique de *Pseudomonas sp 4* sous l'effet des extraits de *Rosmarinus eriocalyx* et d'Hymexazole

D.O	EM	EA	Hymexazole	Témoin	P
48h	2,188a±0,103	1,682b±0,058	2,237a±0,037	2,378a±0,125	0,005
72h	2,306a±0,238	1,288b±0,048	1,423b±0,084	2,236a±0,058	0,003
96h	1,164b±0,058	1,711ab±0,014	1,715ab±0,281	2,287a±0,071	0,008

Tab. 47 : Cinétique de pH de *Pseudomonas sp 4* sous l'effet des extraits de *Rosmarinus eriocalyx* et d'Hymexazole

pH	EM	EA	Hymexazole	Témoin	P
48h	5,962b±0,037	6,755a±0,153	5,601b±0,021	5,606b±0,089	0.001
72h	6,106a±0,019	6,064a±0,016	6,093a±0,06	5,826b±0,009	0.003
96h	6,696a±0,019	6,593a±0,014	6,399b±0,065	5,733c±0,009	0,000

Tab. 48 : Cinétique de la densité optique de *Pseudomonas sp 5* sous l'effet des extraits de *Rosmarinus eriocalyx* et d'Hymexazole

D.O	EM	EA	Hymexazole	Témoin	P
48h	1,764b±0,123	2,119a±0,042	1,812b±0,024	1,074c±0,018	0,000
72h	0,729b±0,167	1,337a±0,12	0,786b±0,19	1,324a±0,159	0,033
96h	0,599b±0,024	1,612a±0,024	0,304b±0,130	1,49a±0,103	0,000

Tab.49 : Cinétique de la densité optique de *Pseudomonas sp 5* sous l'effet des extraits de *Rosmarinus eriocalyx* et d'Hymexazole

pH	EM	EA	Hymexazole	Témoin	P
48h	5,717c±0,041	5,461d±0,016	6,893a±0,038	6,559b±0,108	0,000
72h	6,544ab±0,139	6,231b±0,016	6,866a±0,108	6,342b±0,029	0,008
96h	6,654a±0,026	5,926c±0,028	6,814a±0,072	6,101b±0,021	0,000