



Université Mohamed Khider de Biskra
Faculté des sciences exactes et sciences de la nature et de la vie
Département des sciences de la nature et de la vie

MÉMOIRE DE MASTER

Domaine : Sciences de la nature et de la vie

Filière : Sciences biologiques

Spécialité : Microbiologie appliquée

Réf. :

Présenté et soutenu par :

Belkis AOUN

Le : mardi 9 juillet 2019

Thème

**Activité fongicide des huiles essentielles
*d'Artemisia herba-alba, Ocimum basilicum et
Mentha spicata* sur les champignons
phytopathogènes du pois et de la fève.**

Jury :

M.	Abdlhamid MOUSSI	MCA	Université de Biskra	Président
Mme.	Asma SAIDI	MAA	Université de Biskra	Examineur
M.	Tarek BENMEDDOUR	MCA	Université de Biskra	Rapporteur

Année universitaire : 2018 - 2019

Remerciements

Avant tout nous remercions ALLAH tout puissant de nous avoir accordé la force, le courage et la patience pour terminer ce mémoire.

Je remercie mon encadreur de son grand aide durant la réalisation de mon travail, il est orienté moi vers le succès avec ses connaissances et partageants des idées et aussi l'encouragement tout on long de mon épreuve, comme il a été présent à tout moment qu'on a besoin de lui :

Dr. BENMEDDOUR. Tarek

Sans oublier Tous les enseignants du département des Sciences Biologiques.

Je remercie les membres de jury, chacun a son nom, d'accepter de juger notre travail.

Mes remerciements les plus chaleureux s'adressent à mes parents **Hachmi et Safia**

Je souhaite remercier toutes les personnes qui, de près ou de loin, ont contribué à la réussite de mes études et à la réussite de ce travail.

Remercier tous ceux qui nous ont apporté une aide morale.

Dédicace

Je dédie ce travail :

A ma chère mère, qui n'a ménagé aucun effort pour m'encourager durant mes longues études. Qui a tout fait avec abnégation pour me voir réussir dans ce modeste travail de recherche. Une mère très adorable, d'un soutien infailible.

A mon cher père très compréhensible, qui s'est sacrifié pour nous voir grandir et baigner dans la réussite. Ses conseils, ses encouragements.

Espérant ces rêves escomptés.

A mes frères Wael, Soufyena et Abd salem

A mes sœurs Meriem, Yasmina, Soumia, Assya, Laila

A mes oncle Said et Ma tante Masouda et ses filles Khawla et Fatima

A toute la Famille Aoun chacun et chacune a apporté sa touche d'encouragement et de soutien.

A toute notre promotion et amies et surtout Fatma, Djihad, Souad, Amel, Aicha, Roza, Meriem, Anoir, Manel, Hafidha, Saliha, Farida, Latifa, Amina, Salima, Houda,

À tous mes amis en logement universitaire

« La vie a une fin comme une lumière de bougie s'éteint, mais dans le cœur les souvenirs sont à jamais ancrés »

AOUN Belkis

Table des matières

Liste des tableaux	I
Liste des figures	II
Introduction	1

Partie1 : Synthèse bibliographique

Chapitre 1. Généralités sur le pois et la fève, leur importances et leurs maladies

1.1. Généralités sur les deux plantes.....	3
1.2. Fève (<i>Vicia faba</i>)	3
1.2.1. Généralités	3
1.2.2. Intérêts cultureux de la fève	3
1.2.2.1. Intérêts agronomique.....	3
1.2.2.2. Intérêt alimentaire.....	3
1.3. Pois	4
1.4. Les principales maladies de la fève et du pois.....	4
1.4.1. Maladie de la fève	4
1.4.1.1. Maladies virales.....	4
1.3.1.2. Les maladies parasitaires.....	4
a) L'orobanche.....	4
b) Les nématodes	4
1.3.1.3. Maladies transmises par les insectes	4
a) Les pucerons	4
1.3.1.4. Les maladies fongiques	4
1.3.2. Les principes maladies des pois	6
1.3.2.1. Maladies virales	6
1.3.2.2. Maladies bactériennes	6
a) Graisse bactérienne du pois	6
1.3.2.3. Maladies transmises par les insectes	6
a) La sitone du pois (<i>Siton alineatus</i>)	6
1.3.2.4. Maladies fongiques	6

Chapitre 2. La lutte biologie et les plantes médicinales utilisés

2.1. La lutte biologique.....	8
2.2. Huiles essentielles.....	8
2.2.1. Définitions.....	8

2.2.2. Fonctions Biologiques	8
2.3. Les plantes utilisées	9
2.3.1. <i>Mentha spicata</i> (menthe verte)	9
2.3.1. Utilisation.....	9
2.3.2. <i>Ocimum basilicum</i>	9
2.3.1. Utilisations	9
2.3.3. <i>Artemisia herba alba</i>	9
2. 3.1. Utilisation.....	10

Partie 2 : Partie expérimentale

Chapitre 3. Matériel et méthodes

3.1. Matériel végétal	11
3.2. Préparation du matériel végétal et extraction des huiles essentielles	12
3.2.1. Séchage	12
3.2.2. Extraction	12
3.2.2.1. Conditions opératoires d'hydro distillation	13
3.3. Les champignons phytopathogènes	14
3.3.1. Echantillonnage.....	14
3.3.2. Culture des champignons	15
3.3.2.1. Stérilisation des échantillons infectés	15
3.3.2.2. Isolement sur milieu PDA et Sabouraud	16
3.4. Purification des colonies fongiques	16
3.5. Identification des isolats fongiques	16
3.5.1. Etude macroscopique	16
4.5.2. Etude microscopique.....	16
3 .6. Tests antifongiques	17
3.6.1. Méthode de contact direct	17
3.6.1.1. Principe de la méthode	17
3.6.2. Protocole expérimental	17
3.6.2.1. Préparation des milieux de culture contenant différentes concentrations d'huiles essentielles.....	17
3.6.2.2. Ensemencement et incubation	18
3.6.3. Paramètres étudiés	18
3.6.3.1. Evaluation de la croissance mycélienne.....	18

Chapitre 4. Résultats et discussion

4.1. Résultats.....	20
4.1.1. Paramètres organoleptiques des huiles essentielles	20
4.1.2. Rendements des huiles extraites	20
4.1.3. L'isolement des champignons.....	20
4.1.4. Purification et identification	21
4.1.5. Les tests de l'activité antifongique.....	23
4.1.5.1. Les diamètres des colonies dans les boîtes témoins et les boîtes traitées.....	23
a. L'effet des huiles essentielles sur les moisissures après 4 jour	23
b. L'effet des huiles essentielles sur les moisissures après 11 jours.....	27
4.1.5.2. Les taux calculés d'inhibition des moisissures	30
4.2. Discussion.....	36
Conclusion.....	38
Bibliographie.....	40
Résumés	

Liste des tableaux

Tableau 1. Les maladie fongiques et l'gent causale et les symptômes des fèves	5
Tableau 2. Les maladies fongiques et les symptômes des pois.....	6
Tableau 3. Les zones et les dates de récolte et le stade végétatif des trois plantes.	12
Tableau 4. La région et Echantillons des plantes (fève et pois) infestés par les champignons	15
Tableau 5. Caractéristiques organoleptiques des huiles essentielles des trois plantes.....	20
Tableau 6. Rendements calculés pour les trois huiles essentielles.....	20
Tableau 7. Photos des boites des 3 espèces fongiques sur PDA après 4 jours de croissance en absence (témoin) et en présence des huiles essentielles de <i>Mentha spicata</i> , <i>Ocimum basilicum</i> et <i>Artemisia herba-alba</i> à 1/2000.....	23
Tableau 8. Photos des boites de 3 espèces fongiques sur PDA après 4 jours de croissance en absence (témoin) et en présence des huiles essentielles de <i>Mentha spicata</i> , <i>Ocimum basilicum</i> et <i>Artemisia herba-alba</i> à 1/400.....	24
Tableau 9. Photos des boites de 3 espèces fongiques sur PDA après 11 jours de croissance en absence (témoin) et en présence des huiles essentielles de <i>Mentha spicata</i> , <i>Ocimum basilicum</i> et <i>Artemisia herba-alba</i> à 1/2000.....	27
Tableau 10. Photos des boites des 3 espèce fongiques sur PDA après 11 jours de croissance en absence (témoin) et en présence des huiles essentielles de <i>Mentha spicat</i> , <i>Osimum basilicum</i> et <i>Artemisia herba-alba</i> à 1/400.	28

Liste des figures

Figure 1. <i>Artemisia herba-alba</i>	11
Figure 2. <i>Ocimum basilicum</i>	11
Figure 3. <i>Mentha spicata</i>	12
Figure 4. Montage de type Clevenger	13
Figure 5. Les 2 plantes infectées, A (le pois) et B (la fève).	14
Figure 6. Des colonies des champignons obtenues sur PDA (7jours à 28 °C) isolées à partir de A (pois) et B (fève).....	21
Figure 7. Les caractères culturaux (macroscopiques) et (microscopiques) des champignons.	22
Figure 8. Effet des huiles essentielles d' <i>Ocimum basilicum</i> , <i>Mentha spicata</i> et <i>Artemisia herba-alba</i> sur les souches testés après 4 jours.....	26
Figure 9. Effet des huiles essentielles d' <i>Ocimum basilicum</i> , <i>Mentha spicata</i> et <i>Artemisia herba-alba</i>	30
Figure 10. L'effet des huiles essentielles des trois plantes sur la croissance de différentes moisissures après 2 jours d'incubation.....	31
Figure 11. L'effet des huiles essentielles des trois plantes sur la croissance de différentes moisissures après 3 jours d'incubation.	32
Figure 12. L'effet des huiles essentielles des trois plantes sur la croissance de différentes moisissures après 4 jours d'incubation.	33
Figure 13. L'effet des huiles essentielles des trois plantes sur la croissance de différentes moisissures après 8 jours d'incubation.	34
Figure 14. L'effet des huiles essentielles des trois plantes sur la croissance de différentes moisissures après 11 jours d'incubation.	35

Introduction

Les légumineuses (Fabaceae) présentent la troisième plus grande famille des angiospermes en termes de nombre d'espèces après Asteraceae et Orchidaceae (Nasim *et al.*, 2017). Les légumineuses sont des cultures vivrières importantes fournissant des sources hautement nutritives de protéines et des micronutriments qui peuvent grandement améliorer la santé et les moyens de subsistance, en particulier dans les pays en développement (Yahara *et al.*, 2013).

La fève (*Vicia faba* L.) est l'une des cultures importantes dans le monde. L'Afrique du Nord est l'une des régions les plus productrices de la fève dans le monde. Aujourd'hui, il existe des régions méditerranéennes considérées comme l'origine de ce légume, sa culture représente près de 25% de la superficie totale cultivée (Saxena, 1991). La fève est une légumineuse importante en raison de sa haute teneur en protéines et en amidon. Les fèves peuvent être cultivées dans différentes conditions climatiques. En Algérie, la fève occupe la première place parmi les légumineuses parce qu'elle est consommée à une grande échelle et a une haute valeur nutritionnelle.

Le pois (*Pisum sativum* L.) est un nutriment destiné pour l'alimentation humaine et animale. Il est caractérisé par de nombreux types d'usages, entant que légume, fourrage, conserve, usages non alimentaires ...etc. La production mondiale de pois protéagineux végétaux (verts) ne cesse de croître, elle a atteint 15,5 millions de tonnes en 2013, le principal producteur étant la Chine (FAO, 2015). An Algérie les conditions climatiques et du sol sont très favorables à sa culture, les wilayas productrices sont Macsar, Boumerdes, Biskra et Tlemcen.

Malheureusement, les cultures des pois et des fèves peuvent subir des ravages par une large gamme d'agents pathogènes comprenant des champignons, des bactéries, des virus, des insectes et des nématodes qui sont responsables de nombreuses maladies constituant un danger réel à ces cultures.

L'utilisation de beaucoup de produits chimiques, bien qu'ils soient efficaces, ils sont souvent nocifs à la santé et à l'environnement dont l'usage est de plus en plus restreint en raison de leur grande toxicité (Bhattacharya *et al.*, 2002). Pour faire face à cette problématique, il devient de plus en plus indispensable de remplacer ces produits chimiques par des produits qui respectent l'environnement (Schultz et Nicholas, 2000).

Les huiles essentielles des plantes ont déjà trouvé leur place en aromathérapie, en pharmacie, en parfumerie, en cosmétique et dans la préservation des aliments. Leur utilisation est liée soit à leurs larges spectres d'activités biologiques, soit à des ciblage très spécifiques (Cimanga et *al.*, 2002).

Les produits extraits des plantes aromatiques sont très utilisés à travers le monde dans différents domaines surtout celui de la médecine traditionnelle.

L'objectif de ce travail vise à démontrer tout d'abord les agents pathogènes des deux cultures (pois et fève).

Essayer de trouver des fongicides d'origine naturelle (surtout végétale) comme substances naturelles alternatives des produits chimiques utilisés dans le domaine de la phytopathologie.

Pour cela nous allons essayer d'évaluer l'activité inhibitrice des huiles essentielles de *Mentha spicata*, *Ocimum basilicum* et *Artemisia herba-alba* sur le développement mycélien des souches fongiques phytopathogènes isolées à partir des plantes infectées de la fève et du pois.

Ce travail est organisé en trois parties

- ✓ Le partie I : une synthèse bibliographique, qui rassemble des généralités sur la fève et le pois et leurs importances avec les maladies qui touches ces légumineuses, et sur les plantes médicinales utilisés.
- ✓ Partie II : une description des protocoles expérimentaux utilisés pour isoler, identifier les champignons phytopathogènes, extraction des huiles essentielles et les tests antifongiques.
- ✓ Partie III : est consacrée à la présentation des résultats obtenus et leurs discussions.

Partie1 : Synthèse Bibliographique

**Chapitre 1. Généralités
sur la fève et le pois, leurs
importances et leurs
maladies**

1.1. Généralités sur les deux plantes

Les légumineuses (Leguminosae) ou Fabaceae en classification phylogénétique regroupe parmi les plantes à fleurs, Cette famille est divisée en trois sous familles : Mimosoideae, Caesalpinioideae, et Papilionoideae (Doyle et Luckow, 2003).

La diversité de cette famille végétale qui comprend environ 20 000 espèces, offre des possibilités énormes d'exploitation (Gepts et *al.*, 2011). Les Papilionoideae regroupe les espèces cultivées les plus importantes économiquement comme, le soja, le haricot, le pois, la luzerne, l'arachide, le pois chiche et la fève (Lazrek-Ben-Friha, 2008). Selon Huignard et *al.* (2011), la culture de la fève s'accommode à tous les types de sols.

1.2. Fève (*Vicia faba*)

1.2.1. Généralités

La fève est de la famille Fabaceae (Reta Sanchez et *al.*, 2008). Elle est classée parmi les Légumineuses les plus anciennement cultivées, (Laumonnier, 1979). D'après (Mathon, 1985), elle est originaire des régions méditerranéennes du moyen-Orient. A partir de son centre d'origine, elle s'est propagée vers l'Europe, le long du Nil, jusqu'en Ethiopie et l'Inde. L'Afghanistan et l'Ethiopie.

1.2.2. Intérêts cultureux de la fève

Vicia faba L. est d'une importance incontestable, elle a deux intérêts.

1.2.2.1. Intérêts agronomiques

Elle contribue à l'enrichissement des sols en éléments fertilisants (Khaldi et *al.*, 2002). Ou jouent un rôle non négligeable dans l'enrichissement de sol en azote (Rechef et *al.*, 2005), avec son système racinaire puissant et dense elle améliore la structure du sol (Hamadache , 2003).

1.2.2.2. Intérêt alimentaire

Les graines de la fève utilisée pour la consommation humaine et animale ; Elle constitue un aliment nutritif très important surtout pour les populations à faible en revenus, qui ne peuvent pas toujours s'approvisionner en protéine d'origine animale. *Vicia faba* L. est une source de fibres solubles et insolubles, de glucides complexes, de vitamines (B9 et C) et de minéraux (en particulier le potassium, le phosphore, le calcium, le magnésium, le cuivre, le fer et le zinc) et elle a une teneur en protéine très élevée (Daoui, 2007).

1.3. Pois

Le pois (*Pisum sativum* L.) est une plante annuelle de la famille des fabaceae. (Pouvreau, 2004). Elle est l'une des cultures les plus anciennes au monde, comme il a d'abord été cultivé avec des céréales comme l'orge et le blé, Il y a 9000 ans (McPhee, 2003). C'est la culture indigène de la Syrie, Irak, Iran, Turquie, Jordanie, Ethiopie, Liban et a été cultivé en Europe pendant plusieurs milliers d'années. Le pois est l'un des aliments les plus importantes légumineuses dans le monde non seulement pour sa très vieille histoire.

1.4. Les principales maladies de la fève et du pois

1.4.1. Maladie de la fève

1.4.1.1. Maladies virales

Les principales maladies virales de la fève d'après (Kumari et VanLeur, 2011) sont :

- Le virus des taches de la fève (broad bean stain virus : BBSV) .
- Le virus jaune nécrotique de la fève (faba bean necrotic yellow virus : FBNYV).

1.3.1.2. Les maladies parasitaires

a) L'orobanche

La fève peut être parasitée principalement par 3 espèces d'orobanche: *Orobanche Crenata*, *Orobanche foetidaet* , *Phelipanche aegyptiaca* (Pérez-deluque et al.,2010).

b) Les nématodes

Le nématode des tiges (*Ditylenchus dipsaci*) cause un gonflement et une distorsion au niveau de la tige (Stoddard et al., 2010).

1.3.1.3. Maladies transmises par les insectes

a) Les pucerons

Les pucerons l'une des causes indirectes de forts dégâts occasionnés par les virus dont ils sont vecteurs (Maatougui, 1996).

1.3.1.4. Les maladies fongiques

Chaux et Foury (1994) a résumé les maladies fongiques et les symptômes des fèves dans le tableau1.

Tableau 1. Les maladies fongiques, agents causales et les symptômes des fèves.

Maladies	Agent causale	Symptomatologie
Mildion	<i>Peronospora viciae</i>	Cette maladie se caractérise par l'apparition sur la face inférieure des feuilles d'un duvet cotonneux gris ressemblant à une moisissure. Le duvet apparaît sous forme de taches et s'étend progressivement pour couvrir toute la face inférieure des feuilles. Sur la face supérieure de ces feuilles, des taches chlorotiques se forment.
Taches brunes ou (chocolat)	<i>Botryotinia fabae</i>	Cette maladie se manifeste, au début, sous forme de points de couleur brun rouge et de très petites taches circulaires brun clair entourées par une bordure rougeâtre, principalement sur feuilles et moins fréquemment sur tiges ; la maladie entre dans une phase «agressive» dans laquelle les taches deviennent des lésions coalescentes évoluant ensuite en pourriture brun foncé.
Alernariose	<i>Alternaria alternata</i>	Cette maladie se manifeste par des taches foliaires brun gris entourées par une bordure plus foncée et montrant à l'intérieur des cercles concentriques. Lorsque l'attaque est forte, ces taches s'étendent sur les feuilles et deviennent coalescentes.
Anthracnose ou (brûlure)		Cette maladie provoque sur les feuilles des taches plus ou moins irrégulières, d'abord de couleur brun foncé qui tournent ensuite vers le gris clair au centre entouré d'une marge plus foncée. Lorsque l'attaque est importante, les taches deviennent coalescentes. Ces taches apparaissent aussi sur tiges et gousses. Elles sont comparables à celles des feuilles mais généralement elles se creusent dans le tissu. Les

		graines peuvent également être atteintes.
Rouille		Cette maladie se caractérise par la formation sur les feuilles, de petites pustules légèrement allongées ou le plus souvent arrondies, d'abord ayant une couleur blanc rose, puis après éclatement de l'épiderme de la plante hôte, elles prennent une couleur brun roux. Elles sont, soit irrégulièrement dispersées, soit formant des cercles concentriques.

1.3.2. Les principales maladies des pois

1.3.2.1. Maladies virales

Selon Brink et Belay (2006), jaunisse apicale du pois (Jaunisse apicale du pois : PTYV)

1.3.2.2. Maladies Bactériennes

Selon Brink et Belay (2006),

a) Grosse bactérienne du pois

Pseudomonas syringae pypisi des taches huileuses sur les organes aériens, prennent une couleur brun clair sur les feuilles et les gousses.

1.3.2.3. Maladies transmises par les insectes

a) La sitone du pois (*Siton alineatus*)

Selon Racheff et al. (2005), ce sont des petits insectes très allongés de couleur grise.

1.3.2.4. Maladies fongiques

Brink et Belay (2006). En résumé les maladies et les symptômes des pois dans le tableau2.

Tableau 2. Les maladies fongiques et les symptômes des pois.

Maladie et agent responsable	Symptômes et dégâts
Champignons des organes aériens	
Anthracnose <i>-Ascochyta pisi</i>	Sur feuilles et gousses : taches nécrotiques brunes cernées d'un anneau brun foncé à pourpre ; centre clair avec ou sans présence de

<p>-<i>Ascochyta pinodes</i></p> <p>-<i>Ascochyta pinodella</i></p>	<p>ponctuations noires.</p> <p>→ Sur feuilles, tiges et gousses : criblures en tête d'épingle, noires ou brunes, cernées d'un halo clair Taches plus grandes à contour irrégulier. Le plus agressif et le plus fréquent.</p> <p>→ Sur feuilles et gousses, ponctuations Marron clair, bien délimitées. Sur jeunes plantes : nécrose du collet avec manchon brun violacé à la base des tiges.</p>
<p>Pourriture Gris</p> <p><i>Botrytis cinerea</i></p>	<p>Feutrage grisâtre dense pouvant se développer sur tous les organes aériens Dessèchement, chute des boutons floraux pourriture et chute des gousses.</p>
<p>Pourriture Blanche</p> <p><i>Sclerotinia sclerotiorum</i></p>	<p>Pourriture blanche à la base des tiges ; présence de <i>Sclerotinia sclérototes</i> noirs Flétrissement et destruction de la plante entière.</p>
<p>Mildiou</p> <p><i>Peronospora pisi</i></p>	<p>Les feuilles présentent alors des jaunissements sur la face supérieure et d'un duvet gris violacé sur la surface inférieure Sur gousse les symptômes extérieurs sont peu perceptibles (taches vert clair sans sporulation). Par contre à l'intérieur un mycélium blanc est bien visible. A Ce stade les grains sont tachés ou absents</p>
<p>Oïdium</p> <p><i>Erysiphe polygonif.sp pisi</i></p>	<p>De petites taches blanches et poudreuses qui colonisent d'abord les feuilles âgées Un mycélium blanc et pulvérulent se développe ensuite sur tous les organes aériens.</p>
<p>Rouille :</p> <p>-<i>Uromyc pisi</i></p> <p>-<i>Uromyces viciaecraccae</i></p> <p>-<i>Uromyces viciaefabae</i></p>	<p>Des pustules (sores) pulvérulents de couleur brun roux à noir apparaissent sur la face inférieure des feuilles et sur les tiges</p>

Chapitre 2. La lutte biologique et les plantes médicinales utilisées

2.1. La lutte biologique

La lutte biologique vise à contrôler les interactions entre les agents pathogènes et les facteurs biotiques ou abiotiques de l'environnement (Lepoivre ,1988).

Pour la lutte chimique en utilisant des fongicides, elle présente plusieurs inconvénients tels que les problèmes de pollution environnementale qui est aussi considérée comme un problème sérieux pour la santé humaine. De plus, l'utilisation de ces produits de synthèse peut stimuler la biosynthèse des mycotoxines et entraîner le développement des souches (Ahandagbe et *al.*,2014).

La recherche d'autres méthodes en prenant en considération d'autres critères que l'efficacité est devenue indispensable. La lutte biologique par l'utilisation de substances naturelles antibactériennes et antifongiques, peut constituer une alternative aux produits chimiques. Parmi ces substances naturelles, figurent les huiles essentielles extraites des plantes aromatiques (Maihebiau, 1994).

2.2. Huiles essentielles

2.2.1. Définitions

Plusieurs définitions des huiles essentielles sont disponibles. La définition donnée par (Afnor, 2000), est la suivante : < les huiles essentielles sont des produits obtenus à partir d'une matière première d'origine végétale, soit par entraînement à la vapeur d'eau, soit par des procédés mécaniques à partir de l'épicarpe des Citrus, soit par distillation sèche >.

Les huiles essentielles sont des extraits végétaux volatiles et odorants appelés également substances organiques aromatiques liquides, qu'on trouve naturellement dans diverses parties des arbres, des plantes et des épices, elles sont volatiles et sensibles à l'effet de la chaleur, elles ne contiennent pas de corps gras.

2.2.2. Fonctions Biologiques

Les huiles essentielles permettent aux plantes de s'adapter à leur environnement et assurer leur ultime défense, elles jouent plusieurs rôles écologiques :

- Interaction plante-plante (inhibition de la germination et de la croissance).
- Interaction plante animale, pour leur protection contre les prédateurs. (Fouché et *al.*, 2008)

2.3. Les plantes utilisées

2.3.1. *Mentha spicata* (menthe verte)

C'est une plante herbacée vivace de la Famille Lamiacées. Très odorante appelée en kabyle Nana et en arabe Habaq elma. Elle ne dépasse pas un mètre, elle est glabre et d'une couleur vert sombre. La tige est droite de section quadrangulaire, de couleur verte et d'une hauteur de 60 cm à 100 cm (Quezel et Santa, 1962).

2.3.1. Utilisation

Mentha Spicata a été utilisée traditionnellement pendant des siècles Comme plante médicinale pour : soigner les affections biliaires, la constipation et les maux de ventre, pour combattre la fièvre et les rhumatismes (Boukef, 1986). Les maladies gastro-intestinales et respiratoires, et comme carminatif, antispasmodique, diurétique et agents sédatifs (Snoussi et al., 2015).

2.3.2. *Ocimum basilicum*

Ocimum basilicum est une plante aromatique de la famille des Lamiacées. Elle est utilisée dans plusieurs domaines : cuisine, médecine, horticulture, ... etc. Les parties les plus utilisées sont les feuilles et les graines (Arabaci et Bayram, 2004).

2.3.1. Utilisation

Utilisé dans la médecine traditionnelle pour le traitement des crampes d'estomac, de diarrhées et d'angine...etc. (Saliou, 2012). Les feuilles et les fleurs de *Ocimum basilicum* sont utilisées dans la médecine populaire comme tonique et vermifuge, en outre, le thé de cette plante est également décrit comme un traitement contre la dysenterie, la nausée et la flatulence. Les huiles de cette plante est bénéfique pour le soulagement des spasmes rhinite, la fatigue mentale, ainsi, comme un traitement de premiers soins pour les piqûres de guêpes et morsures de serpent (Mueen et al., 2015).

2.3.3. *Artemisia herba-alba*

Artemisia herba-alba (Nom vernaculaire : armoise blanche en Français, Chih en arabe) est une plante herbacée de la famille Asteraceae à tiges ligneuses et ramifiées vivace de 30-50 cm de long. Elle se distingue par une odeur caractéristique d'huile de thymol et un goût amer d'où son caractère astringent (Nabli, 1989).

2. 3.1. Utilisation

Plusieurs extraits et huiles essentielles montraient un certain nombre d'activités biologiques telles que antihyperglycemique, antimicrobien, antioxydant et anti-inflammatoire.

En outre, quelques espèces du genre sont fréquemment utilisées pour le traitement de certaines maladies telles que la malaria, l'hépatite, le cancer et les infections par des champignons, des bactéries, et des virus (Yashphe et *al.*, 1987).

Partie 2 : Partie expérimentale

Chapitre 3. Matériel et méthodes

3.1. Matériel végétal

Nous avons utilisé *Artemisia herba-alba* (figure 1), *Ocimum basilicum* (figure 2) et *Mentha spicata* (figure 3) pour extraire les huiles essentielles, et les tester sur quelques champignons phytopathogènes de la fève et du pois. Les zones et les dates de récolte ainsi le stade végétatif de chaque plante sont présentés dans le tableau 3.



Figure 1. *Artemisia herba-alba*



Figure 2. *Ocimum basilicum*



Figure 3. *Mentha spicata*

Tableau 3. Les zones, les dates de récolte et le stade végétatif des trois plantes.

Espèce	Date de récolte	Stade végétatif	Site de récolte
<i>Artemisia herba-alba</i>	13 mars 2019	Plante avec feuilles vertes sans fleurs	Ain zaâtot à Biskra
<i>Mentha spicata</i>	3 mars 2019	Plante avec feuilles vertes et fleurs	Zeribet Hamed à Biskra
<i>Ocimum basilicum</i>	4 mars 2019	Plante avec feuilles vertes sans fleurs	

3.2. Préparation du matériel végétal et extraction des huiles essentielles

3.2.1. Séchage

Le séchage des plantes se fait à l'air libre, à l'ombre dans un endroit sec et aéré, à l'abri de la chaleur et de la lumière.

3.2.2. Extraction

L'extraction des huiles essentielles a été réalisée par hydrodistillation suivant la méthode d'entraînement à la vapeur d'eau on utilisant un appareil de type Clivenger (fig. 4) on a effectué l'extraction sans prétraitement, la distillation s'opère sur les feuilles (et fleurs) sèches.

3.2.2.1. Conditions opératoires d'hydrodistillation

L'étude est réalisée dans sa totalité à l'échelle du laboratoire sur un montage de type « Clevenger » (fig. 4). Ce montage se compose de quatre parties principales :

- Le réacteur, un ballon dans lequel on introduit la matière végétale et l'eau.
- La colonne, un cylindre en verre placé au-dessus du réacteur qui recueille la phase vapeur.
- Le réfrigérant dans lequel se condensent les vapeurs.
- L'ampoule à décantation, où l'huile se récupère en deux phases, l'un est la phase organique (huile essentielle) et l'autre la phase aqueuse (hydrolat).

Le milieu réactionnel constitué par la matière végétale et l'eau de robinet est porté à l'ébullition grâce à un chauffe-ballon. Une fois, l'ébullition s'effectue les cellules éclatent et se commencent à dégager leurs contenus en huiles essentielles, qui par la suite transportent avec le vapeur d'eau jusqu'à le réfrigérant, et après la condensation dans ce dernier l'huile se rassemble dans une ampoule à décantation.



Figure 4. Montage de type Clevenger

3.2.2.2. Détermination des rendements en huiles essentielles

Le rendement est défini comme étant le rapport entre la masse de l'huile essentielle obtenue et la masse du matériel végétal utilisé pour cent. Après récupération des huiles

essentielles (Afnor, 2000), le rendement est exprimé en pourcentage (%) et calculé par la formule suivante :

$$\text{RHE}\% = (\text{mh} / \text{mv}) \times 100$$

RHE = rendement en huile essentielle en %.

mh =masse d'huiles essentielles récupérées en gramme (g).

mv = masse d'essai du matériel végétal en gramme (g) (Selvakumar *et al.*, 2012).

3.3. Les champignons phytopathogènes

3.3.1. Echantillonnage

Dans le cadre des prospections pour la réalisation de ce mémoire, des sorties ont été réalisées au mois de février 2019. Des champs de culture de la fève et du pois (fig.5) situés à la région de Zeribet Hamed (Wilaya Biskra), ont été explorés afin de repérer les éléments infectés par des champignons et récupérer des échantillons des plantes (fèves et pois) infestées.

Les échantillons des plantes (fève et pois) infestés par les champignons (à partir des parcelles cultivées Zeribet Hamed à Biskra, durant le mois de février 2019) sont représentés en tableau 4.



A : le pois

B : La fève

Figure 5. Les 2 plantes infectées, A (le pois) et B (la fève).

Tableau 4. Echantillons et région des plantes (fève et pois) infestés par les champignons.

Région		Échantillon	
Zeribet Hamed à Biskra	Fèves	gousse	
		Feuilles	
	Pois	Gousse	
		Feuilles	

3.3.2. Culture des champignons

On a utilisé le milieu PDA (potato- dextrose –agar).

3.3.2.1. Stérilisation des échantillons infectés

Les échantillons que ce soit de la fève ou le pois (feuille, gousse, graine) sont :

- ✓ Rincés les échantillons par l'eau de robinet.
- ✓ Désinfectées par l'eau javèle dilue 2% pendant 1min.
- ✓ Rincées 2 à 3 fois par l'eau distillée stérile, puis elles sont mises en papier absorbant stérile devant le bec Bunsen (zone stérile).
- ✓ Laissés sécher, découper les régions altérées.

3.3.2.2. Isolement sur milieu PDA

Couler le milieu PDA et Sabouraud, dans les boîtes de Pétri. Lorsque le milieu est solidifié, les pièces altérées sont levées aseptiquement par une pince stérile à chaque fois passé sur la flamme du bec Bunsen et répartis à raison de 5 pièces par boîte avec quatre répétitions. On ferme les boîtes aseptiquement en utilisant le para film. Les boîtes sont incubées à une température de 25°C, avec un suivi de croissance toutes les 24 h pendant 3 jours (Zehhar et *al.*, 2006).

3.4. Purification des colonies fongiques

Les isolats obtenus sont purifiés par un repiquage successif, qui consiste à transférer aseptiquement le microorganisme sur un milieu stérile pour l'isoler ou le maintenir en culture pure, il convient de prélever avec une anse stérile quelques spores ou un fragment mycélien et le transférer dans un milieu neuf (Botton et *al.*, 1999).

3.5. Identification des isolats fongiques

L'identification des champignons est effectuée par deux techniques classiques :

- Une étude macroscopique
- Une étude microscopique.

3.5.1. Etude Macroscopique

- Cette étude est basée sur l'observation des colonies à l'œil nu et à la loupe binoculaire. L'observation des caractères porte sur :

- L'aspect de la colonie (couleur de la surface et du revers de la boîte, texture de la surface des colonies, topographie...). Présence ou absence de gouttelettes sur le mycélium
- Production de pigment diffusible
- Vitesse de croissance (diamètre de la colonie à 7 jours : rapide ≥ 3 cm ; modérée : entre 1 et 3 cm et lente ≤ 1 cm) (Cahagnier, 1998) et (Guillaume, 2006).

4.5.2. Etude Microscopique

L'identification des champignons nécessite l'observation au microscope optique est basée sur les critères d'identification microscopique réalisés par Botton (1990) et quand c'est possible à identifier. Pour cela, et à l'aide d'une anse de platine stérile on prélève superficiellement un fragment de la culture que l'on dépose sur une lame. Le frottis ainsi

préparé est ensuite coloré par le lactophénol ou l'acide lactique. Ensuite la lame est recouverte d'une lamelle, puis observée au microscope optique à un grossissement G X 40. L'observation des caractères porte sur :

Hyphes : septés ou non, c'est-à-dire cloisonnés ou non

Conidiophores : absents, simples, ramifiés

Cellules conidiogènes : annellide, phialide...

Conidies : uni- ou pluricellulaires, solitaires, en amas ou en chaînes, forme (ronde, ovale, en massue.)

3.6. Tests antifongiques

Les méthodes du laboratoire qui permettent d'estimer les propriétés d'un produit in vitro sont nombreuses, mais reposent toutes sur le même principe, celui de confronter la substance antimicrobienne (fongicide, bactéricide, insecticide,...) et l'agent pathogène (champignons, bactéries, insectes,...) sur un support artificiel.

3.6.1. Méthode de contact direct

La méthodologie qu'on a suivi pour l'évaluation de l'effet antifongique de l'huile essentielle extraite des feuilles *Mentha spicata*, *Ocimum basilicum*, *Artemisia herba-alba*, est la méthode de contact direct qui permet la mise en évidence de l'activité antifongique (fongistatique ou fongicide) des trois extraits selon Tantaoui et *al.* (1992).

3.6.1.1. Principe de la méthode

L'huile essentielle à tester est incorporée à des concentrations variables dans le milieu de culture gélosé. Après solidification, le milieu estensemencé et incubé

3.6.2. Protocole expérimental

3.6.2.1. Préparation des milieux de cultures contenant différentes concentrations d'huiles essentielles

Dans des tube à hémolyse, à l'aide des micropipettes nous ajoutons des volumes des concentrations 1/400 et 1/2000 d'huiles essentielles aux milieux PD (un bouillon) pour préparer un volume de 2 ml ; puis agités. Chaque suspension a été ajouté immédiatement à des flacons contenant 198 ml de PDA (stérile et + 60 C °) ; agité bien pour assurer une répartition homogène de l'huile essentielle.

Ces concentrations sont préparées de la façon suivante :

- Milieu 1(Témoin) : 100 ml PDA + sans huile essentielle.
- Milieu 2: 198 ml PDA + 500µl HE + 20ml PD.
- Milieu 3: 198 ml PDA + 100µl HE + 20ml PD.

3.6.2.2. Ensemencement et incubation

Le mélange de chaque milieu, est coulé à raison de 5,5 ml dans des boîtes de Pétri de 60mm de diamètre. A l'aide d'un pipete pasteur stérile, nous découpons un fragment de culture fongique d'environ 0,6 cm de diamètre à partir d'un tapis mycélien jeune, est déposé au centre de la boîte de pétri. Nous opérons de la même façon pour chaque champignon et chaque concentration d'huile essentielle, les boîtes de Pétri sont ensuite fermées hermétiquement par le para film et incubées à 25°C, pendant 7 jours.

3.6.3. Paramètres étudiés

3.6.3.1. Evaluation de la croissance mycélienne

Dans cette étude, on a tenté de comparer l'influence, des trois huiles essentielles appartenant à des familles de plantes différentes, sur la croissance mycélienne. Dans le but d'estimer l'évolution de la croissance mycélienne qui est effectuée quotidiennement, par la mesure du diamètre de la colonie mycélienne du champignon. Cette lecture est toujours réalisée en comparaison avec celles des témoins, qui sont démarrés dans les mêmes conditions et le même jour du test. Toute pousse même légère de chaque champignon sera considérée comme action négative c'est-à-dire que l'huile essentielle en question n'est pas inhibitrice vis-à-vis de la croissance fongique.

3.6.3.2. Taux d'inhibition (TI%)

D'après Doumbouya et *al.* (2012) les taux d'inhibition de la croissance par rapport au témoin, sont ensuite calculés selon la formule suivante :

$$TI(\%)=100 \times (dC-dE)/dC$$

TI(%) = Taux d'inhibition exprimé en pourcentage.

dC = Diamètre de colonies dans les boîtes – ddi (mm).

dE = Diamètre de colonies dans les boîtes contenant l'extrait de plante – ddi (mm).

ddi = Diamètre de disc initiale.

Chapitre 4. Résultats et discussion

4.1. Résultats

4.1.1. Paramètres organoleptiques des huiles essentielles

Les paramètres organoleptiques des huiles essentielles obtenues par hydro distillation des trois plantes portant sur leur aspect, la couleur, l'odeur sont résumés dans le (tab.5).

Tableau5. Caractéristiques organoleptiques des huiles essentielles des trois plantes.

Origine d'huile essentielle	Couleur	Odeur	Aspect
<i>Mentha spicata</i>	Jaune claire	Forte odeur (agréable)	Liquide limpide
<i>Ocimum basilicum</i>	Jaune foncé	Forte odeur (agréable)	Liquide limpide
<i>Artemisia herba-alba</i>	Jaune claire	Forte odeur (agréable)	Liquide limpide

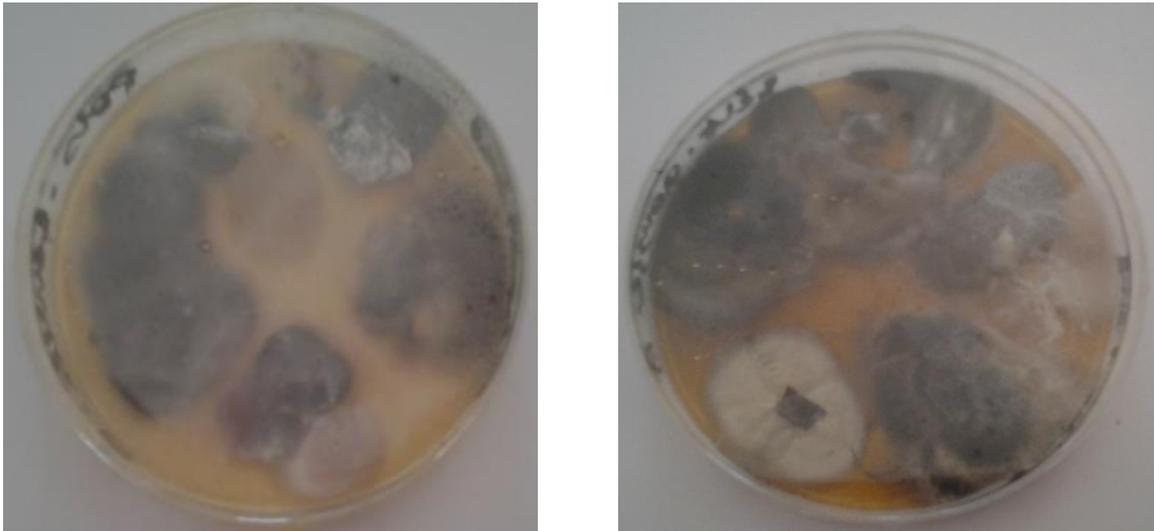
4.1.2. Rendements des huiles extraites (tab. 6)

Tableau 6. Rendements calculés pour les trois huiles essentielles.

Espèces	Quantité de la biomasse (en g)	Quantité d'huile essentielle (en g)	Rendement (%)
<i>Ocimum basilicum</i>	303 ,8	6	1,97
<i>Mentha spicata</i>	293,7	2,8	0,93
<i>Artemisia herba-alba</i>	542,8	1,5	0,27

4.1.3. L'isolement des champignons

Les champignons pathogènes isolés à partir d'échantillons infectées des parties aériennes de la fève et de pois ont montré une hétérogénéité, plusieurs colonies de différents caractères cultureux ont été obtenues après culture sur PDA (7 jours à 28 °C) (figure 6). Les champignons recherchés (cibles) sont obtenus à partir de ces cultures.



A : Pois

B : Fève

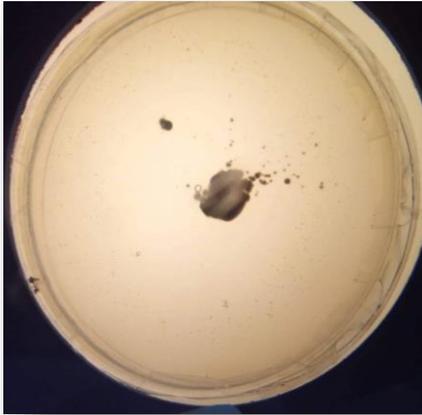
Figure 6. Des colonies des champignons obtenues sur PDA (7jours à 28 °C) isolées à partir de A (pois) et B (fève) les champignons isolés.

4.1.4. Purification et identification

L'étape précédente nous a permis d'obtenir une boîte de pétri qui contient des groupes très variés en microorganismes isolés. C'est pour ce là vient l'étape de la purification pour assurer l'homogénéité de la culture. On a arrivé à purifié trois champignons cibles *Botrytis cinerea*, *Erysiphe pisi* et *Aschochyta pisi* (figure 7), pour faire le test biologique.

Macroscopique

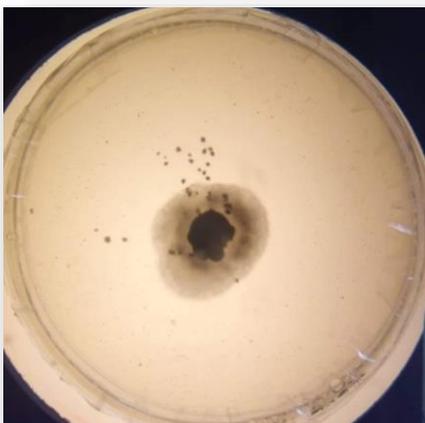
Microscopique



A



B



C

Figure 7. Les caractères cultureux (macroscopiques) et (microscopiques) des champignons. A : *Botrytis cinerea* , B : *Erysiphe pisi*, C : *Aschochyta pisi*

4.1.5. Les tests de l'activité antifongique

4.1.5.1. Les diamètres des colonies dans les boîtes témoins et les boîtes traitées

Les résultats sont présentés selon deux périodes, les premiers jours du développement des moisissures (après 4 jours) et la fin de la période d'incubation (après 11 jours).

Les figure8 et9 (histogrammes) regroupe le dispositif expérimental global (l'effet des trois huiles avec deux dilutions sur les trois moisissures. Les tableaux (7, 8) et (9,10) représentent chaque dilution à part à la période correspondante.

a. L'effet des huiles essentielles sur les moisissures après 4 jours

Tableau7.Photos des boîtes des 3 espèces fongiques sur PDA après 4 jours de croissance en absence (témoin) et en présence des huiles essentielles de *Mentha spicata*, *Ocimum basilicum* et *Artemisia herba-alba* à 1/2000

		Les espèces fongiques		
		<i>Botrytis cinerea</i>	<i>Erysiphe pisi</i>	<i>Aschochyta pisi</i>
Témoin				
				
Artemisia herba-alba				

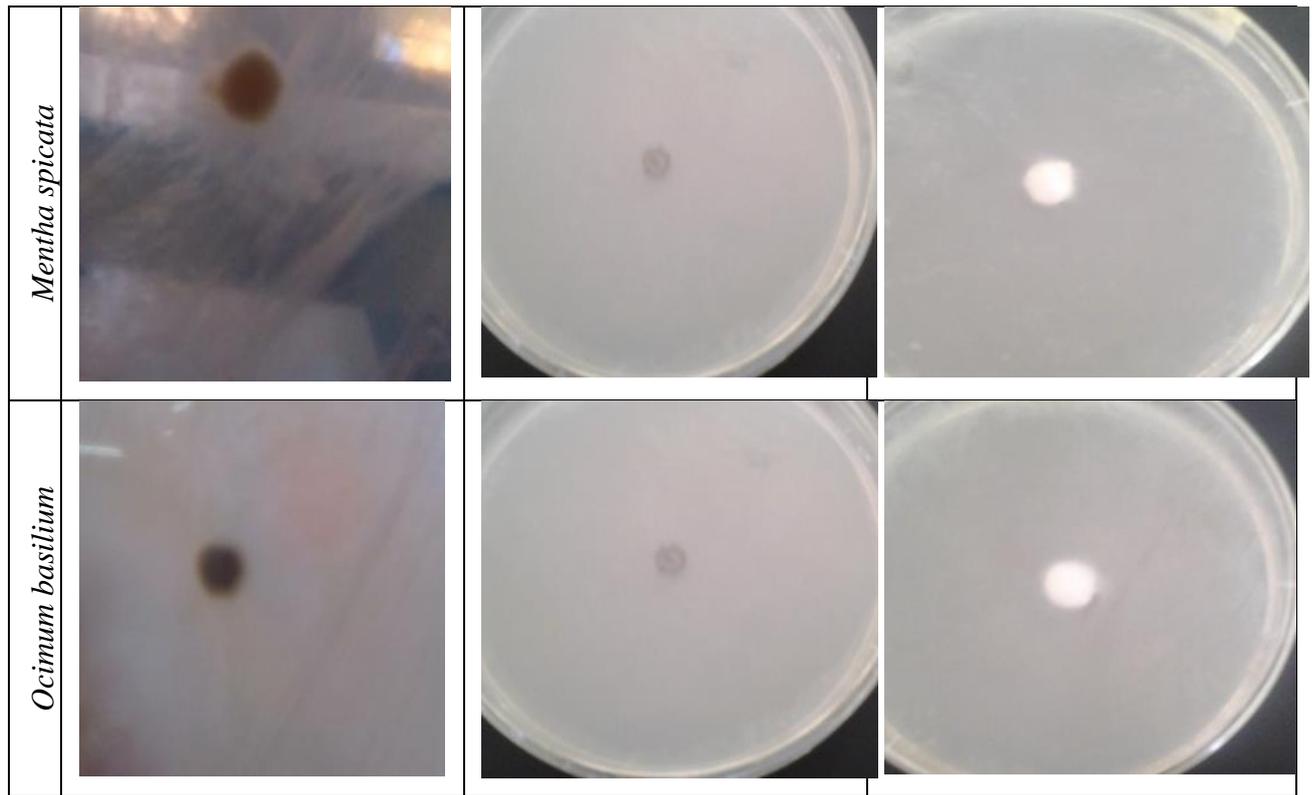
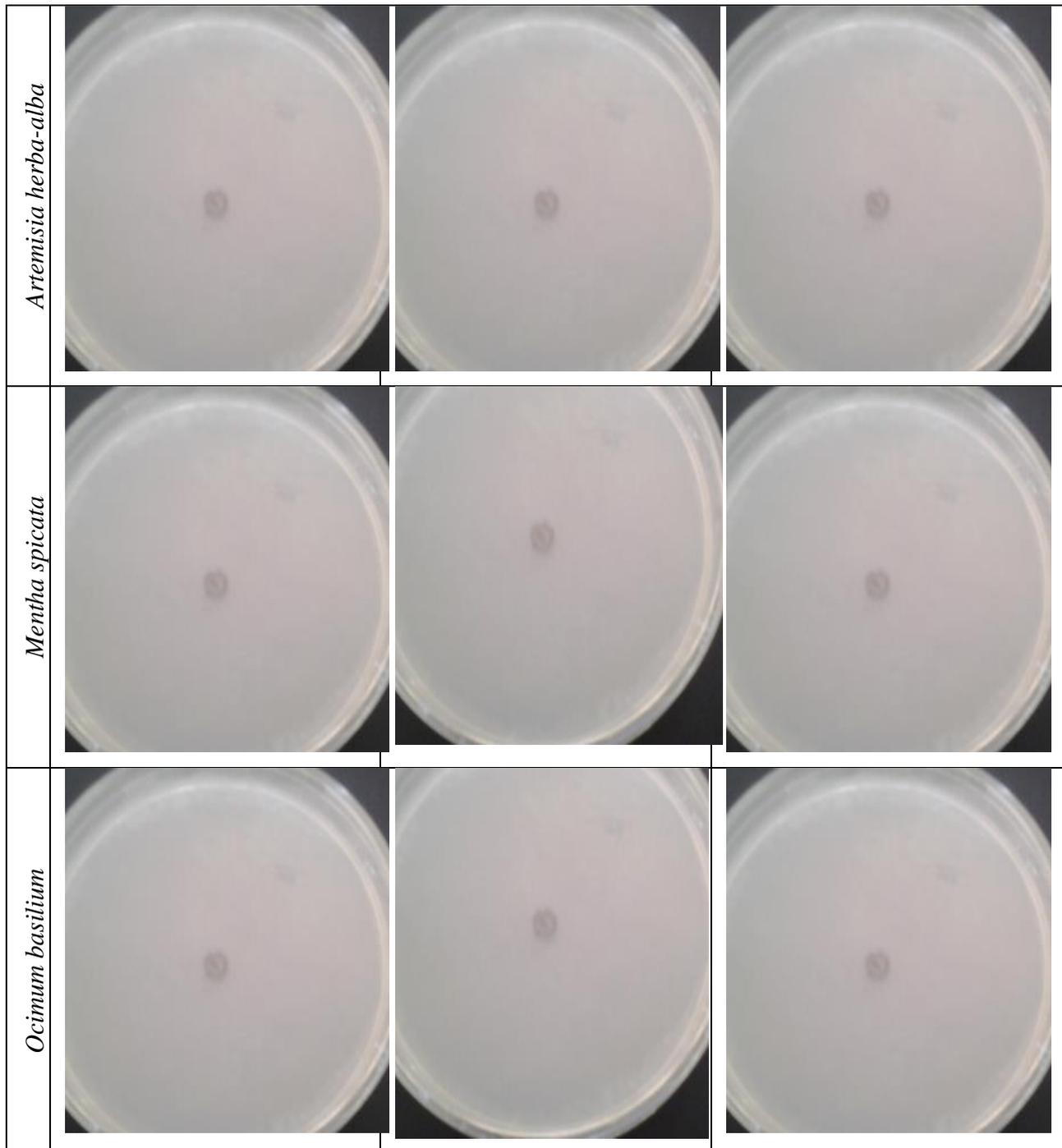


Tableau 8. Photos des boîtes de 3 espèces fongiques sur PDA après 4 jours de croissance en absence (témoin) et en présence des huiles essentielles de *Mentha spicata*, *Ocimum basilicum* et *Artemisia herba-alba* à 1/400.

Les espèces fongiques			
	<i>Botrytis cinerea</i>	<i>Erysiphe pisi</i>	<i>Aschochyta pisi</i>
Témoin			



Les diamètres de croissance mycélienne des différentes moisissures sont représentés dans les histogrammes (figure 8 et 9). Il faut noter que le diamètre initial du disque déposé dans chaque boîte de Pétri est 0,6 cm, donc si le diamètre augmente au de la de cette valeur on considère qu'il y'a une croissance, sinon le diamètre = 0,6 indique l'absence totale de croissance.

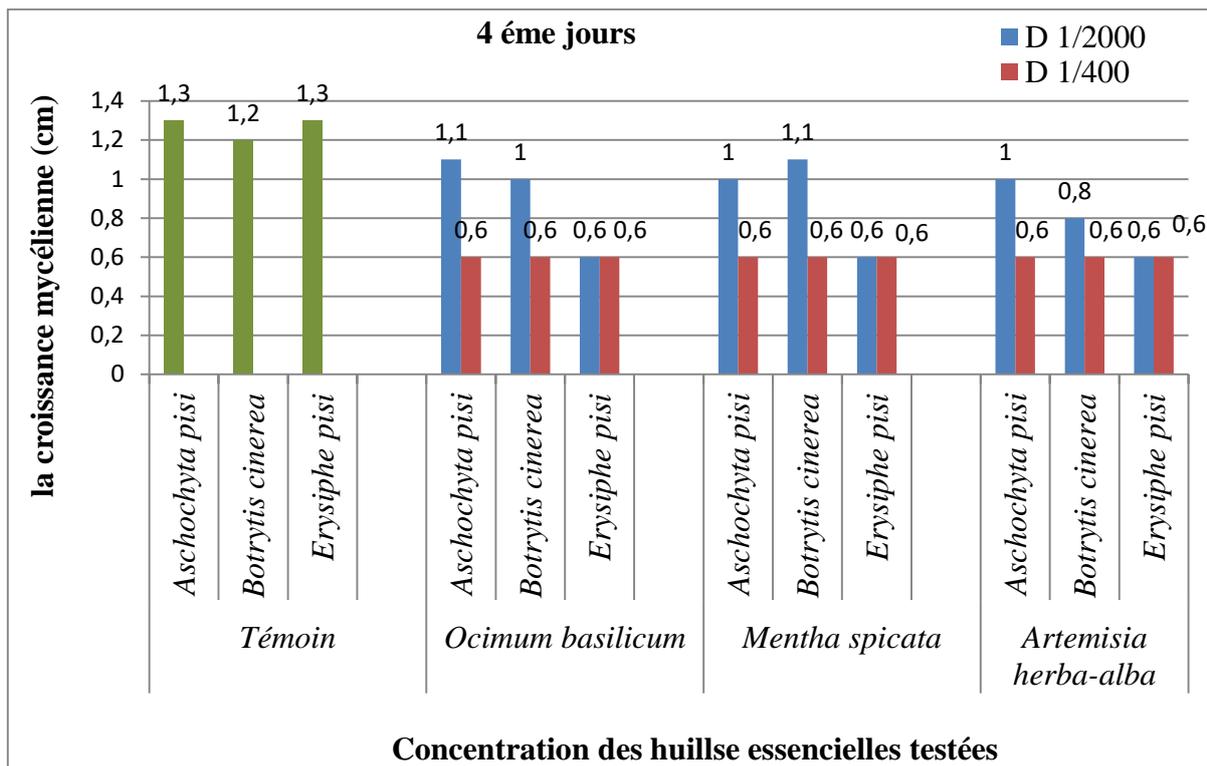
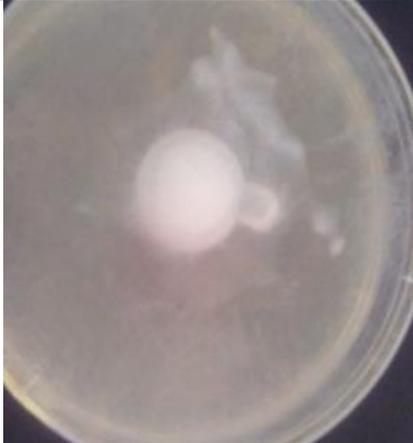
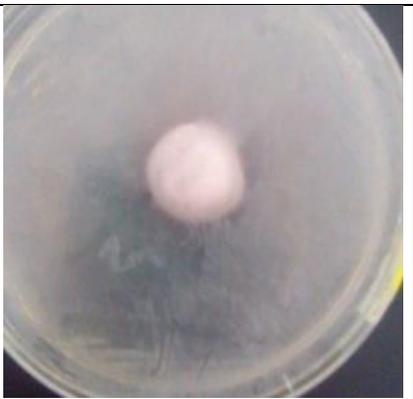


Figure 8. Effet des huiles essentielle d'*Ocimum basilicum*, *Mentha spicata* et *Artemisia herba-alba* sur les souches testées après 4 jours.

La figure 8 et les tableaux (7,8) montre que la concentration 1/2000 des huiles essentielles inhibe seulement l'espèce *Erysiphe pisi* (l'inhibition est totale diamètre = 0,6), par rapport au témoin (diamètre > 1,2 cm) on remarque que les diamètres de croissance des deux autres espèces fongiques (*Aschochyta pisi* et *Botrytis cinerea*) sont inférieurs à 1,1 cm. A la concentration élevée (1/400) les trois espèces fongiques sont inhibées totalement.

b. L'effet des huiles essentielles sur les moisissures après 11 jours

Tableau9. Photos des boîtes de 3 espèces fongiques sur PDA après 11 jours de croissance en absence (témoin) et en présence des huiles essentielles de *Mentha spicata*, *Ocimum basilicum* et *Artemisia herba-alba* à 1/2000.

	Les espèces fongiques		
	<i>Botrytis cinerea</i>	<i>Erysiphe pisi</i>	<i>Aschochyta pisi</i>
Témoin			
<i>Artemisia herba-alba</i>			
<i>Mentha spicata</i>			

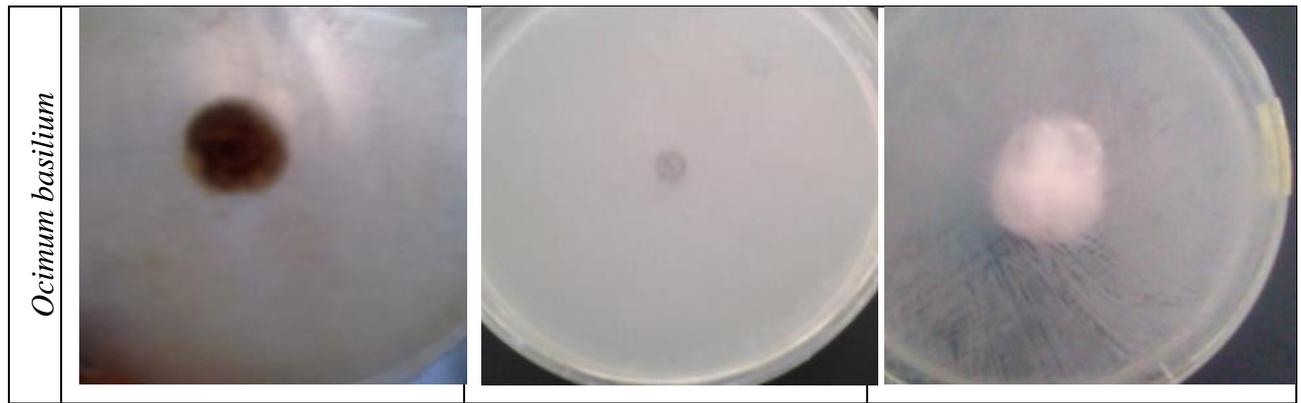
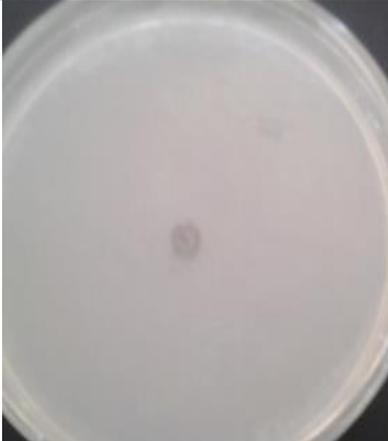
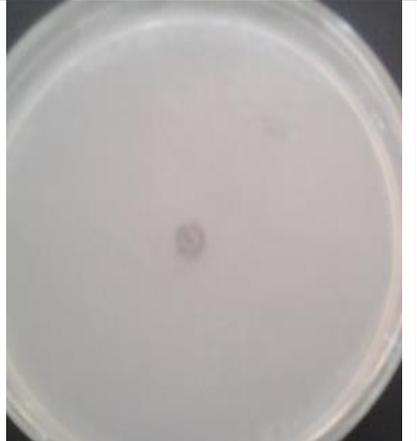
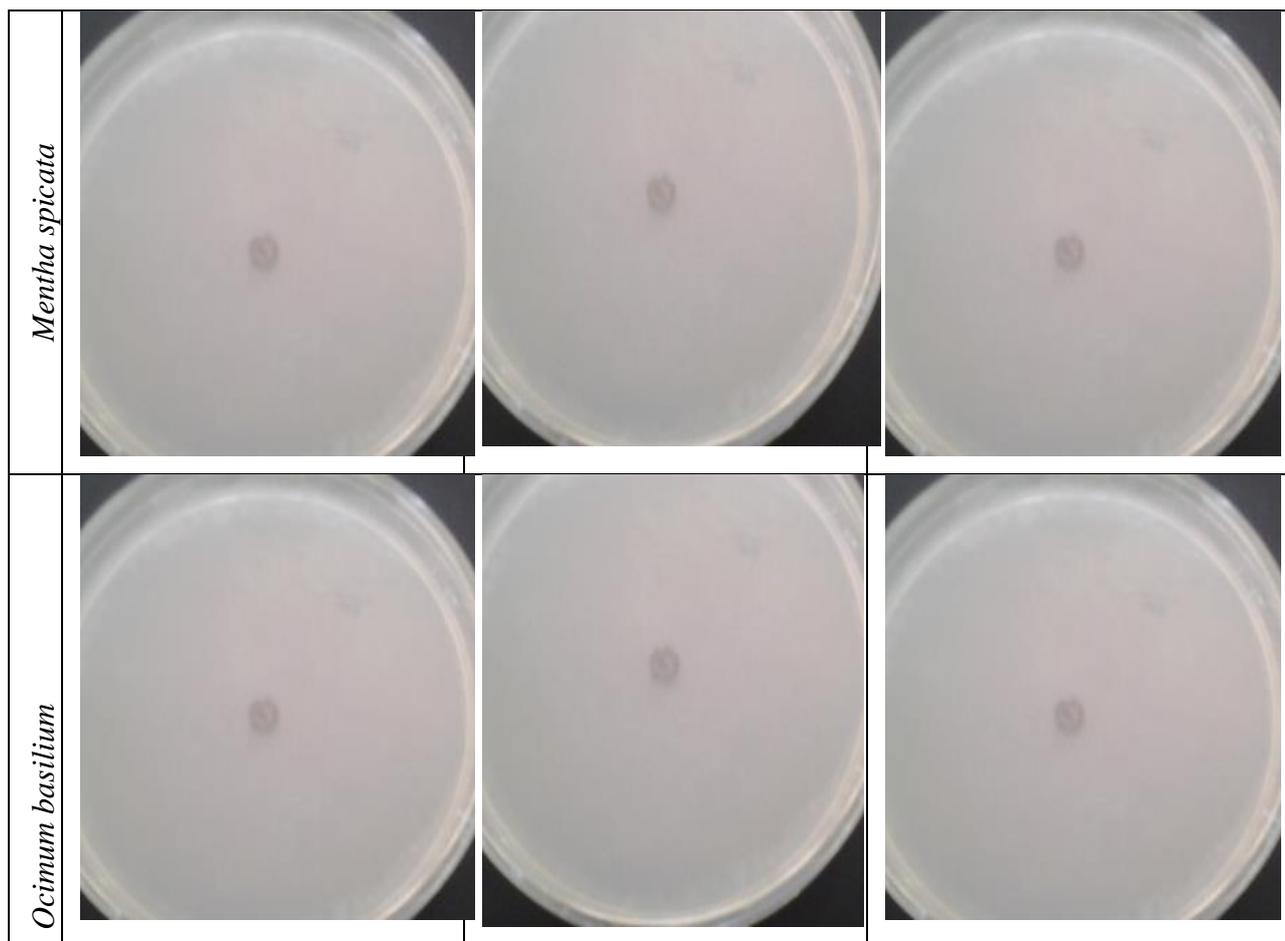


Tableau10. Photos des boîtes des 3 espèces fongiques sur PDA après 11 jours de croissance en absence (témoin) et en présence des huiles essentielles de *Mentha spicata*, *Ocimum basilicum* et *Artemisia herba-alba* à 1/400.

		Les espèces fongiques		
		<i>Botrytis cinerea</i>	<i>Erysiphe pisi</i>	<i>Aschochyta pisi</i>
Témoin				
<i>Artemisia herba-alba</i>				



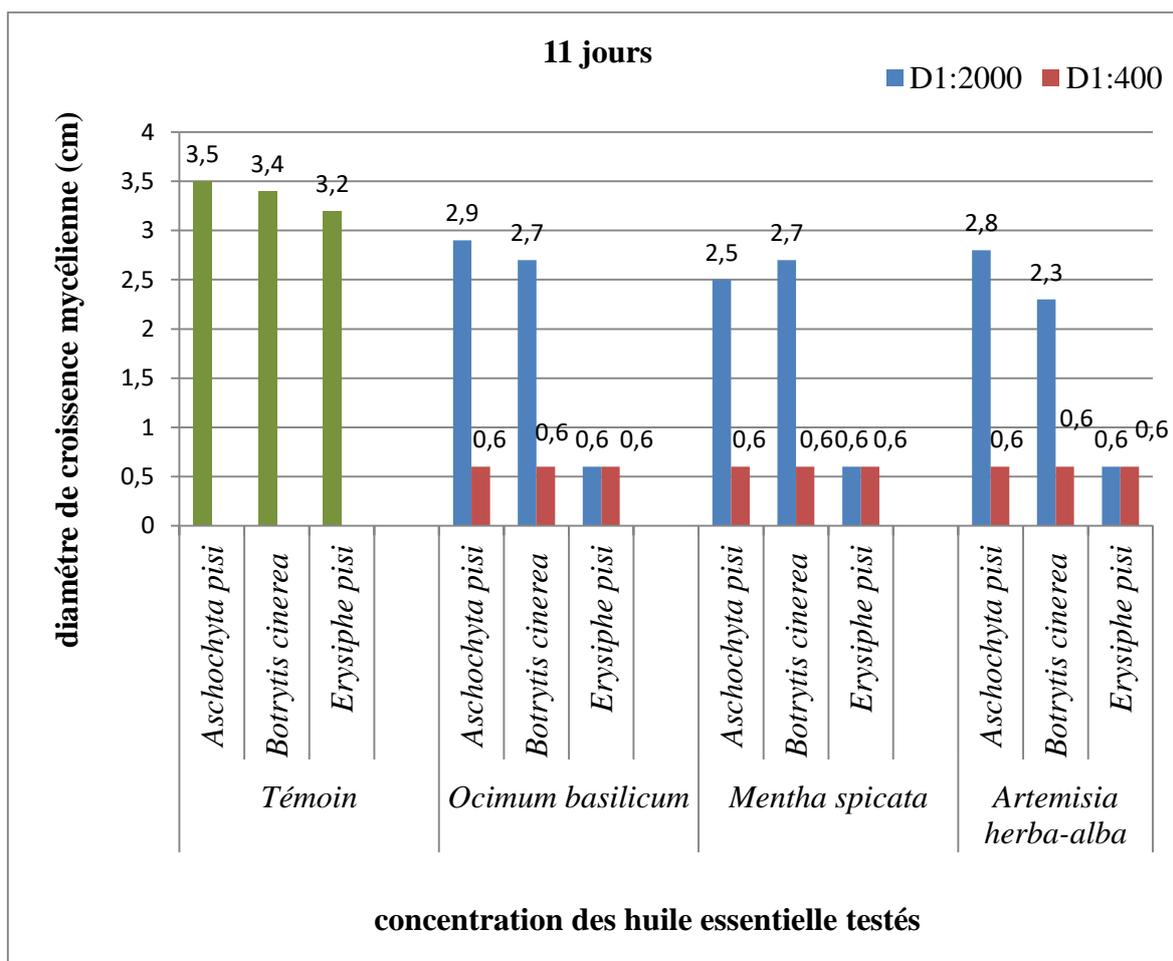


Figure 9. Effet de huiles essentielles d'*Ocimum basilicum*, *Mentha spicata* et *Artemisia herba-alba* .

D'après la figure 9 et les tableaux (9 et 10) on remarque que la concentration élevée (1/400) des huiles des trois plantes inhibe totalement les trois espèces fongiques. La concentration faible (1/2000) inhibe seulement d'une façon totale l'espèce *Erysiphe pisi* (diamètre = 0,6), par rapport au témoin, où les diamètres de croissance dépassent 3,2 cm, les diamètres de croissance des deux autres espèces fongiques (*Aschochyta pisi* et *Botrytis cinerea*) ne dépassent pas (2,9 cm) ce qui explique l'effet inhibiteur des huiles.

4.1.5.2. Les taux calculés d'inhibition des moisissures

Dans cette partie, les résultats sont présentés sous forme d'histogrammes pour 2, 3, 4, 8 et 11 jours des tests à l'exception des weekends.

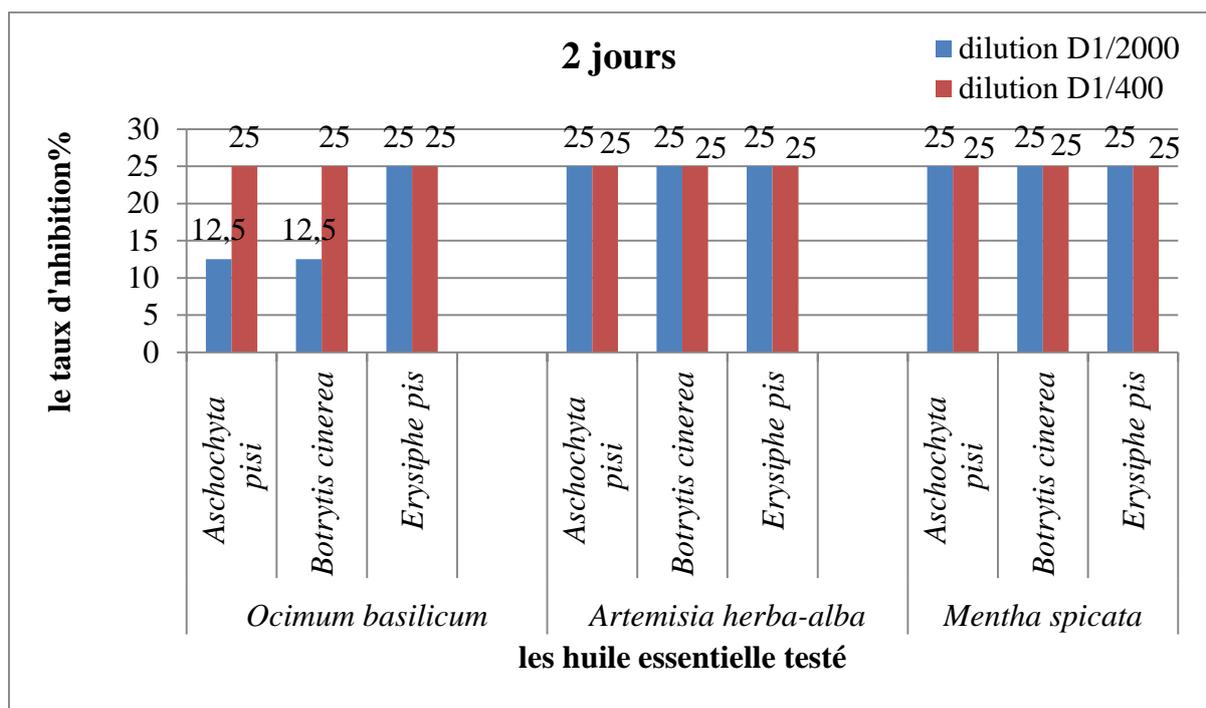


Figure 10. L'effet des huiles essentielles des trois plantes sur la croissance de différentes moisissures après 2 jours d'incubation.

Après 1 jour d'incubation, on n'observe aucune inhibition totale aux 2 concentrations testées, l'activité inhibitrice la plus haute dans ce cas est de (25%) des 3 espèces fongiques ; la plus faible valeur est égal à (12,5%), elle est notée pour les deux espèces fongiques (*Aschochyta pisi* et *Botrytis cinerea*) à la dilution 1/2000 de l'huile essentielle de *Ocimum basilicum*.

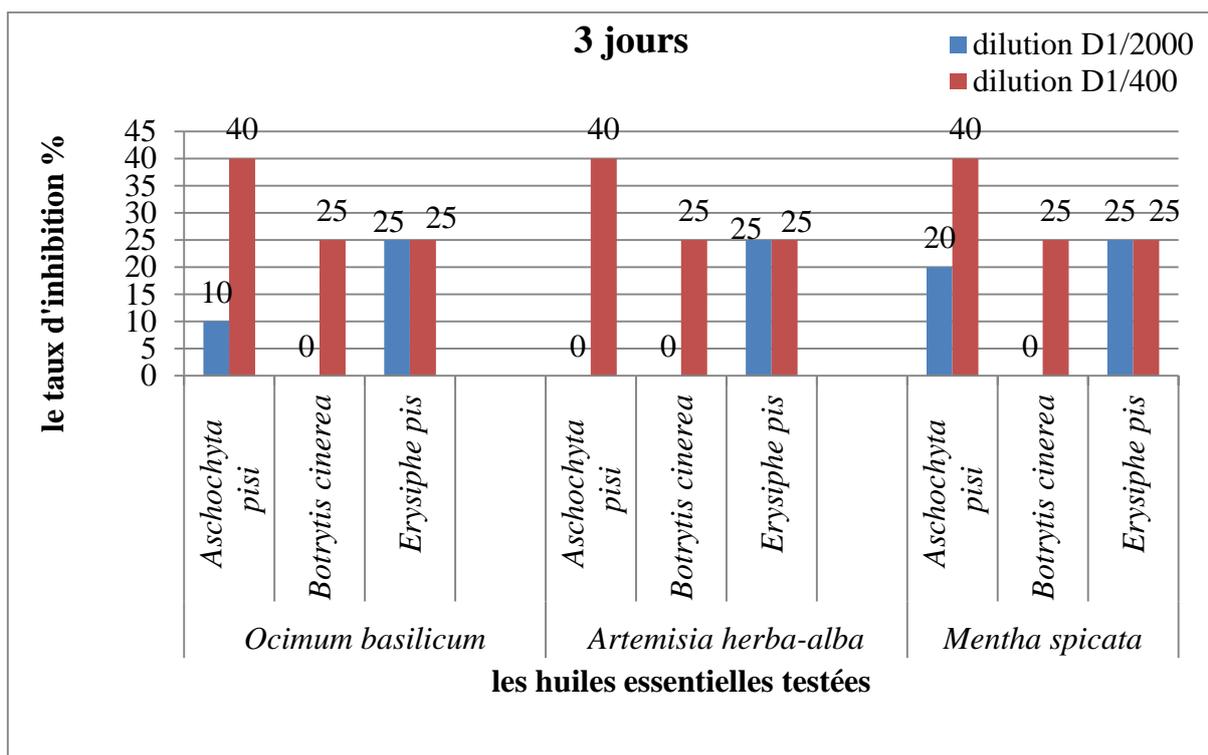


Figure 11. L'effet des huiles essentielles des trois plantes sur la croissance de différentes moisissures après 3 jours d'incubation.

Après 3 jours d'incubation des souches, on remarque que le taux d'inhibition de *Aschochyta pisi* par les 3 huiles essentielles à la concentration élevée atteint la valeur de (40%), cette valeur est la plus haute, la plus basse valeur d'inhibition de cette moisissure (10%) est obtenue par l'huile essentielle d'*Ocimum basilicum* à la dilution 1/2000. A la concentration (1/2000) aussi l'effet le plus fiable est noté sur *Botrytis cinerea* et aucune activité (0%) n'est observée pour les 3 huiles essentielles.

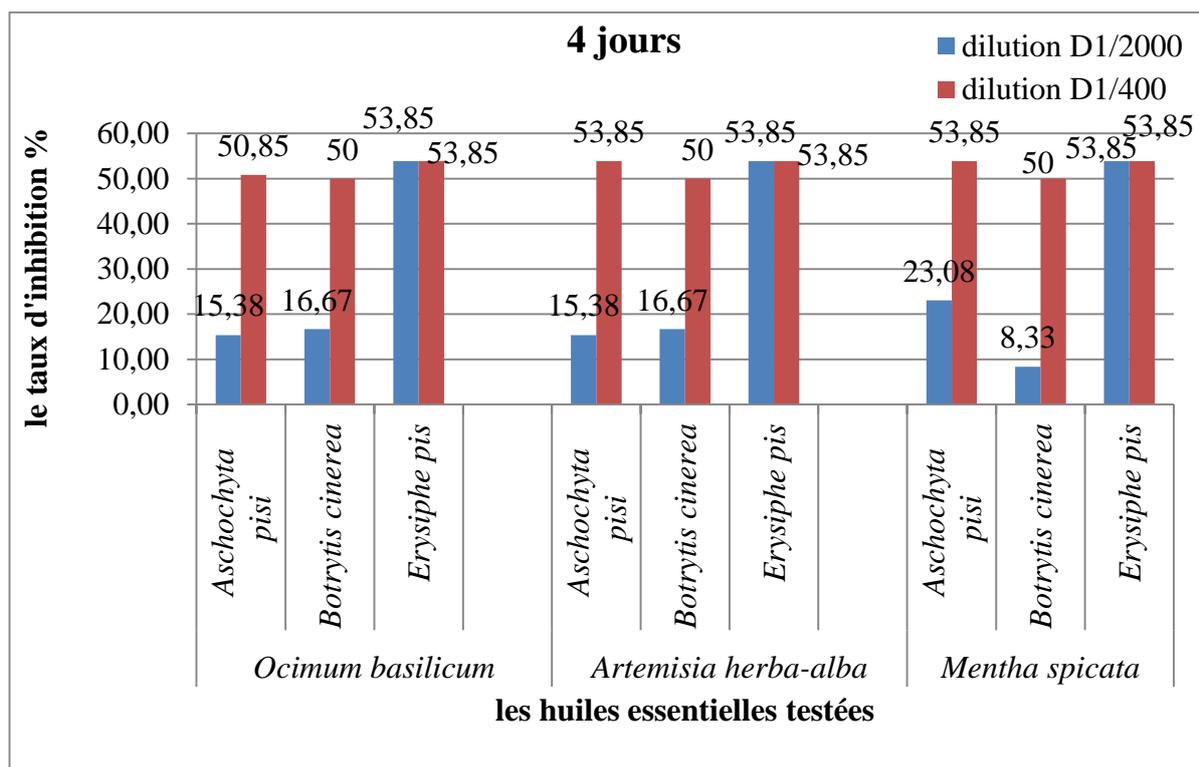


Figure 12. L'effet des huiles essentielles des trois plantes sur la croissance de différentes moisissures après 4 jours d'incubation.

Vers le quatrième jour d'incubation, selon la figure 12, l'effet inhibiteur des huiles essentielles (aux deux dilutions) s'observe pour les trois espèces fongiques à des taux différents. Pour les 2 dilutions le taux d'inhibition des 3 huiles sur *Erysiphe pisi* affichent la plus haute valeur (53,85%) et la plus basse valeur est celle de *Botrytis cinerea* (8,33%) traité par l'huile de *Mentha spicata* à la dilution 1/2000. Pour la dilution 1/400, la valeur la plus basse est notée pour *Aschochyta pisi* (15,38%) traité par l'huile d'*Ocimum basilicum* et *Artemisia herba-alba*.

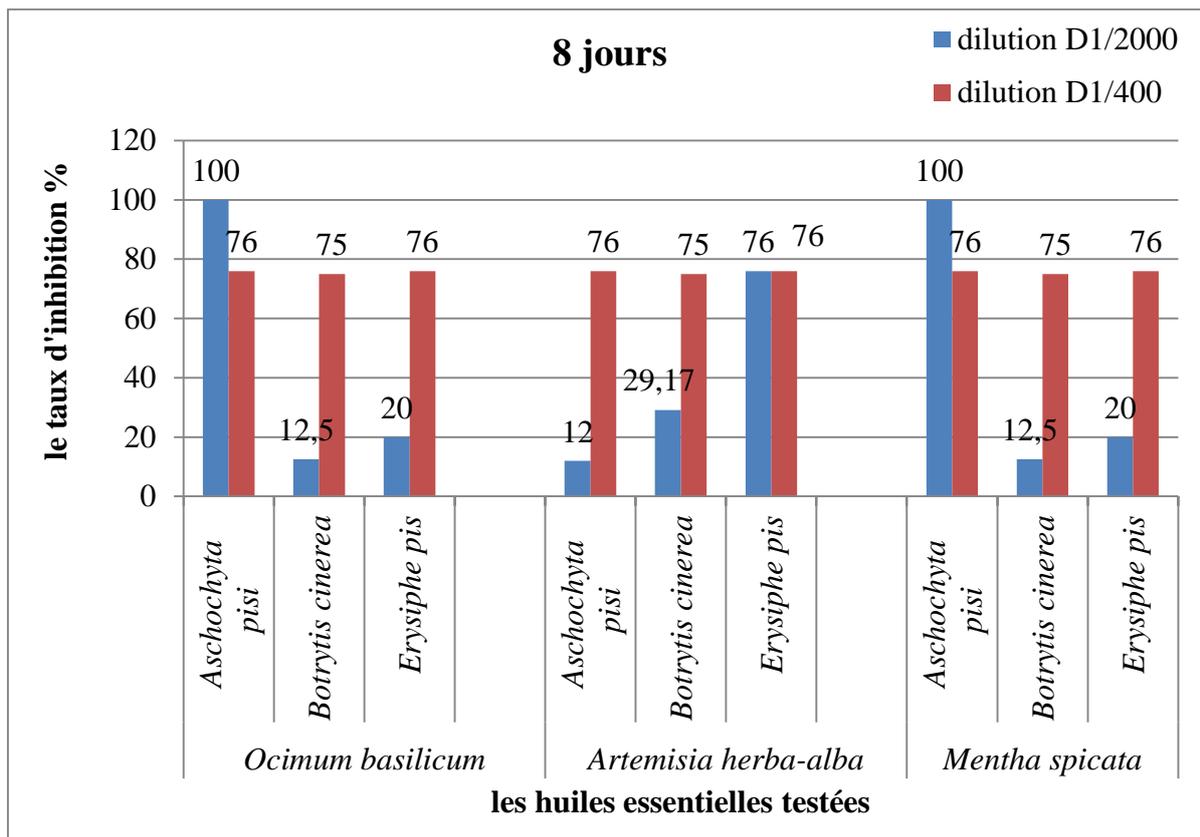


Figure 13. L'effet des huiles essentielles des trois plantes sur la croissance de différentes moisissures après 8 jours d'incubation.

Une activité inhibitrice fongicide totale (100%) de l'huile essentielle *d'Ocimum basilicum* est remarquée à la concentration faible (1/2000) pour l'espèce *d'Aschochyta pisi*. Pour la dilution 1/400 en remarque que le taux d'inhibition est presque le même (75 à 76%) pour toutes les espèces traitées par les 3 huiles.

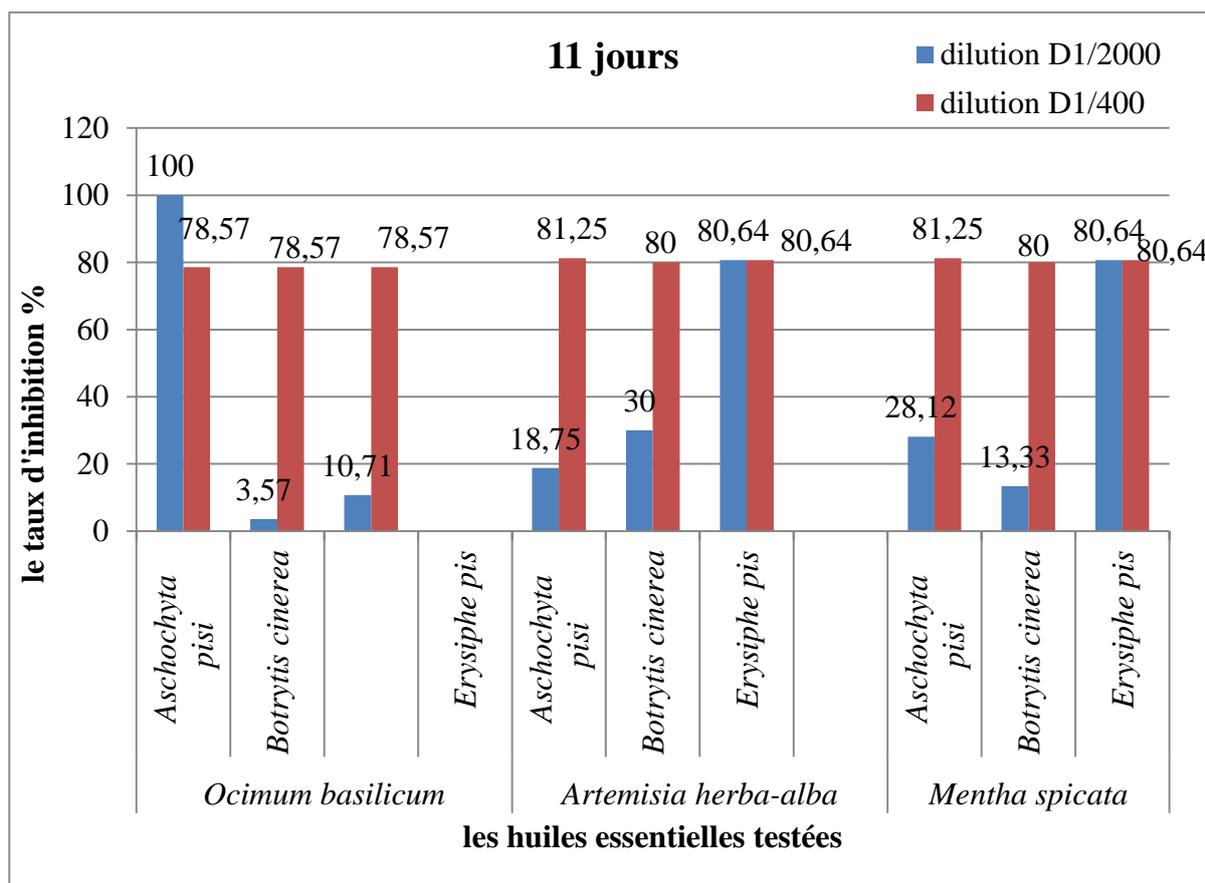


Figure 14. L'effet huiles essentielles des trois plantes sur la croissance de différentes moisissures après 11 jours d'incubation.

À la fin des tests et après 11 jours d'incubation (figure.11), pour la concentration 1/2000 le taux d'inhibition de la croissance d'*Aschochyta pisi* par huile d'*Ocimum basilicum* est totale, la valeur d'inhibition la plus basse pour cette huile essentielle est de (3,57%), elle est notée sur l'espèce *Botrytis cinerea*. Les valeurs d'inhibition des deux espèces fongiques (*Aschochyta pisi* et *Botrytis cinerea*) sont aussi faibles lorsqu'elles sont traitées par les huiles essentielles des deux autres plantes (*Artemisia herba-alba* et *Mentha spicata*) (13 à 30 %). Pour la dilution 1/400 on observe que les 3 huiles possèdent un effet inhibiteur important (78,57 à 81,25) sur les trois moisissures.

4.2. Discussion

Dans ce travail nous avons testé l'effet antifongique des huiles essentielles de trois plantes sur quelques champignons phytopathogènes. Les plantes choisies sont très répandues en Afrique de Nord et surtout en Algérie.

L'extraction des huiles par la méthode d'entraînement à la vapeur d'eau a mis en évidence des rendements variés, le rendement le plus élevé est celui d'*Ocimum basilicum* (1,97%) suivi par *Mentha spicata* (0,93%) et enfin *Artemisia herba-alba* (0,27%). La grande variabilité des rendements en huiles essentielles pourrait, selon Kolai et al. (2012) et Bendjelloul (2018), s'expliquer par divers facteurs ; conditions climatiques, période de récolte, nature de l'espèce qui peut varier d'une région à une autre et les conditions opératoires.

Pour les isolats fongiques, trois souches parmi celles isolées des échantillons de plantes de la fève et du pois cultivées dans la région de Zeribet Hamed (wilaya de Biskra) ont été retenus car ils présentent un caractère pathogène important.

Concernant le pouvoir antifongique, nous avons testé à différentes concentrations les huiles essentielles d'*Artemisia herba-alba*, d'*Ocimum basilicum* et de *Mentha spicata* vis-à-vis de trois champignons phytopathogènes du pois et de la fève (*Erysiphe pisi*, *Aschochyta pisi* et *Botrytis cinerea*).

À la limite de nos connaissances, aucune étude a traité l'effet des huiles essentielles de ces trois plantes sur ces moisissures. Cependant d'autres plantes ont été utilisées et d'autres champignons ont été testés également (Bessedik, 2015).

Les résultats que nous avons trouvés montrent que le champignon *Erysiphe pisi* est le plus sensible à l'effet des huiles, il a été inhibé totalement (100%) même à la concentration la plus faible. Ce champignon, d'après Since et al. (1995), est sensible aussi à l'alcool, cet auteur a testé l'effet de l'alcool diluée par rapport à l'eau (eau, eau + éthanol) sur *Erysiphe Pisi* et il a trouvé une inhibition importante (élevée) à une concentration élevée.

La deuxième espèce fongique (*Botrytis cinerea*) a été également sensible à la concentration élevée des huiles essentielles mais l'inhibition n'a été pas totale dans les tests avec la concentration faible. Daferera et al. (2009) a testé l'effet de l'huile essentielle de *Syzygium aromaticum*, de *Cinnamomum verum* et de *Cymbopogon citratus* sur cette moisissure, il a trouvé que l'huile de cannelle et celle de la citronnelle présentaient une forte inhibition sur *Botrytis cinerea*, l'huile de *Syzygium aromaticum* a présenté un effet inhibiteur plus faible.

La croissance radiale de *Botrytis cinerea* a été aussi vérifiée par Daferera et al. (2003). Elle est totalement inhibée par les huiles de *Lavandula angustifolia* et de *Rosmarinus officinalis* à une concentration élevée (1000 mg/ml) et par l'huile de Pennyoyal à une concentration faible (400 mg/ml).

Adebayo et al. (2013) a testé également l'effet de l'huile de *Pennyoyal* et a trouvé une inhibition plus élevée sur *Botrytis cinerea* à des concentrations plus faibles (150 et 200 µg/ml).

Vu l'importance de *Botrytis cinerea* en phytopathologie, elle a fait l'objet de plusieurs d'autres études. Soylu et al. (2010) a testé l'effet de l'huile essentielles de d'origan, *Rosmarinus officinalis* et de *Lavandula angustifolia* sur *Botrytis cinerea*. Les huiles essentielles de romarin ont présenté une inhibition importante (élevées) à une concentration de 25,6 µg/ml.

Bendjelloul (2018) a testé l'effet des huiles essentielles de *Mentha pulegium*, de *Rosmarinus officinalis* et de lavande sur cette moisissure. Les huiles essentielles de romarin et de *Lavandula angustifolia* ont donné une inhibition importante à la faible concentration (0.016 mg/µl).

Hmiri et al. (2011) ont testé l'effet de l'huile essentielle de *Tanacetum annuum* et de *Mentha pulegium*. L'huile de *Mentha pulegium* ont complètement inhibé la croissance de *Botrytis cinerea*, et l'huile de *Tanacetum annuum* n'ont pas affecté la croissance de *Botrytis cinerea*.

La dernière espèce de moisissure phytopathogène que nous avons testé (*Aschochyta pisi*) a montré une certaine résistance à l'effet des huiles à la concentration faible (1/2000). Shafique et al. (2011) a testé l'effet des solutions aqueuses et méthanoliques des extraits de fleurs de *T. erectus* sur *Aschochyta pisi*, ils ont trouvé une inhibition élevée à une concentration de (73%).

Conclusion

Ce travail, a été réalisé dans le cadre de la recherche des produits naturels qui peuvent remplacer les produits chimiques utilisés dans le domaine de la phytopathologie pour le traitement des maladies fongiques. Les substances chimiques sont connues d'avoir des effets néfastes sur l'environnement et la santé de l'homme.

En premier temps, on a isolé et identifié des souches fongiques, distribuées d'une façon irrégulière sur les plants de pois et de la fève. Trois souches (*Aschochyta pisi*, *Erysiphe pisi* et *Botrytis cinerea*) parmi celles isolées des échantillons de ces plantes cultivées dans la région de Zeribet Hamed (Biskra) ont été retenus, elles présentent un caractère pathogène important et causent d'important dégâts aux cultures.

L'extraction des huiles a été réalisée par la méthode d'hydrodistillation, Les plantes utilisées (*Ocimum basilicum*, *Mentha spicata* et *Artemisia herba-alba*) ont donné des rendements divers en huiles essentielles qui sont 1,97%, 0,93% et 0,27% respectivement.

Les huiles essentielles montrent aussi des effets antifongiques différents. Les trois huiles essentielles testées ont montré une inhibition totale des trois souches fongiques, ceci est noté seulement à la concentration élevée.

L'huile essentielles d'*Ocimum basilicum* a montré l'effet inhibiteur le plus remarquable, cet effet est totale à la concentration 1/400. Les huiles essentielles des deux autres plantes (*Artemisia herba-alba* et *Mentha spicata*), à la même concentration, n'ont pas donnée une inhibition totale des trois moisissures.

D'après ce résultat, l'huile essentielle d'*Ocimum basilicum* peut être utilisée comme alternative pour lutter contre les ravageurs des cultures du pois et de la fève surtout le champignon problématique (*Erysiphe pisi*).

Comme Suite à notre travail, Il est recommandé de tester ces huiles essentielles surtout celle d'*Ocimum bacilicum* sur d'autres espèces phytopathogènes et d'autres agents microbiens.

La connaissance de la composition chimique de ces extraits de plantes est d'intérêt majeurs.

Vu la toxicité qui peuvent être présentée par quelque substances chimiques qui entrent dans la composition de ces huiles essentielles, des tests de la toxicité de ces substances doivent obligatoirement effectués sur des animaux de laboratoire.

Bibliographie

Adebayo O., Dang T., Bélanger A., Khanizadeh S. 2013. Antifungal studies of selected essential oils and a commercial formulation against *Botrytis cinerea*. Journal of food research 2(1) : 217.

Afnor. 2000. Huiles essentielles. Echantillonnage et méthodes d'analyse monographies relatives aux huiles essentielles (tome 2).

Ahandagbe S. G. A., Ahoton, L., Agbaka, A., & Bokonon-Ganta, A. H. 2014. Etude de quelques paramètres biologiques de *Diachasmimorpha longicaudata* (Ashmead) candidat potentiel pour la lutte biologique contre *Bactrocera dorsalis* (Drew Tsuruta et White) au Bénin. EPAC/UAC.

Arabici O., and Bayram E.2004. The effect of nitrogen and different plant density on some agronomic and technologic characteristic of *Ocimum basilicum* L. (Basil). Asian Network for scientific information 3(4): 255-262.

Bendjelloul F. 2018. Détermination du pouvoir antibactérien et antifongique de l'huile essentielle de *Mentha pulegium* L. sur quelques microorganismes phytopathogènes.

Bhattacharya P., Mukerjee A.B., Jacks G., Nordqvist S. 2002. Métal contamination at wood preservation site: Caractérisation and expérimental studies on remediation. sci. total environ 290: 165-180.

Botton B., Breton A., Févre M., Gauthier S., Guy P.h., Larpent J.P; Reymond P., Sanglier J.J., Vayssier Y., Veau R. 1990. Moisissures Utiles Et Nuisibles : Importance Industrielle. Edition Masson, Paris.S.

Boukef K. 1986. Les plantes dans la médecine traditionnelle tunisienne. Agence de coopération culturelle et technique, Paris Lemordant D (1977) Plantes utiles et toxiques de Tunisie. Fitoterapia 18 :191-214.

Brink M., Belay G.2006. Céréales et légumes secs, ressources végétales de l'Afrique Tropicale. Fondation Prota, Wageningen, Pays-Bas :102.

Chaux C., Foury C.L.1994. Production légumière : légumineuses potagères, légumes fruits. Ed. TEC et DOC. Lavoisier: 536

Cimanga K., Kambu K., Tona L., Apers S., de Bruyne T., Hermans N., Totte J., Pieters L., Vlietinck A.J. 2002. Correlation between chemical composition and antibacterial activity of essential oils of some

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.

- Daoui K. 2007. Recherché de stratégie d'amélioration de l'efficience d'utilisation des phosphores chez la fève (*Vicia faba* L) dans les conditions d'agriculture pluvieuse au Maroc. Thèse de doctorat, science agronomiques et ingénierie biologique. Louvain: 227.
- Doyle J.J., Luckow M.A. 2003. The rest of the iceberg. Legume diversity and evolution in a phylogenetic context. *Plant Physiol* 131: 900-910.
- FAO STAT. Agriculture. 2011. Food and agricultural commodities production. Food and agriculture organization. Rome.
- FAO. 2015. FAOSTAT. Retrieved from <http://faostat3.fao.org/>, accessed 11 November .2015.
- Fouché J.G., Marquet A., Hambuckers A. 2008. Les Plantes Médicinales De La plante Au médicament conception et Réalisation.
- Gepts P., Beavis W.D., Brummer E.C., Shoemaker R.C., Stalker H.T., Weeden N.F . 2011. Content and distribution of protein, sugar and inositol phosphates during the germination and seedling growth of two cultivars of *Vicia faba*,. *J Food Compost Anal* 24:391-397.
- Guillaume V. 2006. Biologie Médicale pratique « Mycologie » ISBN. Edition de Boeck université Bruxelles : 2-8041-5028-3 : 33.34.42.
- Hamadach A. 2003. La féverole, Inst. techn. Gr. Cult. (T.T.G.C) :13.
- Hmiri S., Amrani N., Rahouti M. 2011. Détermination in vitro de l'activité antifongique des vapeurs d'eugénol et d'huiles essentielles de *Mentha pulegium* L. et de *Tanacetum annuum* L. vis-à-vis de trois champignons responsables de la pourriture des pommes en post-récolte. *Acta Botanica Gallica* 158(4) : 609-616.
- Huignard J., Glitho A., Monge, J.P., Regnault-Roger C. 2011. Insectes ravageurs des grains de légumineuses. Biologie des Bruchinae et lutte raisonnée en Afrique. Ed. Quæ, Paris, 145p. Industrielle. 2ème édition. Masson. Collection Biotechnologies : 34-428.
- Khaldi R., Zekri S., Maatougui M.H.E., Ben Yassine A. 2002. L'Economie des Légumineuses Alimentaires au Maghreb et dans le Monde. Proceedings du 2eme séminaire du réseau REMAFEVE/REMALA, (Le devenir des Légumineuses Alimentaires dans le Maghreb), Hammamet, Tunisie :100.
- Kolai N., Saiah F., Boudia A. 2012. Effet inhibiteur in vitro de l'huile essentielle d'artemesia herba alba sur deux souches de *Fusarium oxysporum* f. sp. radices-lycopersici. *Algerian Journal of Arid Environment "AJAE"* 2(1) : 6-6.
- Kumari SG., Van Leur J.A.G. 2011. Viral diseases infecting faba bean (*Vicia faba* L.). *Grain legumes*. No 56: 24-26.
- Laumonier R. 1979. Culture légumière et marichaires tome iii. ed. J. B. bailler, 276p.

- Lazrek-Ben-Friha F. 2008. Analyse de la diversité génétique et symbiotique des populations naturelles tunisiennes de *Medicago truncatula* et recherche de QTL liés au stress salin. Thèse de doctorat. Sciences biologiques. Université de Toulouse 255p.
- Lepoivre p., Semal J. 1988. La lutte biologique en phytopathologie végétale. Traité de pathologie végétale. Ed Presse agronomique de Gembloux, Les moisissures d'intérêt médical. Cahier de formation N°25. Biologie médicale. Paris édition : 465- 487.
- Maatougui M.E. 1996. Situation de la culture des fèves en Algérie et perspectives de relance. Céréaliculture. No 29: 6-18.
- Maihebiau P.1994. La nouvelle aromathérapie, biochimie aromatique et influence psychosensorielle des odeurs. Lausanne 635p.
- Mathon, C. 1985. Liste de plantes utiles avec indication de leur aire probable de premo domestication. Faculté des sciences de l'université de Poitiers ,17p
- McPhee, K. 2003. Dry pea production and breeding, a mini-review. Food Agric
- Mueen, Ahmed. 2015. Biological properties of the sweet basil (*Ocimum basilicum*). British Journal of Pharmaceutical Research 7(5).336-339.
- Nabli M.A.1989. Essai de synthèse sur la végétation et la phyto-écologie tunisiennes. IED-MAB (Faculté des sciences de Tunis) Tunisie 196 – 188.
- Nasim A., Marielle B., Donovan B., Hannah B., Ariane R., Rafael B. 2017. A new subfamily classification of the Leguminosae based on a taxonomically comprehensive phylogeny. Taxon February 66(1) 2017:44-47.
- Pérez-de-luque A., Eizenberg H., Grenz J.H., Sillero J.C., Avila C., Sauerborn J., Rubiales D. 2010. Broomrape management in faba bean. Field Crops Research 115: 319-328.
- Pouvreau A.2004.Les insectes pollinisateurs. Delachaux et Niestlé 157p.
- Quezel, P., Santa, S., & Schotter, O. 1962. Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales-v 1-2.
- Rachef, S.A., Ouamer., Ouffroukha, F.A.2005. Inventaire des ravageurs de la fève en Algérie (identification et caractérisation). I.N. R.A.16 :36-41.
- Saliou N. 2012. Composition chimique et propriétés physico-chimiques des huiles essentielles d'*Ocimum basilicum* et d'*Hryptis suaveolens* L. pois récoltés dans la région de Dakar au Sénégal. Bulletin de la Société Royale des sciences de Liège 81 : 166-175.
- Saxena M., C.1991. Status and scope for production of faba bean in the Mediterranean countries. Options Méditerranéennes. Série Séminaires 10: 15-20

Schultz t.p., Nicholas d.d. Nicholas. 2000. Naturally durable heartwood: evidence for the proposed dual défensive function of the extractives. *Phytochemistry* 54: 47-52.

Selvakumar P ;Edhaya Naveena B., Prakash D.S .2012 .studies on the antidandruff activity of the essential oil of *Coleus amboinicus* and eucalyptus globules. *Asian pacific journal of tropical biomedicine* 715-719.

Shafique S., Shafique S., Bajwa R., Akhtar N., Hanif S. 2011. Fungitoxic activity of aqueous and organic solvent extracts of *Tagetes erectus* on phytopathogenic fungus- *Ascochyta rabiei*. *Pak. J. Bot* 43(1): 59-64.

Since U. P., Prrva B., Wacne K. G., & Plan-scuaces, K.1995. Effect of ajoene, a constituent of garlic (*Allium sativum*), on pow-dery mildew (*Erysiphe pisi*) of pea (*Pisum sativum*).

Siripornvisal S., Rungprom W., Sawatdikarn S. 2009. Antifungal activity of essential oils derived from some medicinal plants against grey mould (*Botrytis cinerea*). *Food Ag-Ind* 229-233.

Snoussi M., Noumi E., Trabelsi N., Flamini G., Papetti A., & De Feo, V. 2015. *Mentha spicata* essential oil: chemical composition, antioxidant and antibacterial activities against planktonic and biofilm cultures of *Vibrio spp.* strains. *Molecules* 20(8), 14402-14424.

Soylu E. M., Kurt Ş., Soyly S. 2010. In vitro and in vivo antifungal activities of the essential oils of various plants against tomato grey mould disease agent *Botrytis cinerea*. *International Journal of Food Microbiology* 143(3) : 183-189.

Stoddard F.L., Nicholas A.H., ubialesD., Thomas J., Villegas-Fernandez A.M. 2010. Integrated pest management in faba bean. *Field Crops Research*. 115: 308-318.

Tantaoui-Elaraki A., Lattaoui N., Benjilali B., Errifi A. 1992. Antimicrobial activity of four chemically différent essential oils. *Rivista italiana e.p.p.o.s.* 6:13-22.

Yahara T. F., Javadi Y., Onoda L.P., Quiroz, D., Prado. 2013. Global legume diversity assessment: Concepts, Key indicators, and strategies. *Taxon* 62:249- 266.<https://doi.org/10.12705/622.12>.

Yakhlef G.2010.Etude de l'activité biologique des extraits de feuilles de *Thymus vulgaris* L et *Laurus nobilis* L thèse de magister , université el hadj llakhdar batna.p 1,2,5,6,7 .

Yashphe J., Feutein I., Barel S.,Segal R.198è. the antibacterial and antispasmodic activity of *Artemisia herba-alba*. Examination of essential oils from various chemotypes. *Grud Drug Res* 25:89-96.

Zehhar G. T., Ouzzani A., Badoc A., Douira A.2006. Effet des Fusarium des eaux de rizièrre sur la germination et la croissance des plantules de riz. *Bull. Soc, Pharm. Bordeaux* 145 : 7-18.

Résumés

ملخص: نهدف من خلال دراستنا للزيوت الأساسية لكل من نبات الحبق و الشيح والنعناع الى كيفية تأثيرها كمبيدات حيوية ضد بعض الفطريات الممرضة المعزولة من نباتات البازلاء والفاصوليا *Botrytis cinerea, Aschochyta pisi et Erysiphe pisi*. سمحت لنا طريقة استخلاص هذه الزيوت بواسطة التقطير بالبخار من الحصول على مردود مختلف نجده عند الحبق (الريحان) (1,97%) والنعناع بنسبة (0,93%) و(0,27) عند الشيح. تم إختبار الثلاث زيوت بتركيز مختلفة 1/400, 1/2000 عن طريق تحديد معدل تثبيط نمو الفطريات التي تم اختبارها. حيث أثبتت الدراسة أن زيت الحبق (الريحان) لديه فعالية أكبر ضد الفطريات المدروسة، بتركيز منخفض مثبط مقارنة بالنعناع ويليها الشيح.

الكلمات الدالة: الزيوت الأساسية -النعناع -الحبق (الريحان) -الشيخ-فطريات نبات البازلاء و الفاصولياء *Ocimum basilicum, Mentha spicata et Artemisia herba-alba*

Résumé

L'objectif de notre étude est d'utiliser les huiles essentielles d'*Ocimum basilicum, Artemisia herba-alba et Mentha spicata*, comme des bio fongicides vis-à-vis des souches fongiques isolées et identifiées à partir des plantes du pois et de la fève. Les trois espèces isolées sont *Aschochyta pisi, Erysiphe pisi et Botrytis cinerea*. La méthode d'extraction nous a permis d'obtenir un rendement, dont le plus élevé est celui d'*Ocimum basilicum* (1,17%) suivi par *Mentha spicata* (0,23%) puis *Artemisia herba-alba*. L'efficacité de chaque huile essentielle est estimée, à différentes concentrations 1/400 et 1/2000, par la détermination du taux d'inhibition de la croissance des champignons testés. En effet, l'huile essentielle d'*Ocimum basilicum* manifeste l'effet le plus élevé suivi par *Mentha spicata* puis *Artemisia herba-alba*.

Mots clés : Huiles essentielles, *Ocimum basilicum, Mentha spicata et Artemisia herba-alba*, phytopathogène, activité antifongique.

Abstract

The objective of our study is to use the essential oils of *Ocimum basilicum, Artemisia herba-alba and Mentha spicata*, as bio fungicides against fungal strains isolated and identified from pea and bean plants. The different isolated species belong to the genera *Aschochyta pisi, Erysiphe pisi, Botrytis cinerea*. The extraction method allowed us to obtain a yield, the highest of which is that of *Ocimum basilicum* (1.17%) followed by *Mentha spicata* (0.23%) and then *Artemisia herba-alba*. The effectiveness of each essential oil for different concentrations 1/400 and 1/2000, is estimated by determining the growth inhibition rate of the fungi tested. Indeed, the essential oil of *Ocimum basilicum* has a good antifungal effect because it showed a minimum inhibitory concentration, then *Mentha spicata*, then *Artemisia herba-alba*.

Key words: essential oils, *Ocimum basilicum, mentha spicata and Artemisia herba-alba*, fungal strain of pea and bean plants, antifungal activity.