

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية  
République Algérienne Démocratique et Populaire  
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي  
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique  
جامعة الجيلالي بونعامة  
Université Djilali Bounaama de Khemis Miliana  
Faculté des sciences de la nature et de la vie et des sciences de la terre  
Département de Biologie



## *Mémoire de fin d'études*

En vue de l'obtention du diplôme de **Master** en

**Domaine** : Sciences de la Nature et de la Vie.

**Filière** : Sciences Biologiques.

**Spécialité** : Microbiologie appliquée.

# Effet biopesticide des extraits naturels

**Présenté par :**

- KHELFAOUI Roufaida
- HADJDJILANI Roumaïssa
- BOUDJLID Sabrina

**Devant le jury :**

Mr. LAZALI M.

Mr. BOUSSALHIH B.

Mme GUETARNI H.

Pr

MCA

MCA

Président (U.D.B Khemis Miliana)

Examineur (U.D.B KhemisMiliana)

Promotrice (U.D.B KhemisMiliana)

**Année universitaire : 2021/2022**

### **Remerciements :**

*Je remercie tout d'abord Allah qui nous a donné le courage et la patience pour terminer ce modeste travail.*

*Nous tenons à exprimer notre gratitude au **Docteur Guetarni Hassina**, notre directrice de mémoire, nous souhaitons aussi lui présenter nos vifs remerciements, pour la confiance qu'elle a placée en nous en acceptant de diriger ce mémoire.*

*Nous témoignons de notre gratitude au **Docteur Saifi Mounir**, Monsieur **El Haouesse Ben Yousef** et Monsieur **Bentaïba Bilal** pour leurs conseils et leurs encouragements. Ainsi que tous les ingénieurs des laboratoires de Microbiologie et de Chimie 2 de l'université de Khemis Miliana.*

*Nous adressons nos sincères remerciements à **Madame Mabrek** du laboratoire de Zoologie et **Madame Oassila** du laboratoire de Botanique, pour leurs précieux conseils donnés. Nous remercions aussi **Docteur Khedraoui Abdelkader**, Directeur de laboratoire de recherche "Valorisation des Ressources Naturelles " pour son accueil au niveau du laboratoire pour réaliser l'analyse CG/MS.*

*Nous tenons aussi à remercier les membres de jury **Professeur Lazali Mohamed** et **Docteur Bousalhih Brahim** pour le temps qu'ils ont consacré à l'évaluation de ce mémoire.*

*Enfin, nous remercions toute personne qui a contribué, de près ou de loin, à l'élaboration de ce mémoire, en particulier ma famille et mes amies*

**Dédicaces**

*A mes chers parents  
A ma tante Mounia, lumière de mes yeux  
A mes frères Ramzi et Ahmed Sedik  
A ma sœur Djinane  
A ma tante Alima et mon oncle Mustapha  
A mes cousins et cousines  
A mon fiancé Anis  
A mes beaux parents  
A mes amies Manel et Bouchra.*

*Roufaïda*

**Dédicaces**

*A mon père  
Mon plus haut exemple et mon modèle de persévérance pour aller toujours de l'avant et ne jamais  
baisser les bras.  
A ma mère  
Pour son affection, sa patience, sa compréhension, sa disponibilité, son écoute permanente et son  
soutien.  
Mes chers parents qu'Allah vous garde.  
A mes chères sœurs : Amel, Samra, Lamia, Chahrazad, Rania et Narimane pour vous exprimer  
toute mon affection et ma tendresse.  
A mon cher frère Malek  
A mes beaux-frères Azeddine et Fethi  
A mes neveux et nièces  
A mes fidèles amies Rima Yasmine, Manel, Bouchra et Moussa, à mon binôme Roufaïda  
A toute ma famille paternelle Hadj djilani et maternelle Amrane.  
À ma chère encadreuse Mme GUETARNI.  
À mes amies d'université.*

*Reumaïssa*

**Dédicaces**

*Je dédie mon mémoire de Master  
A ma mère ;  
A mon père ;  
A mes chers frères : Djamel, Ahmed et Mohamed Iyad  
A mes sœurs : Nour El houda, Nassira, Saida, Chaima et Hayat  
A tous les membres de ma famille ;  
A tous mes amies de la promotion ;  
A tous mes amies sans exception.*

*Sabrina*

# SOMMAIRE

Résumé

Abstract

المخلص

Liste des abréviations

Liste des tableaux

Liste des figures

Introduction ..... 01

## Partie I : Etude bibliographique

I.	<b>Pesticides</b> .....	03
I.1	Définitions des pesticides .....	03
I.2	Classification des pesticides .....	03
I.2.1	Classement en fonction de leur toxicité .....	04
I.2.2	Classement selon l'organisme nuisible cible .....	05
I.2.3	Classement selon le mode d'action ou le mode de pénétration.....	07
I.3	Intérêt de l'utilisation des pesticides.....	08
I.4	Effets toxiques des pesticides sur la santé et l'environnement.....	09
I.4.1	Effets sur la santé.....	09
I.4.2	Effets sur l'environnement.....	11
II.	<b>Biopesticides</b> .....	13
II.1	Définition des biopesticides .....	13
II.2	Catégories des biopesticides.....	14
II.2.1	Biopesticides microbiens .....	14
II.2.2	Biopesticides végétaux.....	18
II.2.3	Biopesticides animaux .....	18
II.3	Avantages des biopesticides.....	19
II.4	Inconvénients des biopesticides .....	19
II.5	Rôles des biopesticides .....	20
III.	<b>Huiles essentielles et la plante étudiée de colza</b> .....	20
III.1	<b>Huiles essentielles</b> .....	20
III.1.1	Définition.....	20
III.1.2	Composition chimique .....	21
III.1.3	Méthodes d'extraction des huiles essentielles.....	21
III.1.4	Principaux domaines d'application.....	22
III.1.5	Rôles des huiles essentielles chez les plantes.....	23

III.2	<b>Plante étudiée de colza</b> .....	23
III.2.1	Description.....	23
III.2.2	Cycle de vie du colza .....	24

## **Partie II : Etude expérimentale**

<b>I.</b>	<b>Matériel et Méthodes</b> .....	27
<b>I.1</b>	Lieu de travail.....	27
<b>I.2</b>	Présentation de la station d'échantillonnage de colza.....	27
<b>I.3</b>	Matériel biologique.....	28
<b>I.3.1</b>	Plante étudiée de colza.....	28
<b>I.3.2</b>	Huiles essentielles.....	29
<b>I.4</b>	<b>Méthodes</b> .....	30
<b>I.4.1</b>	Isolement des microorganismes.....	30
<b>I.4.2</b>	Identification.....	31
<b>I.4.3</b>	Paramètres physicochimiques des huiles essentielles.....	34
<b>I.4.3.1</b>	Paramètres physiques .....	34
<b>I.4.3.2</b>	Paramètres chimiques .....	35
<b>I.4.4</b>	Détermination de l'activité antimicrobienne in vitro des huiles essentielles vis-à-vis des microorganismes isolés .....	37
<b>I.4.5</b>	Activité Antioxydante des huiles essentielles.....	39
<b>I.4.6</b>	Analyse par chromatographie phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CG/SM).....	40
<b>II</b>	<b>Résultats et discussion</b> .....	42
<b>II.1</b>	<b>Résultats</b> .....	42
<b>II.1.1</b>	Isolement des microorganismes à partir des échantillons de Colza.....	42
<b>II.1.2</b>	Identification des microorganismes.....	45
<b>II.1.3</b>	Analyse physico-chimiques.....	49
<b>II.1.3.1</b>	Indices physiques.....	49
<b>II.1.3.2</b>	Indices chimiques .....	50
<b>II.1.4</b>	Activité antimicrobienne des huiles essentielles vis-à-vis des microorganismes isolée.....	53
<b>II.1.5</b>	Activité antioxydante.....	57
<b>II.1.6</b>	Analyse de l'huile essentielle de <i>Pelargonium graveolens</i> par CG/SM.....	58
<b>II.2</b>	<b>Discussion</b> .....	61
	<b>Conclusion</b> .....	<b>63</b>
	<b>références bibliographie et webographie</b> .....	<b>66</b>
	<b>Annexe</b>	

## Résumé :

Les conséquences de l'usage intensif des pesticides en agriculture ont engendré des dégâts affectant la santé humaine et l'environnement naturel. Pour remédier à ce problème on a eu recours à l'utilisation des biopesticides. Ces derniers sont des substances naturelles d'origine animale, végétale ou des micro-organismes. Ils ont la particularité de limiter ou d'éliminer les ennemies des cultures.

L'objectif principal de notre recherche est l'évaluation des activités des deux huiles essentielles *Pelargonium graveolens* et *Juniperus phoenicea* sur les micro-organismes qui ont contaminé la plante de colza *Brassica napus* L. récoltée sur champ de l'ITGC de Khemis Miliana.

Pour répondre à cette problématique, nous avons mené les expériences suivantes : échantillonnage de la plante *Brassica napus* L. , isolement des microorganismes responsables de la détérioration des feuilles de colza, identification des microorganismes isolés , détermination des paramètres physico-chimiques des deux huiles essentielles *Pelargonium graveolens* et *Juniperus phoenicea*, étude de l'activité antimicrobienne *in vitro* des huiles essentielles vis-à-vis des microorganismes isolés. Nous avons également exploré l'activité antioxydante de ces deux huiles essentielles ainsi que l'analyse par CG/SM d' *Pelargonium graveolens* qui a donné un net effet inhibiteur *in vitro* des micro-organismes responsables de la pathologie du colza.

Les résultats ont permis d'identifier les microorganismes affectant le colza qui sont : *Alternaria alternata*, *Aspergillus niger*, *Klebsiella oxytoca*, *Klebsiella pneumoniae ssp pneumoniae 1* et *Vibrio vulnificus*. Pour les expériences sur l'activité antimicrobienne, les résultats ont révélé que les diamètres des zones d'inhibition d'huile de *Pelargonium graveolens* varient de 25 et 30mm, alors que ceux enregistrés avec l'huile essentielle de *Juniperus phoenicea* sont 10 et 18mm.

Quant à l'activité antioxydante, les valeurs d'IC50 sont 0.25µg/ml et 0.28µg/ml enregistrées avec les huiles de *P. graveolens* et *J. phoenicea*, respectivement.

L'analyse réalisée par CG/SM d'huile essentielle de *Pelargonium graveolens* a permis de distinguer 69 composants chimiques dont le constituant nommé « 6-OCTEN-1-OL,3,7-DIMETHYL » est majoritaire avec un pourcentage de 25.50

**Mots clés :** Biopesticides, Huiles essentielles, ITGC de Khemis Miliana, *Brassica napus* L. *Pelargonium graveolens*, *Juniperus phoenicea*, Activité Antimicrobienne, Activité Antioxydante, CG/SM.

## ***Abstract***

The consequences of the intensive use of pesticides in agriculture have caused damage affecting human health and the natural environment. To remedy this problem, we resorted to the use of biopesticides. These later are natural substances of animal, plant or micro-organism origin. They have the particularity of limiting or eliminating crop enemies.

The main objective of our research is to evaluate the activities of the two essential oils *Pelargonium graveolens* and *Juniperus phoenicea* on the microorganisms that have contaminated the *Brassica napus L.* rapeseed plant harvested in the ITGC of Khemis Miliana.

To answer this problematic, we conducted the following experiments: sampling of the *Brassica napus L.* plant, isolation of microorganisms responsible for the deterioration of rapeseed leaves, identification of microorganisms, determination of the physicochemical parameters of the two essential oils *Pelargonium graveolens* and *Juniperus phoenicea*, the study of the *in vitro* antimicrobial activity of essential oils against isolated microorganisms.

We also explored the antioxidant activity of these two essential oils as well as the CG/MS analysis of *Pelargonium graveolens* which gave a clear *in vitro* inhibitory effect of the microorganisms responsible for rapeseed pathology.

The results allowed to identify the microorganisms affecting rapeseed, which are: *Alternaria alternata*, *Aspergillus niger*, *Klebsiella oxytoca*, *Klebsiella pneumoniae ssp pneumoniae 1* and *Vibrio vulnificus*. For the experiments on the antimicrobial activity of microorganisms, the results revealed that the diameters of the inhibition zone of *Pelargonium graveolens* oil vary from 25 and 30mm, while those recorded with the essential oil of *Juniperus phoenicea* are 10 and 18mm.

As for the antioxidant activity, the IC<sub>50</sub> values are 0.25µg/ml and 0.28µg/ml recorded with the oils of *P. graveolens* and *J. phoenicea* respectively.

The analyzes carried out by CG / MS of essential oil of *Pelargonium graveolens* enable to distinguish 69 chemical components of which the constituent named "6-OCTEN-1-OL, 3,7-DIMETHYL" is the majority with a percentage 25.50.

**Keywords :** Biopesticides, ITGC Station, *Brassica napus L.*, *Pelargonium graveolens*, *Juniperus phoenicea*, Antimicrobial Activity, Antioxidant Activity, GC/MS.

تسببت عواقب الاستخدام المكثف للمبيدات آفات في الزراعة و أضرار تؤثر على صحة الإنسان والبيئة الطبيعية. ولمعالجة هذه المشكلة لجأنا إلى استخدام المبيدات الحيوية. هي مواد طبيعية من أصل حيواني أو نباتي أو كائن دقيق، لديهم خصوصية الحد أو القضاء على أعداء المحاصيل. الهدف الرئيسي لدراستنا هو تقييم أنشطة الزيتين الأساسيين *Pelargonium graveolens* و *Juniperus phoenicea* على الكائنات الحية الدقيقة التي تلوث نبات *Brassica napus* L بذور اللفت التي تم حصادها في ITGC في خميس مليانة.

للإجابة على هذه الاشكالية ، أجرينا التجارب التالية: أخذ عينات من نبات *Brassica napus* L ، عزل الكائنات الحية الدقيقة المسؤولة عن تدهور أوراق بذور اللفت ، تحديد الكائنات الحية الدقيقة ، تحديد المعلمات الفيزيائية والكيميائية للزيتين الأساسيين *Pelargonium graveolens* و *Juniperus phoenicea* ، ودراسة نشاط مضادات الميكروبات في المختبر للزيوت الأساسية ضد الكائنات الحية الدقيقة المعزولة. استكشفنا أيضًا النشاط المضاد للأكسدة لهذين الزيتين الأساسيين بالإضافة إلى تحليل / CG MS-*Pelargonium graveolens* الذي أعطى تأثيرًا مثبتًا في المختبر للكائنات الدقيقة المسؤولة عن أمراض بذور اللفت. أتاحت النتائج التعرف على الكائنات الحية الدقيقة التي تؤثر على بذور اللفت ، وهي *Alternaria alternata* و *Aspergillus niger* و *Klebsiella oxytoca* و *Klebsiella pneumoniae ssp pneumoniae 1* و *Vibrio vulnificus* بالنسبة للتجارب التي أجريت على النشاط المضاد للميكروبات للكائنات الحية الدقيقة ، أوضحت النتائج أن أقطار منطقة التثبيط لزيوت *Pelargonium graveolens* تتراوح بين 25 و 30 مم ، بينما تلك المسجلة بالزيت العطري من *Juniperus phoenicea* هي 10 و 18 مم. أما بالنسبة للنشاط المضاد للأكسدة ، فإن قيم IC50 هي 0.25 ميكروغرام / مل و 0.28 ميكروغرام / مل مسجلة بزيوت *P. graveolens* و *J. phoenicea* على التوالي أتاحت التحليلات التي أجراها CG / MS للزيت العطري من *Pelargonium graveolens* تمييز 69 مكونًا كيميائيًا كان المكون المسمى

6-OCTEN-1-OL 3.7-DIMETHYL هو الأغلبية بنسبة 25.50.

**الكلمات المفتاحية:** المبيدات الحيوية ، محطة ITGC ، *Brassica napus* L ، *Pelargonium graveolens* ، *Juniperus phoenicea* MS / GC ، نشاط مضادات الميكروبات ، نشاط مضادات الأكسدة



## Liste des abréviations :

**%** : Pourcentage.

**°C** : Degré Celsius.

**µg** : Microgramme.

**µL** : Microlitre.

**µM** : Micromètre.

**2,4-D** : 2,4-Dichlorophénoxyacétique.

**Abs** : Absorbance.

**ADN** : Acide DésoxyriboNucléique.

**AFNOR** : Association Française de Normalisation.

**API20E** : Analytical Profile Index 20E (E= Entérobactéries).

**ARN**: Acide Ribo Nucléique.

**BT**: *Bacillus thuringiensis*.

**IC50** : Inhibitrice Concentration 50.

**CG/SM** : Chromatographie en phase Gazeuse couplée au Spectromètre de Masse.

**DL50** : Dose Létale à 50%.

**DDT** : DichloroDiphén-ylTrichloroéthane.

**DMSO** : DiMéthylSulfOxide.

**DPPH** : 1,1-DiPhényl-2-PicrylHydrazyle.

**EP** : Eau Physiologique.

**GN** : Gélose Nutritive.

**Gram -** : Gram Négatif.

**Gram+** : Gram Positif.

**GR** : Géranium Rosat.

**GP** : Genévrier Phénicie.

**GV** : *Granulovirus*.

**H** : Heure.

**HE** : Huile(s) Essentielle (s).

**IA** : Indice d'Acide.

**IE** : Indice d'Ester.

**IR** : Indice de Réfraction.

**IS** : Indice de Saponification.

**I%** : Pourcentage d'Inhibition.

**ISO** : Organisation Internationale de Normalisation.

**ITGC** : Institut Technique des Grandes Cultures.

**Kb** : Kilobases.

**Kg** : Kilogramme.

**KOH** : Hydroxyde de potassium.

**Min** : Minute.

**mL** : Millilitre.

**Mm** : Millimètre.

**Mg** : Milligramme.

**NPV** : *Nucleopolyhedrovirus*.

**OMS** : Organisation Mondiale de la Santé.

**Op** : Pesticides Organophosphorés.

**Oc** : Pesticides Organochlorés.

**P** : Plante.

**pH** : potentiel d'Hydrogène.

**PP** : Produits Phytosanitaires.

**S** : *Sclerotinias*.

**SAB** : Sabouraud.

**SGH** : Système Général Harmonisé.

**SM**: Solution Mère.

**USDA-NRCS**: United States Department of Agriculture Natural Resources Conservation Service.

**T** : Temps.

**T** : *Trichoderma*.

**UFC** : Unité Formant Colonie.

**UV- Vis** : UltraViolet- Visible.

**Vit C** : Vitamine C.

**WHIPC**: World Health International Programme on Chemical.

## Liste des tableaux

<b>Tableau 1</b>	Classification OMS des pesticides.....	04
<b>Tableau 2</b>	Classification des pesticides selon SGH.....	05
<b>Tableau 3</b>	Types des pesticides.....	06
<b>Tableau 4</b>	Pesticides du groupe des carbamates.....	07
<b>Tableau 5</b>	Certains des modes d'action des pesticides.	08
<b>Tableau 6</b>	Dénombrement des colonies obtenues sur gélose nutritive à partir des dilutions décimales.....	42
<b>Tableau 7</b>	Résultats de purification des bactéries et des champignons.....	43
<b>Tableau 8</b>	Aspect des colonies sélectionnées pour l'étude microbiologique.....	44
<b>Tableau 9</b>	Examen macroscopique des champignons.....	45
<b>Tableau 10</b>	Examen microscopique des champignons.....	46
<b>Tableau 11</b>	Examen macroscopique des bactéries.....	47
<b>Tableau 12</b>	Résultat de la galerie API 20 E de la souche B1.....	49
<b>Tableau 13</b>	Résultat de la galerie API 20 E de la souche B2.....	49
<b>Tableau 14</b>	Résultat de la galerie API 20 E de la souche B3.....	49
<b>Tableau 15</b>	Propriétés physiques des huiles essentielles de <i>Pelargonium graveolens</i> et <i>Juniperus phoenicea</i> .....	49
<b>Tableau 16</b>	Résultat de l'aromatogramme des HE ( <i>Pelargonium graveolens</i> , <i>Juniperus</i> <i>phoenicea</i> ).....	54
<b>Tableau 17</b>	Diamètres des zones d'inhibition en mm des souches bactériennes et des champignons.....	56
<b>Tableau 18</b>	Composés majoritaires d'HE de <i>Pelargonium graveolens</i> déterminés par CG/SM .....	59

## Liste de tableau dans l'annexe

**Annexe 3** : composition chimique minoritaire d'huile essentielle de *Pelargonium graveolens*

## Liste des figures

<b>Figure 1</b>	Effets des pesticides sur le système endocrinien.....	10
<b>Figure 2</b>	Dispersion des pesticides dans l'environnement et voies de contamination.....	11
<b>Figure 3</b>	Impact des pesticides sur le sol.....	13
<b>Figure 4</b>	Micrographie électronique à balayage des spores(S) et des cristaux de <i>Bacillus thuringiensis</i> HD-125.....	16
<b>Figure 5</b>	Mode d'action des champignons.....	18
<b>Figure 6</b>	Image descriptive du colza .....	24
<b>Figure 7</b>	Localisation de l'ITGC.....	28
<b>Figure 8</b>	Champ de culture de colza.....	28
<b>Figure 9</b>	Plantes de colza implantées dans les pots en plastique.....	29
<b>Figure 10</b>	Huiles essentielles de <i>Pelargonium graveolens</i> et de <i>Juniperus phoenicea</i> .....	30
<b>Figure 11</b>	Préparation des dilutions decimals.....	30
<b>Figure 12</b>	Principe de la méthode de disque.....	38
<b>Figure 13</b>	Observation microscopique après coloration de Gram des bactéries B1, B2 et B348 (G×100).....	
<b>Figure 14</b>	Résultat du test Catalase.....	48
<b>Figure 15</b>	Pouvoir antioxydant de l'acide ascorbique ou Vit C.....	57
<b>Figure 16</b>	Pouvoir antioxydant de <i>P. graveolens</i> .....	57
<b>Figure 17</b>	Pouvoir antioxydant de <i>J. phoenicea</i> .....	57
<b>Figure 18</b>	Distribution en fonction du pourcentage des composants d'huile essentielle de <i>Pelargonium graveolens</i> .....	60
<b>Figure 19</b>	Profil chromatographique d'huile essentielle de <i>Pelargonium graveolens</i> .....	60

# Introduction

## *Introduction*

Pour protéger l'agriculture contre des ravageurs (insectes, rongeurs, champignons et les mauvaises herbes), il est impérativement d'utiliser les produits phytosanitaires. Mais ces derniers peuvent provoquer des dégâts sur les composants biotiques et même abiotiques (Mamadou, Mazih, 2015).

En Algérie, l'usage des pesticides (insecticides, raticides, fongicides et herbicides) est très excessif, accompagnant une agriculture intensive. Aussi, la consommation de ces produits est double, au niveau mondial, tous les 10 ans depuis 1945. L'ampleur de l'usage des pesticides se reflète dans leur valeur marchande qui avoisine 32 milliards de dollars, dont 3 milliards pour les pays en voie de développement. En Algérie environ 400 produits sont homologués (Bouziane, 2007).

Pour remédier aux problèmes causés à la nature des pesticides, on a eu recours aux «*biopesticides*». Ce sont des substances naturelles utilisées depuis des siècles et définis comme étant des « organismes vivants ou produits issus de ces organismes ayant la particularité de supprimer ou limiter les ennemis des cultures » (Thakore, 2006).

À l'heure actuelle, selon leurs caractéristiques, ils sont principalement divisés en trois catégories (microorganismes, végétaux ou animaux) et ont des nombreux avantages (Deravel et al, 2014). Certains rendent les plantes résistantes au stress abiotique, de manière générale, ils sont beaucoup moins nocifs que leurs homologues chimiques. Les biopesticides intéressent de plus en plus les agriculteurs notamment dans le cadre des stratégies de contrôle intégré (Deravel et al, 2014).

L'objectif principal de notre recherche est l'évaluation de l'activité des deux huiles essentielles *Pelargonium graveolens* et *Juniperus phoenicea* sur les microorganismes qui provoquent des phytopathologies.

Pour répondre à la problématique de notre recherche, nous avons scindé notre mémoire en deux chapitres :

- Le premier chapitre est relatif à l'étude bibliographique. Il comprend trois parties, la première partie est consacrée à l'étude des pesticides. La seconde partie s'intéresse à l'étude des biopesticides et enfin la dernière porte sur les huiles essentielles et la plante étudiée;
- Le deuxième chapitre est réservé à l'étude expérimentale qui est subdivisé en deux parties. La première présente les méthodes et les techniques utilisées pour la réalisation des expériences. La seconde se focalise sur la présentation et la discussion des résultats obtenus.

**Partie I**  
**Etude bibliographique**

---

## I. Pesticides

### I.1 Définition des pesticides

Il existe plusieurs définitions des pesticides. Le terme pesticide dérive du mot anglais « pest » qui désigne tout animal ou plante (virus, bactérie, champignon, ver, mollusque, insecte, rongeur, oiseau et mammifère) susceptibles d'être nuisibles pour l'homme et à son environnement et de « cide », du latin cardere signifiant frapper, abattre et tuer (Louchahi, 2015). Selon the International Labour Foundation for Sustainable Development, (2021) «les pesticides sont toute substance ou mélange de substances qui est destinée à repousser, détruire ou combattre les ravageurs (y compris les vecteurs de maladies humaines ou animales) et les espèces indésirables de plantes ou d'animaux causant des dommages ou se montrant autrement nuisibles durant la production. La transformation, le stockage, le transport ou la commercialisation des denrées alimentaires, des produits agricoles, du bois et des produits ligneux, ou des aliments pour animaux, ou qui peut être administrée aux animaux pour combattre les insectes, les arachnides et les autres Endo ou Ectoparasites».

### I.2 Classification des Pesticides

Les pesticides sont définis comme des substances ou des mélanges de substances destinés à contrôler, prévenir, détruire, repousser ou attirer tout organisme biologique considéré comme un organisme nuisible, qui caractérise plusieurs classes qui sont : insecticides, herbicides, fongicides, nématicides, avicides et rodenticides (Eldridge, 2008). Ils diffèrent selon leurs propriétés physiques et chimiques et identiques d'une classe à l'autre. Les pesticides synthétiques sont des produits chimiques fabriqués par l'homme, qui ne sont pas présents dans la nature (Drum, 1980). Ils sont classés en fonction de divers critères tels que : toxicité, organismes nuisibles cibles, la famille chimique, mode d'action ou pénétration.



### I.2.1 Classement en fonction de leur toxicité

La toxicité des pesticides dépend principalement de deux facteurs, à savoir la dose et le temps (NIPHM, 2018).

-La toxicité aiguë désigne la toxicité d'un être humain, animal ou végétal après un seul court terme d'exposition. Un pesticide ayant une toxicité aiguë élevée est mortel même lorsqu'une très petite quantité est absorbée. La toxicité aiguë peut être par voie orale, cutanée et par inhalation (NIPHM, 2018).

-La toxicité chronique est un effet toxique retardé de l'exposition à un pesticide qui concerne le grand public ainsi que ceux qui travaillent directement avec les pesticides en raison de l'exposition potentielle aux pesticides dans les aliments produits, eau et air (NIPHM, 2018).

L'OMS a mené une expérience sur les rats et autres animaux de laboratoire en administrant une dose de pesticide par voie orale et cutanée (Yadav et Devi, 2017), utilisant la dose létale estimée à DL50 (la dose de pesticide qui est nécessaire pour tuer la moitié des animaux testés lors de l'entrée dans le corps par voie orale ou cutanée) (Akashe, Pawade et al. 2018). La classification recommandée par l'OMS des « pesticides par danger » est la suivante (**tableau 1**) :

**Tableau 1** : Classification OMS des pesticides

Classe		DL 50 pour le rat (mg /kg de poids corporel)	
		Voie orale	Voie dermique
Ia	Extrêmement dangereux	<5	<50
Ib	Très dangereux	5 à50	50 à200
II	Modérément dangereux	50à2000	200à2000
III	Légèrement dangereux	Plus de 2000	plus de 2000
U	Peu susceptible de présenter un danger aigu	5000 ou plus	

Source:<https://www.who.int/fr/publications/i/item/9789240005662>

Suite à des révisions en 2009, ces catégories ont été harmonisées avec les catégories de danger de toxicité aiguë du Système Général Harmonisé (SGH) (**tableau 2**).

**Tableau 2:** Classification des pesticides selon SGH

Catégorie du SGH	Critères de classification			
	Orale		Dermique	
	DL50 (mg/kgp.c.)	Mention de danger	DL50 (mg/kg p.c.)	Mention de danger
Catégorie 1	< 5	Mortel en cas d'ingestion	< 5	Mortel en contact avec la peau
Catégorie 2	5-50	Mortel en cas d'ingestion	50-200	Mortel en contact avec la peau
Catégorie 3	50-300	Toxique en cas d'ingestion	200-1000	Toxique au contact de la peau
Catégorie 4	300-2000	Nocif en cas d'ingestion	1000-2000	Nocif au contact de la peau
Catégorie 5	2000-5000	Peut-être nocif	2000-5000	Peut-être nocif

**Source:** WHIPC, 2010.

### I.2.2 Classement selon l'organisme nuisible cible

Dans cette classification, les pesticides sont classés en fonction de l'organisme nuisible qu'ils doivent maîtriser (Base Applicateur, 2006). On distingue quatre grandes familles (Cottard, 2008), qui sont indiquées en détail dans le **tableau 3**.

**Tableau 3:** Types des pesticides.

Types des pesticides	Ravageurs/fonctions cibles	Exemples	Sources
Insecticide	Substance active ou préparation ayant la propriété de tuer les insectes ou perturber leur croissance ou leur développement.	-DDT (DichloroDiphénylTrichloroéthane) -Le chlorpyrifos -Arsenic -Azadirachtine	-(Décret exécutif n° 10 - 69 du 31 Janvier 2010). -(Yadav et Devi 2017). -(Aribi, Denis et al. 2020)
Fongicide	Substance active ou préparation qui inhibe le développement d'un champignon.	-Cymoxanil -Thiabendazole	
Herbicide	Préparation ayant la propriété de tuer les végétaux.	-2,4-D (acide 2,4-dichlorophénoxyacétique) -Atrazine	
Bactéricide	Utilisé pour tuer ou inhiber les bactéries dans les plantes ou le sol.	-Streptomycine, tétracycline, etc.	

C'est la méthode la plus utile pour classer les pesticides en fonction de leur composition chimique et la nature des ingrédients actifs. C'est ce genre de classification qui donne des indices sur l'efficacité, les propriétés physiques et chimiques des pesticides respectifs. La classification chimique des pesticides est assez complexe (<https://www.cchst.ca/oshanswers/chemicals/pesticides/general.html>).

Les matières actives des pesticides sont regroupées en deux catégories : inorganique et organique. Les pesticides inorganiques ne contiennent pas de carbone. Ils sont principalement composés de minéraux comme le cuivre ou le soufre, ou encore des sels de ces minéraux (Base Applicateur, 2006).

Les pesticides organiques contiennent du carbone. La plupart des pesticides organiques sont composés de dérivés du pétrole. Ils présentent des propriétés semblables (Base Applicateur, 2006). Ils sont classés en quatre groupes principaux, selon leur composition chimique (Buchel, 1983).

### ✓ *Pesticides organophosphorés*

Ce groupe des pesticides est très toxique. La plupart des pesticides organophosphorés sont des insecticides qui comprennent le phorate, le malathion, le diazinon et le diméthoate (Base Applicateur, 2006).

### ✓ *Pesticides du groupe des carbamates*

Les carbamates peuvent être des insecticides, des fongicides et des herbicides (**tableau 4**). Le niveau de toxicité chez les carbamates peut varier de légèrement toxique à très toxique (Base Applicateur, 2006).

**Tableau 4:** Pesticides du groupe des carbamates

Catégorie	Noms communs
Insecticides (carbamates)	Aldicarbe ,carbaryl, carbofuran ,méthomyl et pyrimicarbe
Herbicides (thiocarbamates)	Triallate et butilate
Fongicides (dithiocarbamates)	Manèbe , mancozèbe ,métirame et thirame

**Source :** Base Applicateur, 2006.

### ✓ *Pesticides organochlorés*

Les pesticides organochlorés sont rarement utilisés de nos jours parce qu'ils peuvent subsister pendant longtemps dans l'environnement. Certains insecticides organochlorés dont la persistance est plus courte et dont la toxicité est moindre pour les mammifères sont encore disponibles (Base Applicateur, 2006).

### **I.2.3 Classement selon le mode d'action ou le mode de pénétration**

Les pesticides peuvent être regroupés en fonction de la façon dont ils maîtrisent les organismes nuisibles cibles, soit leur mode d'action. Une liste de certains des modes d'action des pesticides est présentée dans le **tableau 5** (Base Applicateur, 2006).

**Tableau 5:** Certains des modes d'action des pesticides.

Types des pesticides	Description	Exemples
Pesticides systémiques	Le pesticide systémique est absorbé par les racines de la plante, se répand et la tue qui permettent de contrôler les organismes nuisibles lors qu'ils sont appliqués sur une région d'une plante ou d'un animal.	Acide 2,4-dichlorophénoxyacétique (2,4-D) et glyphosate
Pesticides de contact	Contrôlent les organismes nuisibles lors qu'ils entrent en contact direct avec ceux-ci.	Paraquat et diquat
Fumigants	Pesticides activés sous forme de gaz toxiques lors qu'ils sont appliqués.	Phosphine
Répulsifs	Pesticides qui dégagent une odeur qui repousse les organismes nuisibles de la région ou des plantes traitées.	Méthiocarbe
Poisons d'estomac	Ils pénètrent dans le corps du ravageur par la bouche et le système digestif	Malathion

**Source:** Base Applicateur, 2006.

### I.3 Intérêt de l'utilisation des pesticides

Les produits phytosanitaires font partie des solutions technologiques utilisées (Louchahi, 2015) :

✓ **En agriculture :** Les pesticides sont utilisés pour lutter contre les insectes, les parasites, les champignons et les mauvaises herbes. Ils sont considérés comme nuisibles à la production et à la conservation des cultures et des produits agricoles et pour traiter les habitations.

✓ **Dans l'industrie** : pour la préservation des produits (textiles, papiers) lors de la fabrication, la protection contre les moisissures, les algues et la désinfection des sites dans les circuits de refroidissement.

✓ **Dans la construction** : protéger le bois et les matériaux.

✓ **En médecine** : paludisme, malaria, typhus et autres épidémies (Ayad-mokhtari, 2012).

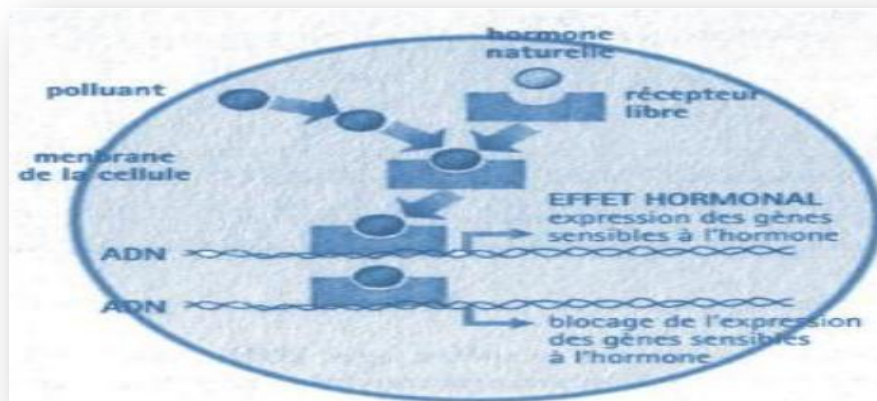
### **I.4 Effets toxiques des pesticides sur la santé et l'environnement**

Les produits phytosanitaires (PP) sont des pesticides spécifiquement utilisés en relation avec les végétaux et produits végétaux et sont considérés comme des facteurs de risque pour la santé humaine et animale (Gamet-Payraastre et Lukowicz, 2017).

Les pesticides peuvent être nocifs s'ils sont mal utilisés. Au moins la moitié des personnes empoisonnées et 75 % de celles tuées par les pesticides étaient des travailleurs agricoles. Les autres ont été empoisonnés en mangeant des aliments contaminés (Yadav et Devi, 2017). De plus, les produits phytosanitaires sont non seulement nocifs pour l'environnement mais présentent également des risques pour la santé humaine (Mehri, 2008).

#### **I.4.1 Effets sur la santé**

La plupart des pesticides sont des perturbateurs endocriniens (**figure 1**). Ils peuvent être toxiques pour l'homme s'ils sont absorbés en grandes quantités (Base Applicateur, 2006). Les pesticides peuvent pénétrer dans le corps humain par différentes voies (Sacramento, 2008). Il peut les absorber via les aliments et l'eau ou par contact avec la peau ou encore par inhalation (Ayad-mokhtari, 2012) de poussière et de vapeurs qui contiennent des pesticides. La durée et l'ampleur de l'exposition de la toxicité des produits chimiques déterminent le degré d'impact nocif sur la santé humaine qui dépend de la nature de la substance toxique. De plus, la toxicité d'un pesticide indique dans quelle mesure le produit est dangereux.



**Figure 1** : Effets des pesticides sur le système endocrinien (Rochefort et Jouannet, 2011).

### I.4.1.1 Voies d'exposition

L'exposition est le contact direct ou indirect avec un pesticide et peut avoir des effets sur les êtres vivants (Boland et al, 2004). Les risques d'exposition aux pesticides sont multiples (Ouchebbouk et Zibani- Amokrane, 2015). Donc il faut retenir qu'il y a trois voies de contamination : voie cutanée, respiratoire et digestive (orale).

### I.4.1.2 Toxicité des pesticides

La toxicité d'un pesticide indique dans quelle mesure le produit est dangereux. Ainsi, l'exposition aux pesticides chez l'homme nécessite deux niveaux de toxicité :

#### - *Toxicité aiguë (ou à court terme)*

La toxicité aiguë fait référence à la capacité d'une substance à provoquer des effets indésirables immédiatement ou en quelques heures après une absorption significative. L'intoxication aiguë survient lorsque les sujets sont exposés à de grandes quantités de pesticides (Louchahi, 2015). Selon la voie d'entrée et la dose de produit utilisée, les signes ou symptômes les plus fréquemment signalés lors d'une intoxication aiguë aux pesticides sont les suivants : maux de tête, nausées, vomissements, étourdissements, fatigue, perte d'appétit et irritation de la peau ou des yeux.

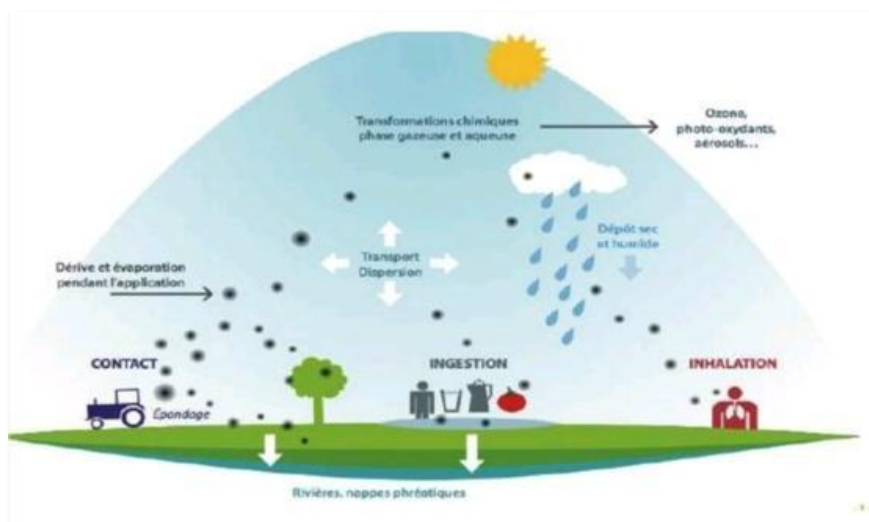
### - Toxicité chronique (ou à long terme)

C'est l'exposition répétée à des petites doses de pesticides sur de longues périodes peut provoquer une intoxication. Les symptômes peuvent apparaître de plusieurs semaines même plusieurs années. Ces signes sont souvent difficiles à reconnaître et le délai avant l'apparition de la maladie peut être long. Parfois, cela se produit lorsque la personne n'a pas été exposée à des pesticides depuis des années. En raison de cette période d'incubation caractéristique, il peut également être difficile de corrélérer l'exposition chronique aux pesticides avec les symptômes observés. Les symptômes peuvent prendre la forme d'un inconfort persistant auquel la personne est plus ou moins habituée (Samuel et Saint-laurent, 2001).

D'autres effets, tels que le cancer, les effets sur la reproduction et le développement et les effets sur les systèmes immunitaire et endocrinien sont également associés à l'exposition à certains pesticides (Samuel et Saint-laurent, 2001).

### I.4.2 Effets sur l'environnement

On utilise les pesticides pour traiter les maladies qui touchent la flore et améliorer la production des végétaux, mais ces produits ont des inconvénients sur l'environnement (air, sol et eau) (**figure 2**).



**Figure 2:** Dispersion des pesticides dans l'environnement et voies de contamination (Merghid et al, 2017).



### I.4.2.1 Effet des pesticides sur l'air

Le transfert des pesticides dans l'air est variable (de 25 à 75%) selon la nature du produit, mode d'utilisation, propriétés du sol et climatologie. Transfert dans l'atmosphère peut survenir pendant la cicatrisation : en dérivant ou en évaporant des gouttelettes, ou après traitement, par volatilisation de la surface après l'épandage ou l'érosion éolienne (IAUîdF / ORS, 2010).

### I.4.2.2 Effet des pesticides sur l'eau

Les pesticides peuvent atteindre les eaux de surface par le ruissellement, des plantes traitées et du sol. Ainsi, la contamination de l'eau par les pesticides est répandue. Plus de 90 % des échantillons d'eau et de poisson de tous les cours d'eau contenaient un ou, le plus souvent plusieurs pesticides (Aktar, et al. 2009).

### I.4.2.3 Effets des pesticides sur le sol

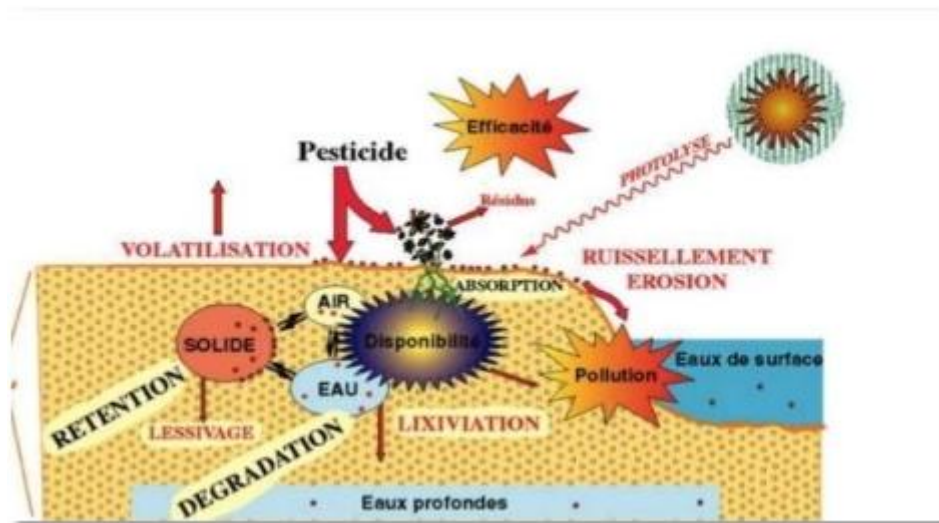
Le sol est la partie la plus superficielle de l'écorce terrestre, à l'interface entre géosphère, biosphère et atmosphère. Il possède des constituants minéraux, émanant de l'altération de la roche-mère, des constituants organiques, venus de la décomposition d'êtres vivants, et des constituants gazeux circulant dans ses interstices. Le sol est le produit de l'altération, du remaniement et de l'organisation des couches supérieures de la croûte terrestre sous l'action de la vie, de l'atmosphère et des échanges d'énergie qui s'y manifestent (Roger, 2015). Autrement dit, il est constitué des solides (minéraux, organiques) et des liquides (eau) et de gaz. Il a pour fonction de réservoir d'eau pour la plante et lui assure la presque totalité de ses besoins. Il permet aussi aux gaz, CO<sub>2</sub>, O<sub>2</sub>, N<sub>2</sub> et vapeur d'eau de circuler dans les interstices du sol. Comprenant également les constituants issus pour l'essentiel de transformation des résidus végétaux, animaux et corps microbiens (**figure3**) (<http://keepschool.com/fiches-de-cours /lycee/svtbiologie /solspropri etesformation.html>).

Le processus suivant détermine le devenir des pesticides dans le sol (Van Der Werf 1997) :

- Dégradation par les micro-organismes ;
- Dégradation chimique (p. ex. par hydrolyse) ;
- Rétention par des composants organiques et minéraux ;
- Absorption par les racines des plantes ;

- Volatilisation ;
- Effet de dilution par les mouvements d'eau.

La propagation des pesticides dans le sol à cause des micro-organismes ou de réactions chimiques se rapproche de la notion de dégradation : « Le taux de dégradation augmente généralement avec la température et avec la teneur en eau du sol » (Ibid). Un traitement important des sols avec des pesticides peut entraîner une baisse des populations de microorganismes du sol. «Si nous perdons les bactéries et les champignons, le sol se dégrade» (Merghid et al.2017, Op.cit).



**Figure 3:** Impact des pesticides sur le sol (Batsch, 2011).

## II. Biopesticides

Les produits phytosanitaires engendrent plusieurs effets indésirables pour l'homme et l'environnement. Dès lors, les recherches se sont orientées vers l'utilisation des produits biologiques.

### II.1 Définition des biopesticides

Le terme biopesticide est un « terme générique qui englobe différentes méthodes de contrôle des ravageurs de cultures» (Bertrand, s.d). Selon l'Institut du SAHEL, (2001) «le biopesticide est un Agent de lutte biologique formulé et appliqué d'une manière analogue à un pesticide chimique et dont le principe actif est un micro-organisme appartenant aux champignons, bactéries, virus et protozoaires. Les

nématodes, les produits biochimiques, les phéromones, les hormones, les dé-régulateurs de croissance, les organismes génétiquement modifiés et les extraits des végétaux ne sont pas concernés ». Patrice(2016) les définit également comme suit : « Les biopesticides (pesticides biologiques) sont des substances chimiques et des agents antiparasitaires issus de sources naturelles et pouvant être utilisés dans différents environnements de production».

### II.2 Catégories des biopesticides

Le concept de « biopesticide » n'est pas nouveau (Daravel, Krier et al. 2014). De nos jours, les biopesticides sont des biopesticides microbiens, biochimiques ou phytoprotecteurs, végétaux et animaux (Daravel, Krier et al. 2014 ; Fenibo, Ijoma et al. 2020 ; Kumar, Ramlal et al. 2021). Ainsi, même s'il n'existe pas de définition officielle, en agriculture, les biopesticides peuvent être définis comme : « Des organismes vivants ou des produits dérivés de ces organismes ayant pour particularité de limiter ou d'éliminer les ennemis des cultures » (Thakore 2006).

#### II.2.1 Biopesticides microbiens

Les pesticides microbiens constituent la plus grande classe de biopesticides à large spectre spécifiques aux ravageurs (Meenatchi et Negi, 2021). Ils ont été l'un des premiers biopesticides développés et largement utilisés. Cependant, seuls quelques insectes pathogènes ont été développés comme agents de lutte biologique. *Trichoderma*, en tant que pesticide microbien sûr et prometteur, a un bon potentiel de contrôle biologique et a été largement étudié (Leng, Zhang et al. 2011). Les biopesticides microbiens représentent moins de 1 % du marché mondial des cultures agrochimiques (Hajek, Delalibera et al. 2007). Ce type de biopesticides présente les avantages suivants :

- spécificité (non pathogène à non ciblé) ;
- synergie (peut être utilisée avec des pesticides synthétiques) ;
- respect de l'environnement (leurs résidus n'ont pas d'impact négatif sur l'écosystème ou les écorécepteurs) ;
- effets permanents (le micro-organisme devient une partie intégrante de la population d'insectes ou de son habitat présentant les effets inhibiteurs) ;

- amélioration de la croissance des plantes (Nawaz, Mabubu et al. 2016).

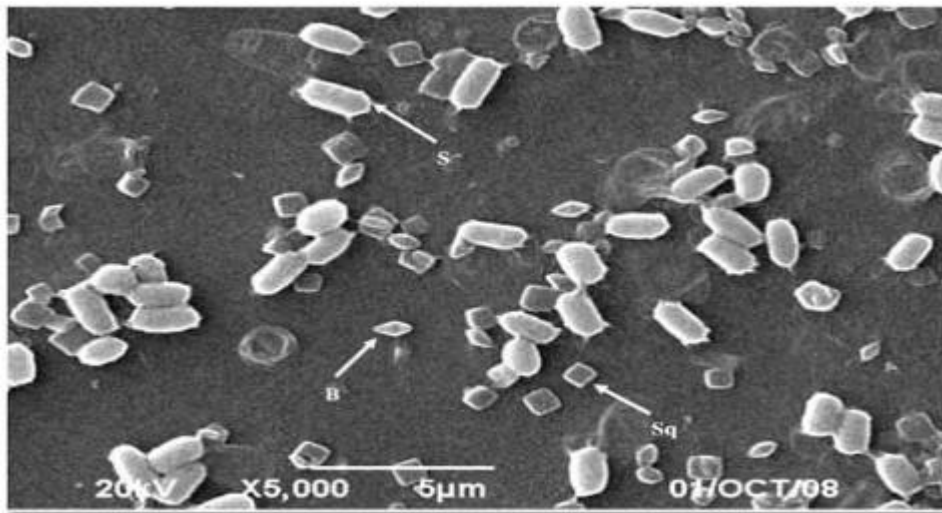
Toutefois, notre compréhension des biopesticides est entravée par des défis tels que la recherche scientifique détaillée, les études écologiques et les techniques de production à grande échelle (Haase, Sciocco-Cap et al. 2015). Ces défis peuvent différer des micro-organismes entomopathogènes connus et courants. Ils sont dérivés de micro-organismes, y compris des bactéries, des champignons, des virus, des protozoaires et des nématodes, ou de composés dérivés de ces organismes, qui affectent l'activité des ravageurs par le biais de toxines compétitives, pathogènes ou inhibiteur. Une grande partie de son efficacité repose sur des substances actives issues de microorganismes (Deravel, Krier et al. 2014).

### II.2.1 Bactéries

Différentes espèces bactériennes de la famille des Bacillaceae, font depuis longtemps, l'objet d'études sur leurs relations pathogéniques avec les invertébrés, en particulier les insectes. Ce groupe d'insectes pathogènes est représenté par *Bacillus thuringiensis* (Bt) (Ruiu 2018). Les biopesticides à base de *B.thuringiensis* (Bt) sont les plus vendus. Ils ont des propriétés insecticides (Deravel, Krier et al. 2014).

*Bacillus thuringiensis* est une bactérie omniprésente à Gram positif, sporulée, qui forme des protéines cristallines appelées delta-endotoxines pendant la phase stationnaire de son cycle de croissance (Schnepf, Crickmore et al. 1998). Les cristaux sont libérés dans l'environnement après la lyse de la paroi cellulaire à la fin de la sporulation et peuvent représenter 20 à 30 % du poids sec des spores. Cette bactérie est distribuée dans le monde entier (**figure 4**) (Rosas, 2009). De plus, Bt est couramment utilisée pour lutter contre les insectes sur les pommes de terre, les choux et d'autres cultures qui peuvent aussi également protéger les plantes. Les pesticides microbiens contrôlent généralement les ravageurs avec leurs métabolites toxiques spécifiques qui provoquent des maladies et peuvent également inhiber la formation d'autres microorganismes (Samada et Tambunan, 2020).

Parmi ces espèces figurent des souches de *Bacillus licheniformis*, *Bacillus amyloliquefaciens* ou *Bacillus subtilis*. Ces dernières sont capables de coloniser les racines des plantes et de produire des molécules de type lipopeptidique, à savoir des surfactines, des iturines et des fengycines. Ceux-ci peuvent activer les défenses des plantes ou avoir des effets antibactériens ou antifongiques directs (Deravel, Krier et al. 2014).



**Figure 4:** Micrographie électronique à balayage des Spores(S) et des cristaux de *Bacillus thuringiensis* HD-125(Rosas2009).

### II.2.2 Virus

Les autres importants producteurs de pesticides microbiens sont les baculovirus (Chang, Choi et al. 2003). Ils sont de famille des Baculoviridae, qui sont un groupe de grands virus à d'ADN bicaténaire, circulaire, fermé de façon covalente, dont la taille varie entre 80 à 200 kilobases (kb) (Lauzon, Garcia-Maruniak et al. 2006).

Les baculovirus sont présents chez les arthropodes, principalement les insectes qui sont hautement pathogènes contre de nombreux insectes nuisibles (Chen, Zhang et al. 2002 ; Clem et Passarelli , 2013 ; Deravel, Krier et al. 2014 ; Jhala, Baloda et al. 2020). Ils présentent de nombreux avantages en tant qu'outil dans le cadre du programme de lutte contre les insectes nuisibles, notamment la grande spécificité, l'absence d'effet néfaste sur les vertébrés et les plantes et la facilité de manipulation génétique (Nawaz, Mabubu et al. 2016). Ces virus sont bien connus pour leur utilité et leur polyvalence en tant que vecteurs d'expression génétique, pesticides biologiques et vecteurs de transduction de cellules de mammifères (Chen, Lin et al. 2011).

Il existe deux groupes de baculovirus : les *Nucleopolyhedrovirus*(NPV) et les *Granulovirus* (GV) (Herniou, Luque et al. 2001).

-Les virus du genre *Nucleopolyhedrovirus* (NPV) forment des corps d'occlusion polyédriques, chacun contenant de nombreux virions ;

-Tandis que les virus du genre *Granulovirus* (GV) forment des corps d'occlusion ovoïdes, contenant généralement 1 ou un faible nombre de virions (Granados 1980).

### II.2.3 Champignons

Outre les bactéries et les virus, plusieurs champignons entomopathogènes et leurs dérivés sont également utilisés comme pesticides microbiens. Ils présentent des activités contre les bio-agresseurs et sont exploités en tant que biopesticides (Lacey, Liu et al. 2011). *Coniothyrium minitans* est un microparasite qu'il a été isolé de sclérotas parasites de *Sclerotinia sclerotiorum*. Ce parasite fongique se retrouve dans le sol et est à l'origine de la maladie appelée pourriture blanche qui peut affecter de nombreuses cultures dont la carotte, l'haricot, le colza ou le tournesol (Campbell, 1947 ; Turner et Tribe, 1976 ; McQuilken et al, 2003).

Dans la nature, il se produit principalement dans les sclérotas de *Sclerotinia sclerotiorum* et *S. trifoliorum*, mais en laboratoire, il est capable d'infecter une gamme des autres sclérotas ascomycètes mais pas basidiomycètes (Whipps et Gerlagh 1992).

Plusieurs souches de champignons filamenteux du genre *Trichoderma spp* sont utilisées pour la protection biologique des plantes. Elles ont généralement une activité antifongique contre plusieurs agents pathogènes du sol ou des feuilles (Dodd, Lieckfeldt et al. 2003). *T.atroviride* est notamment utilisée pour la protection de la vigne. L'activité de bio-contrôle de cette souche est attribuée à plusieurs mécanismes d'action qui agissent en synergie. Parmi ces mécanismes d'action, il y a la compétition pour les nutriments, l'antibiose, ou la production d'enzymes spécifiques de dégradation des parois cellulaires comme les chitinases ou protéases (Brunner, Zeilinger et al. 2005). Les champignons agissent par pénétration du mycélium dans la cuticule des insectes dans l'hémicycle causant la mort des individus attaqués.

Alors que, les biopesticides à base des champignons ont un mode d'action différent (**figure 5**) :

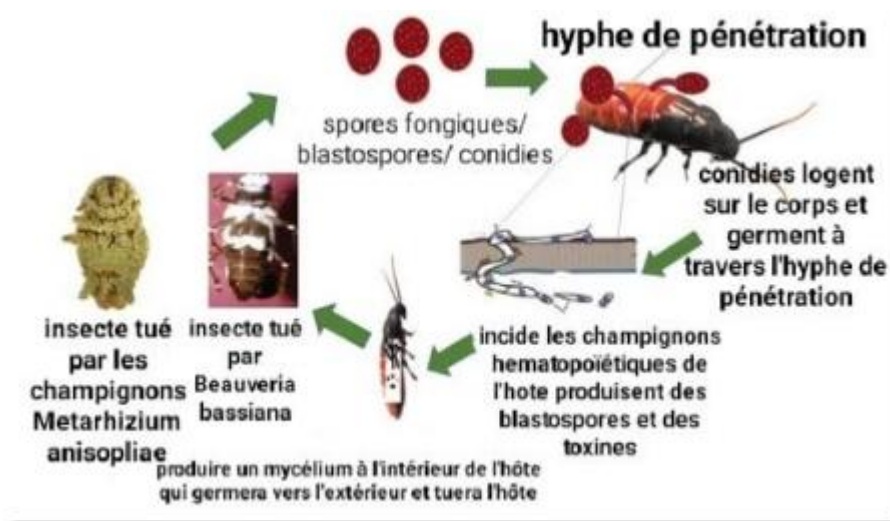
- Les spores fongiques appelées conidies adhèrent à la cuticule de l'hôte par fixation hydrophobe (Gabarty, Salem et al. 2014).

- La germination des spores se fera par la croissance filamenteuse de conidies appelées tubes germinaux ou par appressorium ;

- Il pénètre la cuticule par des enzymes hydrolytiques produites par eux. En outre, les acides organiques, les métabolites secondaires, les toxines et les composés antimicrobiens détoxifiants sont sécrétés par les champignons ;

- Dégradation biochimique de l'épiderme des insectes par des champignons entomopathogènes ;

- De plus, le mycélium interne se développe vers l'extérieur sous forme de spores et apparaît sur la surface externe des cadavres des insectes (Pedrini, Crespo et al. 2007 ; Gabarty, Salem et al. 2014).



**Figure 5:** Mode d'action des champignons (Meenatchi et Negi 2021).

### II.2.2 Biopesticides végétaux

Depuis des siècles, l'être humain utilise des biopesticides d'origine végétale pour lutter contre les ravageurs des cultures et des aliments stockés (Bancé, Ouédraogo et al. 2006). Plus de 2000 espèces végétales aux propriétés insecticides ont été recensées (Regnault-Roger et al. 2008), tel que : le tabac, le pyrethrum, le deriss, l'hellébore, le quassia, le camphor et le turpentine (Bouali et Ben merzouk, 2014). Il faut noter que l'insecticide à base d'extrait des graines d'*Azadirachta indica* est le plus utilisé. Le plus souvent, ces substances actives sont des métabolites secondaires qui, à l'origine protègent les végétaux des herbivores (Deravel, Krier et al. 2014).

### II.2.3 Biopesticides animaux

Ces biopesticides sont des animaux comme les prédateurs ou les parasites, ou des molécules dérivées d'animaux, souvent d'invertébrés comme les venins d'araignées, des

scorpions, des hormones d'insectes et des phéromones (Goettel et al.2001 ; Saidemberg et al. 2009 ; Aquiloni et al. 2010).

Les nématodes entomopathogènes sont aussi comptés comme biopesticides d'origine animale dans le contrôle des ravageurs des cultures. Dans ce groupe, ceux qui sont les plus utilisés et les plus étudiés dans la lutte des ravageurs appartiennent aux familles Steinernematidae et Heterorhabditidae qui regroupent des espèces libérant des bactéries symbiotiques appartenant respectivement aux genres *Xenorhabdus* et *Photorhabdus* (Griffin et al. 2005 ; Tabib et Kallel, 2016).

### II.3 Avantages des biopesticides

Les biopesticides affectent la cible nuisible. Ils sont souvent efficaces à des faibles doses et se décomposent rapidement, c'est-à-dire :

- Des produits peu toxiques et basés sur des ressources naturelles ;
- Certains biopesticides microbiens présentent des bénéfices supplémentaires en plus de leur rôle de protection ;
- Un intervalle de zéro jour avant la récolte (Palumbo-Sanders, 2018), c'est-à-dire que les pesticides se dégradent rapidement après leur application (en moyenne 6,5 jours contre plusieurs dizaines de jours pour la plupart des produits chimiques (Deravel, Krier et al. 2014).
- Peu de pollution environnementale ni de problèmes de santé car cela réduit l'utilisation des pesticides chimiques (<https://isaranet.fr/webcourses/MOOC/res/Biopesticides.pdf>).

### II.4 Inconvénients des biopesticides

Certains des avantages écologiques des biopesticides, comme leur faible rémanence ou le fait qu'un produit soit actif contre un faible spectre de nuisibles, peuvent être considérés comme des inconvénients. En effet, ces deux avantages écologiques combinés à leur activité souvent dépendante des conditions climatiques et environnementales rendent les biopesticides moins efficaces que leurs homologues chimiques. Certains professionnels de l'agriculture estiment que les biopesticides ne leur conviennent pas car ils ne sont pas assez efficaces. Ces derniers évaluent les



résultats du biopesticide à court terme, comme s'il s'agissait d'un substitut aux produits phytosanitaires chimiques (Deravelet *al*, 2014).

### **II.5 Rôles des biopesticides**

Dans le passé, la protection des cultures reposait essentiellement sur les pesticides chimiques synthétiques, mais leur disponibilité diminue maintenant en raison des nouvelles lois et législations et l'évolution du processus de résistance aux insectes (Jhala, Baloda et al. 2020).

Par conséquent, le biopesticide est la meilleure alternative aux pesticides chimiques synthétiques à base de micro-organismes vivants ou de produits naturels. Les pesticides biologiques ont démontré le potentiel de la lutte antiparasitaire et sont utilisés dans le monde entier (Chandler, Bailey et al. 2011). À cet égard, les biopesticides ont les effets suivants :

- Réduire la pollution de l'environnement ;
- Maintenir des équilibres écologiques ;
- Réduire l'effet résiduel des pesticides ;
- Conservation des ressources naturelles ;
- Préservation de la biodiversité, pollinisateurs et espèces non ciblées ;
- Préservation de la biodiversité ;
- Réduire les risques pour la santé humaine et animale ;
- Création d'emplois ruraux (Thakur, Devi et al. 2014).

## **III. Huiles essentielles et la plante étudiée de colza**

### **II.1 Huiles essentielles**

#### **II.1.1 Définition**

Une essence est une sécrétion naturelle élaborée par un organisme végétal tandis qu'une huile essentielle (HE) est un extrait naturel de plantes ou d'arbres aromatiques obtenue par distillation (Attou, 2017).

Selon la Pharmacopée Européenne (2008), une HE est un « produit odorant, généralement de composition complexe, obtenue à partir d'une matière première végétale botaniquement définie, soit par entraînement à la vapeur d'eau, par distillation

sèche soit par un procédé mécanique approprié sans chauffage», car il s'agit d'un produit parfumé et volatil, composé de molécules sécrétées par certains arbres et certaines plantes qui lui confèrent un parfum spécifique. Le terme « volatil » signifie que les huiles essentielles s'évaporent très rapidement. Il est impératif de les conserver dans un milieu approprié afin qu'elles gardent intacts leurs principes actifs (Moro Buronzo, 2008). Elles sont habituellement non huileuses au contact de la peau.

L'Association Française de Normalisation (AFNOR, 2000), a défini les huiles essentielles comme étant « des produits obtenus soit à partir de matières premières naturelles par distillation à l'eau ou à la vapeur d'eau, soit à partir des fruits de citrus par des procédés mécaniques et qui sont séparés de la phase aqueuse par des procédés physiques ».

### **II.1.2 Composition chimique**

Les composants des huiles essentielles sont généralement dits « aromatiques » en raison de leur caractère odoriférant et non pour indiquer leur structure chimique, ce qui peut prêter à confusion. Le nombre des molécules chimiquement différentes qui constituent une huile essentielle est variable. La plupart sont poly-moléculaires. Il existe quelques huiles dites mono- moléculaires, bi- et tri-moléculaires. Les huiles essentielles sont aussi homogènes ou hétérogènes dans leur composition au regard de la structure chimique des composés (Pibiri, 2001). Leurs composants peuvent être regroupés en six classes selon leur structure chimique :

- Les hydrocarbures, tel que le limonène dans l'huile de citron ;
- Les alcools, tel que le bornéol dans le camphrier de Bornéo ;
- Les esters, tel que le salicylate de méthylique dans l'huile de wintergreen ;
- Les aldéhydes, tel que l'aldéhyde benzoïque dans l'huile d'amandes amères ;
- Les cétones, telle que la menthone dans l'huile de menthe poivrée ;
- Les lactones, telle que la coumarine des haricots de tonka (Bousbia, 2013).

### **II.1.3 Méthodes d'extraction des huiles essentielles**

Il existe plusieurs méthodes d'extraction des huiles essentielles mais, selon la définition de l'AFNOR et l'ISO (Organisation Internationale de Normalisation), les méthodes utilisées pour extraire les huiles essentielles sont :

✓ **Hydrodistillation** : où le matériel végétal à extraire est en contact direct avec l'eau en ébullition, la vapeur d'eau produite entraîne avec elle les essences de la plante (Belleau, 1990 ; Baser et Buchbauer, 2009).

✓ **Entraînement à la vapeur** : à la différence de l'hydrodistillation, cette technique ne met pas en contact direct l'eau et la matière végétale à traiter (Marriott et al. 2001 ; Lahlou, 2004 ; Lucchesi, 2005). La vapeur qui contient l'H.E. est dirigée à travers un système de refroidissement (serpentin) où elle se liquéfie, ce qui sépare de fait l'huile essentielle de l'eau (Lesley, 1996 ; AFNOR, 1996).

✓ **Distillation** : est la méthode la plus ancienne et, également, la plus utilisée.

La distillation ne permet pas d'extraire la totalité des principes actifs lourds d'un végétal mais seulement les composés volatils entraînés (Bouguerra, 2012).

### II.1.4 Principaux domaines d'application

Les plantes aromatiques et leurs essences sont utilisées dans de nombreux domaines en raison de leurs propriétés nombreuses et variées :

#### ✓ **Pharmacologie**

De nombreuses HE se trouvent dans la formule d'un très grand nombre de produit pharmaceutique : sirop, gouttes et gélules. Elles rentrent aussi dans la préparation d'infusion telle que : la verveine, le thym, la menthe, etc. (Kerbouche, 2010).

#### ✓ **Aromathérapie**

L'aromathérapie appartient à la phytothérapie. L'aromathérapie est la médecine complémentaire qui dite « douce ». C'est une approche thérapeutique qui utilise des essences de plantes (Nguyen, 2015).

#### ✓ **Cosmétique**

Beaucoup d'huiles essentielles sont déconseillées par voie cutanée (cannelle, thym, origan, sarriette, orange, citron, etc). Car elles sont allergisantes, irritantes ou photo-sensibilisantes. Avant toute application sur la peau, il faut déposer quelques gouttes d'HE pure au pli du coude et vérifiez s'il y a une réaction de type allergique. Très peu d'HE sont applicables pures sur un pansement ou directement sur la peau, et seulement en cas de brûlure, d'inflammation cutanée ou d'hématome (huile essentielle d'hélichryse). Les doses conseillées sont 1 à 2 gouttes, 3 à 4 fois par jour au maximum. Toutefois, il est nécessaire de consulter un pharmacien. Généralement, l'huile essentielle

doit être diluée dans un corps gras (huile végétale par exemple) avant d'être appliquée sur la peau en massage (Lainé-Régnié, 2021).

### II.1.5 Rôles des huiles essentielles chez les plantes

Les huiles essentielles permettent aux plantes de s'adapter à leur environnement et assurer leur ultime défense, elles jouent divers rôles fonctionnels dans la plante tel que :

-Interaction plante-plante (végétale) : les huiles essentielles ont un effet toxique sur la germination de la graine des espèces qui partagent le même espace. Dans l'interaction plante animale pour leur protection contre les prédateurs (Chouitah, 2012).

-Cependant, les terpènes peuvent constituer un support de communication par le transfert d'information biologique et sélective et peut avoir d'autres fonctions potentielles, comme dans la stabilisation et la protection des membranes végétales contre les hautes températures (Djeddi, 2012).

Certains terpènes peuvent avoir une fonction énergétique. Ils sont stockés le jour et la nuit, car ils sont dégradés en Acétyl-CoA. En plus de toutes ces fonctions, les huiles essentielles ont des propriétés pharmaceutiques, car elles ont des propriétés antiseptiques, antispasmodiques, diurétiques, sédatives, cicatrisantes, etc.(Djeddi, 2012)

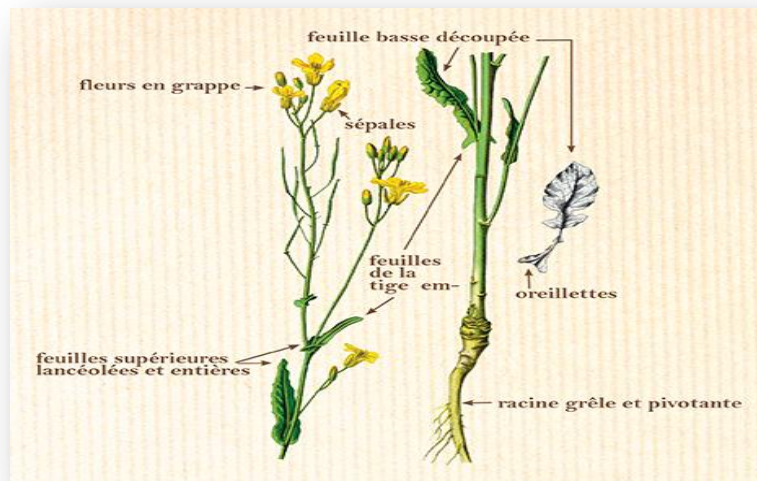
## II.2 Plante étudiée de colza

### II.2.1 Description

Le colza (*Brassica napus* L.) (**figure 6**) est une plante oléagineuse domestiquée depuis seulement quelques centaines d'années. Le colza fait partie du genre *Brassica*, de la famille des Brassicaceae. Ils sont des plantes dicotylédones, majoritairement herbacées, dont la disposition en croix des quatre pétales des fleurs leur a valu comme second nom de crucifères. Cette famille comprend 430 genres et 3600 espèces (Bailleul, 2012). Le colza est surtout cultivé pour la production d'huile. L'huile végétale est un produit de consommation courante. L'huile de colza est utilisée en alimentation humaine sous forme « directe » (Fargue, 2002).

Le colza a des feuilles vertes bleuâtres foncées, glauques, glabres ou portant quelques poils épars près de la marge, partiellement embarrassantes. La tige est assez ramifiée, mais ce caractère varie selon les variétés et les conditions du milieu ; les

ramifications prennent naissance à l'aisselle des feuilles supérieures de la tige, et chacune se termine par une inflorescence (la position des fleurs sur la tige d'une plante) (Bendana, 2008).



**Figure 6:** Image descriptive du colza (<https://www.rebelle-sante.com/index.php/rebelle-sante-ndeg-214/botanique/le-colza>).

### II.2.2 Cycle de vie

*Brassica napus* L. est une plante annuelle. Elle a besoin de températures basses et de journées courtes (typiquement en hiver) pour pouvoir vernaliser et fleurir au printemps. Les graines sont semées peu de temps après la récolte, typiquement en septembre. Les graines germent durant l'automne, développant des racines en pivot et des feuilles courtes pour atteindre le stade rosette. Après l'hiver et la vernalisation, la montaison a lieu au printemps. La tige principale se développe et produit des ramifications au bout desquelles apparaissent des inflorescences. La floraison commence alors que la montaison n'est pas finie et s'étale sur plus d'un mois. La fleur est hermaphrodite. Elle produit un nectar attractif pour les insectes. Le pollen est aggloméré et peut être transporté par les insectes ou le vent. Les siliques se forment tandis que la floraison n'est pas terminée. A maturité, les siliques déhiscentes éclatent et libèrent chacune une vingtaine de graines à moins d'un mètre de distance de la plante mère (Colbach, Clermont-Dauphin et Meynard, 2001; (Bailleul ,2012).

### ✓ *Classification botanique*

Selon USDA-NRCS 2014, le colza appartient au :

**Règne :** Plantes (règne végétal).

**Sous-règne :** Trachéobiontes (plantes vasculaires).

**Super-embranchement :** Spermatophytes (plantes à graines).

**Embranchement :** Magnoliophytes (plantes à fleurs).

**Classe :** Magnoliopsides (dicotylédones).

**Sous-classe :** Dilléniidées.

**Ordre :** Capparales.

**Famille :** Brassicacées (famille de la moutarde).

**Tribu :** Brassiceae.

**Genre :** *Brassica* L. (moutarde).

**Espèce :** *Brassica napus* L. (canola et colza).

### ✓ *Nomination*

**Nom scientifique :** *Brassica napus* L.

**Nom local :** Moutarde.

**Nom français :** Colza.

**Nom anglais :** Rapeseed.

Partie II  
Etude expérimentale

---

### I. Matériel et méthodes

#### I.1 Lieu de travail

L'objectif principal de notre étude est de rechercher les huiles essentielles ayant une activité antagonique *in vitro*. Notre recherche porte principalement sur les champignons et les bactéries qui contaminent l'espèce *Brassica napus* L. L'expérimentation a été réalisée au niveau de l'ITGC (Station Expérimentale : Institut Technique des Grandes Cultures), les laboratoires pédagogiques «microbiologie, biochimie et chimie<sup>1</sup>» de recherche « Valorisation des Substances Naturelles » de l'université Djilali Bounaama-Khemis Miliana.

#### I.2 Présentation de la station d'échantillonnage de colza

Selon Monsieur Ben Taiba Bilal, l'ITGC est un Etablissement Public à caractère Administratif (EPA), à vocation scientifique et technique, place sous la tutelle du ministère de l'Agriculture, du Développement Rural et de la Pêche(MADRP) en1965.

Cette station est parmi neuf stations de l'Institut Technique des Grandes Cultures. Elle est chargée du développement des grandes céréales (des céréales d'hiver et d'été, des légumineuses alimentaires, des fourrages et des cultures industrielles). Elle est située sur la route nationale N°14 dans la Wilaya de Ain Defla (**figure 07**). Sa zone d'action couvre, en plus de la Wilaya de Ain Defla, la Wilaya de Chlef.

Elle a pour mission d'étudier et de résoudre les problèmes liés à la production des céréales et des grandes cultures. Les principaux objectifs de la station sont :

- Développement et l'augmentation des grandes cultures ;
- Amélioration de la production sur les plans qualitatif et quantitatif ;
- Modernisation de l'agriculture à travers le transfert de technologie et des nouvelles techniques agricoles en concordance avec le développement rural, socio-économique et environnemental.





**Figure 7:** Localisation de l'ITGC (Google MAP 2022).

### I.3 Matériel biologique

#### I.3.1 Plante étudiée de colza

Trois plantes de colza contaminées non traitées ont été récoltées sur champ l'ITGC de Khemis Miliana (Station Expérimentale : Institut Technique des Grandes Cultures), durant le mois de mars 2022. Les échantillons ont été placés dans des sacs en plastique et transportés au laboratoire de l'université où ils ont été plantés dans des pots en plastique (**figure 8**), afin de mener l'expérimentation sur des échantillons de feuilles contaminées.



**Figure 8:** Champ de culture de colza.



**Figure 9:** Plantes de colza plantées dans les pots en plastique.

### I.3.2 Huiles essentielles

Dans ce travail nous a été fourni par Dr Saifi Mounir (enseignant chercheur à l'université de Khemis Miliana).de deux flacons de 200 mL d'HE de *Pelargonium graveolens* et *Juniperus phoenicea*, préparés après notre formation sur l'extraction des huiles essentielles. Cette formation a été réalisée le 26 mars 2022 par Dr Saifi au niveau de l'université Djilali Bounaama de Khemis Miliana. Ces huiles essentielles de géranium rosat et de genévrier phénicie sont préparées au niveau de son entreprise Aromabiol située à Bordj Bou Arreridj.

#### ✓ *Pelargonium graveolens*

L'huile essentielle de *Pelargonium graveolens* est extraite par hydrodistillation, à partir des feuilles fraîches ou légèrement fanées de la plante *P.graveolens*. Les teneurs en HE sont très faibles, avec un rendement de 0,15 % à 0,25 % (**figure 10**) (Boukatem, 2010).

#### ✓ *Juniperus phoenicea*

*Juniperus phoenicea* est une plante appartenant à la famille des cupressacées (Mathon 1984). Son huile essentielle est obtenue par hydro distillation, à partir des rameaux et des fruits. Le rendement en huile essentielle est variable selon la sous-espèce et la partie de la plante étudiée (Mansouri, Satrani et al. 2011) (**figure 10**).



**Figure 10:** Huiles essentielles de *Pelargonium graveolens* et de *Juniperus phoenicea*.

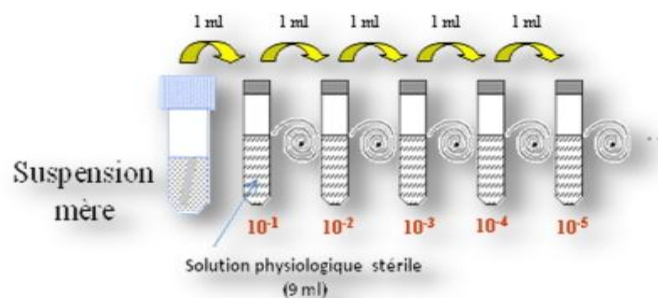
### I.4 Méthodes

#### I.4.1 Isolement des microorganismes

Les trois plantes contaminées du colza sont nommées comme suit : plante 1 (P1), plante 2 (P2) et plante3 (P3). On coupe ensuite un petit morceau d'une feuille de chaque plante contaminée qui est mis dans un tube stérile contenant 9 ml de l'eau physiologique stérile pour préparer des dilutions décimales. Le résultat obtenu est agité au vortex pendant 10min. Ces mélanges sont appelés les solutions mères (SM) (SM1 : tube de P1, SM2 tube de P2 et SM3 tube de P3).

##### I.4.1.1 Dilutions décimales

Une série de 5 tubes à essai est utilisée contenant chacun 9ml d'eau physiologique. Les dilutions sont réalisées à partir de SM1 jusqu'à  $10^{-5}$ . On répète l'opération pour SM2 et SM3 (**Figure 11**).



**Figure 11:** Préparation des dilutions décimales

([https://www.inrs.fr/publications/bdd/metropol/fiche.html?refINRS=METROPOL\\_147](https://www.inrs.fr/publications/bdd/metropol/fiche.html?refINRS=METROPOL_147))

### I.4.1.2 Préparation des milieux de culture

#### A. Milieu gélose nutritive

- Suspendre 23 grammes de la poudre du milieu nutritif dans 1 litre d'eau distillée ;
- Chauffer jusqu'à ébullition pour dissoudre complètement le milieu ;
- Stériliser par autoclave à une pression de 120 °C pendant 15 minutes ;
- Après l'autoclavage, laissé refroidir à 45-50 °C ;
- Verser le milieu nutritif dans des boites de Pétri (jusqu'à ce que l'agar soit solidifié) ;
- Conserver les boites au réfrigérateur à 3 °C ([https://microbiologie-clinique.com / G % C3%A9lose-nutritive.html](https://microbiologie-clinique.com/G%20%20lose-nutritive.html)).

#### B. Milieu Sabouraud

- Suspendre 65,0 grammes du milieu Sabouraud en poudre dans 1 litre d'eau distillée ;
- Porter à ébullition pour dissoudre complètement le milieu ;
- Stériliser par autoclave à une pression de 120°C pendant 15 minutes ;
- Refroidir à 45-50°C ;
- Bien mélanger et verser dans des boîtes de Pétri stériles.

### I .4.1.3 Ensemencement des microorganismes

Le milieu de culture GN est coulé dans des boites de Pétri. Après solidification du milieu, on ensemence avec un écouvillon qui est imbibé de chaque dilution. On incube ensuite les boites de Pétri à 37°C pendant 24h et à 25°C pendant 4jours.

### I.4.1.4 Purification

Après incubation, chaque colonie des champignons est repiqué dans le milieu SAB et les bactéries dans le milieu GN à l'aide d'une pipette Pasteur stérile. Cette opération a été effectuée dans des boites contenant le même milieu et dans les mêmes conditions d'incubation. Le but de cette opération est l'obtention des colonies pures qui vont faciliter après l'identification macroscopique et microscopique (Guiraud, 2003).

### I.4.2 Identification

Pour l'identification des microorganismes, il existe deux modalités : ancienne et récente. La plus ancienne est basée sur des critères phénotypiques. La plus récente quant à elle, s'appuie sur des critères moléculaires (Paolozzi *et al*, 2019). On a utilisé la méthode ancienne dans notre recherche c'est-à-dire qu'on a fait une observation macroscopique (forme, taille, couleur) et microscopique.

#### I.4.2.1 Identification Macroscopique

##### A . Identification des champignons

Après la purification et l'incubation pendant 4 jours, on commence l'identification macroscopique par la vérification de (Dufresne, 2021) :

- La couleur recto et verso ;
- L'Aspect ;
- La vitesse de croissance.

##### B. Identification des bactéries

Les principaux caractères étudiés pour l'identification des bactéries sont (Mergoud et Belmessikh, 2021) :

- La forme (circulaire, rhizoïde, irrégulière, filamenteuse) ;
- Le relief (convexe, bombé, plat, bossue, en forme de cratère) ;
- Le contour (régulier, ondule, filamenteux, boucle, lobe) ;
- La surface (lisse ou rugueuse) ;
- La couleur ;
- L'opacité (opaque, translucide) ;
- La consistance (sèche, crémeuse, muqueuse).

#### I.4.2.2 Identification Microscopique

##### A. Identification des champignons

Pour l'identification microscopique il faut vérifier les caractères suivants (Dufresne, 2021) :

- Hyphes : septés, non septés, larges ( $> 4 \mu\text{m}$ ), étroits ( $< 4 \mu\text{m}$ ) ;
- Présence ou absence de conidiophores et déterminer leur forme : simple, ramifié ;
- Forme de cellules conidiogènes : annélide, phialide...

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

### B. Identification des bactéries

Nous avons réalisé les tests suivants pour l'identification microscopique des bactéries :

- Test de catalase

L'enzyme catalase c'est une enzyme qui accélère la décomposition de peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ) en eau ( $H_2O$ ) et en oxygène gazeux ( $O_2$ ) (Boussena, 2020). On essuie la lame avec de l'alcool, puis on dépose une goutte d'eau oxygénée à 10 volumes. A l'aide d'une pipette Pasteur boutonnée, on ajoute l'inoculum bactérien et on observe la réaction :



- Coloration de Gram

C'est un test essentiel et obligatoire, qui est utilisé pour différencier les bactéries Gram positives des bactéries Gram négatives. Sur une lame on réalise un frottis des bactéries à l'aide d'une pipette Pasteur, puis on applique la coloration de Gram. La première étape de cette coloration est réalisée par la fixation de frottis par la chaleur, la seconde se fait par la coloration par violet de gentiane, après 1 minute on fait un rinçage.

Durant la troisième étape, quelques gouttes de lugol sont déposées sur la lame qu'on rince après 1 minute. La quatrième étape consiste à utiliser de l'alcool pendant 30 secondes suivie du rinçage. La dernière étape est la coloration par la fuchsine puis un rinçage après 1min. A la suite du séchage on effectue l'observation microscopique (Larpent et Lairpent, 1990).

- Galerie API 20 E

La galerie API (Analytical Profile Index) est un système standardisé pour l'identification des Enterobacteriaceae et autres bacilles à Gram négatif non fastidieux, comprenant 21 tests biochimiques miniaturisés, ainsi qu'une base de données.

Elle contient également 20 microtubes contenant des substrats déshydratés. Les micro-tubes sont inoculés avec une suspension bactérienne qui reconstitue les tests. Les réactions produites pendant la période d'incubation se traduisent par des virages colorés spontanés ou révélés par l'addition de réactifs. La lecture de ces réactions se fait à l'aide du tableau de lecture et l'identification est obtenue à l'aide du Catalogue Analytique ou d'un logiciel d'identification (Bio Mérieux, 2009).

Le processus de l'ensemencement de la galerie passe par 7 étapes :

- 1 : de l'eau est mise au fond de la boîte, c'est l'étape de l'incubation ;
- 2 : dans cette étape on fait sortir la galerie et on la met dans la boîte ;
- 3 : une fois la galerie dans la boîte on prélève une colonie sur la dite boîte ;
- 4 : la colonie prélevée est mise dans 5ml d'eau physiologique ou dans le milieu API ;
- 5 : remplir les tubes de la galerie (le tube seul sauf pour les caractères encadrés : tube et cupule) ;
- 6 : mettre ensuite dans cupules de vaseline pour les caractères soulignés ;
- 7 : c'est l'étape de l'incubation de la galerie à la température indiquée ( $36\pm 1^{\circ}\text{C}$  en général).

### I.4.3 Paramètres physicochimiques des huiles essentielles

Les indices physiques (indice de réfraction ( $I_R$ ), et pH) et chimiques (indice d'acide, indice de saponification et indice d'ester) sont étudiés pour déterminer les caractéristiques des HE.

#### I.4.3.1 Paramètres physiques

##### ✓ Indice de réfraction

C'est le rapport entre le sinus de la vitesse de la lumière à une longueur d'onde définie, passant de l'air dans l'huile maintenue à une température constante (Novidzro, et al. 2019).

##### - Principe

Mesurage à l'aide d'un réfractomètre convenable de l'indice de réfraction de l'échantillon liquide à une température constante (Benbada, 2012).

##### - Protocole

Nous avons effectué la mesure d' $I_R$  des HE (*P. graveolens* et *J. phoenicea*) à l'aide d'un réfractomètre de marque Abbe. Nous avons lu sa valeur directement sur le réfractomètre fixée à  $20^{\circ}\text{C}$ . Pour ce faire, on a procédé comme la suit :

- Etalonner par l'eau distillée dont leur indice de réfraction est connu ( $I_R$  (eau) = 1,333) à la température fixée à  $20^{\circ}\text{C}$  ;
- Nettoyer les prismes et déposer quelques gouttes d'HE ;
- Regarder dans l'oculaire et tourner le bouton de réglage d' $I_R$  pour amener les zones sombres et éclairées au centre du réticule ;
- Supprimer les irisations pour obtenir une ligne nette entre les deux zones ;

-Noter les valeurs de l'indice de chaque HE par l'échelle de lecture.

### ✓ **Indice de pH**

Cet indice ou potentiel d'hydrogène permet de mesurer l'acidité ou la basicité d'une solution. Une solution de pH = 7 est dite neutre ; < 7 acide ; et > 7 basique (<https://www.chosesasavoir.com/lindice-ph-a-t-ete-invente/>).

#### - **Protocole**

- Verser quelques gouttes d'HE sur un papier pH ;
- Laissez-le sécher pendant quelques secondes ;
- Après le changement de la couleur du papier, on la compare avec une gamme de couleurs qui varient selon le pH.

### **I.4.3.2 Paramètres chimiques**

Outre des propriétés physiques, on peut par des méthodes chimiques déterminer les indices suivants : acide et acidité, ester et saponification.

#### ✓ **Indice d'acide**

Indice d'acide ( $I_A$ ) est le nombre de milligrammes d'hydroxyde de potassium (KOH) nécessaire pour neutraliser les acides gras libres contenus dans un gramme d'HE (Seddik, 2010).

#### ✓ **Acidité**

Il exprime le pourcentage d'acides gras libres contenus dans un corps gras (Kouidri, 2008).

#### - **Principe**

Il consiste à un dosage acido-basique correspondant à la neutralisation qui se traduit par la réaction chimique suivante :



#### - **Protocole**

1g d'HE, 5mL d'éthanol à 96% et environ 5 gouttes de l'indicateur coloré phénophtaléine sont introduits dans un erlenmeyer. On neutralise le liquide par une solution d'hydroxyde de potassium (KOH) 0,5N contenue dans la burette jusqu'à ce que la couleur de la solution vire au rose (dosage acido-basique).  $I_A$  est calculée par la formule suivante :



$$IA = \frac{56,1 \times C \times V}{m}$$

Dans laquelle :

**V** : Volume de KOH titré en mL ;

**C** : Concentration de la solution de KOH en mol/mL ;

**m** : masse d'HE en g.

L'acidité (A) exprimée en mg KOH/g d'huile est obtenue par la formule suivante :

$$A\% = \frac{IA}{2}$$

$I_A$  : Indice d'Acide

### ✓ **Indice de saponification**

$I_S$  est défini comme le nombre de milligrammes d'hydroxyde de potassium (KOH) nécessaire pour saponifier un gramme de corps gras (Novidzro, Wokpor et al. 2019).

#### - **Principe**

Il s'agit de titrer l'excès d'hydroxyde de potassium en solution par l'acide chlorhydrique de (HCl) (Seddik, 2010). Il est calculé par l'équation suivante :

$$I_S = \frac{28,05 \times (V_0 - V_1)}{m_s}$$

Dans laquelle :

**V<sub>0</sub>** : Volume d'HCl utilisé pour l'essai à blanc en mL ;

**V<sub>1</sub>** : Volume d'HCl en mL ;

**m<sub>s</sub>** : masse de la prise d'essai en g.

#### - **Protocole**

Mettre 1g d'HE dans un ballon de 250 mL puis ajouter 25 mL de solution éthanolique de KOH (0,5N), ensuite on porte le mélange à ébullition dans un Electrothermal au reflux de marque Thermo Scientific en agitant de temps en temps

pendant 1H. Après refroidissement de la solution, on ajoute 3 gouttes de phénolphaléine. La solution est titrée avec HCl (0,5N). Le point d'équivalence a été mis en évidence de la même manière expliquée précédemment.

Parallèlement, on a réalisé un essai à blanc dans les mêmes conditions que précédemment.

### ✓ Indice d'ester

L'indice d'ester ( $I_E$ ) est le nombre de milligrammes de KOH nécessaire à la neutralisation des acides libérés par l'hydrolyse en milieu basique (saponification) des esters contenus dans 1 g d'essence (Novidzro, Wokpor et al. 2019).

#### - Principe

La potasse réagit sur les esters selon une réaction dite de saponification (Seddik, 2010) :



#### - Protocole

En pratique, cet indice n'est pas mesuré expérimentalement, mais il est plutôt déduit en faisant la différence entre l'indice de saponification ( $I_S$ ) et l'indice d'acide ( $I_A$ ) par l'équation suivante :

$$I_E = I_S - I_A$$

### I.4.4 Détermination de l'activité antimicrobienne *in vitro* d'HE vis-à-vis des microorganismes isolés :

#### I.4.4.1 Principe de l'aromatogramme

L'aromatogramme est une méthode permettant d'évaluer si une HE présente une activité antifongique ou antibactérienne, *in vitro*, vis-à-vis d'un champignon ou bactérie (Cuntzmann, 2017). Le principe repose sur l'ensemencement d'une suspension fongique et bactérienne sur une gélose de Sabouraud et sur une gélose nutritive déjà solidifiée et inoculée de la souche microbienne testée. Des disques en papier buvard de 6mm de diamètre, préalablement imprégnés de quantités connues d'huile essentielle avec des dilutions, sont alors placés en surface de la gélose préalablement ensemencée avec une culture bactérienne et fongique (Boutabia et al. 2016).

Après 4 jours d'incubation à une température de 25 °C pour les champignons et 24 h à température de 37°C pour les bactéries, l'inhibition de la croissance des champignons et des bactéries a été mise en évidence par la présence d'un halo clair

autour du disque imprégné d'huile. La présence et le diamètre de ce halo permettaient d'apprécier si l'huile était efficace et l'importance de cette huile par rapport aux champignons et bactéries étudiés (Cuntzmann, 2017).

Typiquement, sur la base du diamètre de la zone d'inhibition, les micro-organismes seront classés comme sensibles, modérés ou résistants (Wilkinson 2006).

### I.4.4.2 Ensemencement

Des suspensions bactériennes ont été prélevées des boîtes de Pétri, préalablement préparées. Elles ont été déposées dans 10ml de solution physiologique puis mélangées avec du vortex. Elles ont été réparties distinctement sur des boîtes gélosées de Sabouraud (SAB) pour les champignons. Quant aux bactéries, elles ont été coulées dans des boîtes de Pétri par la gélose nutritive (GN) :

-Prendre une goutte de la suspension bactérienne par pipette Pasteur puis faire un étalement sur GN.

-Imbiber un écouvillon dans une suspension fongique puis faire des stries assez serrées sur SAB.

-Laisser sécher la gélose et répéter l'action sur toutes les boîtes de Pétri.

Après ensemencement, des dilutions des huiles essentielles (concentrées, 1/2, 1/4, 1/8, et 1/12) sont préparées à l'aide du DMSO (DiMéthyle SulfOxyde), (C<sub>2</sub>H<sub>6</sub>OS). Dans chaque boîte de Pétri ensemencées on applique 6 disques :

- Le premier (A) est un disque contient 200 µl d'HE (*Pelargonium graveolens* et *Juniperus phoenicea*) pure et sans DMSO (solution mère) ;

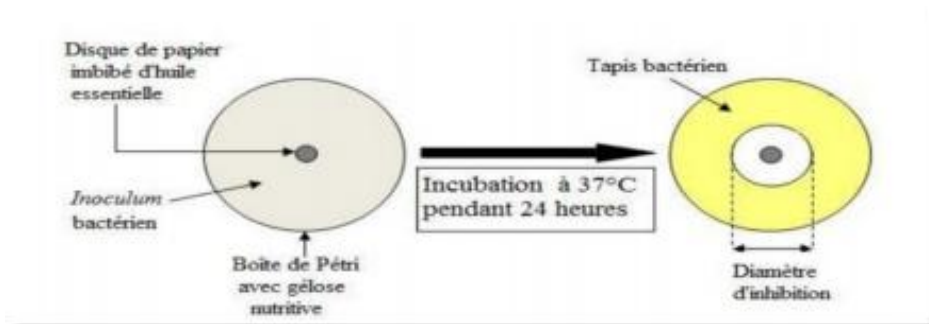
- Le deuxième (B) imbibé par 100 µl d'HE de (SM), diluée à 1/2 par le DMSO (Solution 2) ;

- Le troisième (C) imprégné par 100 µl de solution 2, diluée à 1/4 par le DMSO (S3) ;

- Le quatrième disque (D) imbibé par 100 µl de solution 3, diluée à 1/8 par le DMSO (S4) ;

- Le cinquième (E) est imbibé par la solution 4, diluée à 1/12 par le DMSO(S5) ;

- Le sixième est un témoin sans huile essentielle et sans DMSO (**figure 12**).



**Figure 12:** Principe de la méthode de disque (Aomari et Sehaki, 2018).

### I.4.4.3 Lecture

La formation de zone claire (zone d'inhibition) autour des disques indique qu'il y a une inhibition. La lecture a été faite par la mesure des diamètres des halos d'inhibition autour des disques.

### I.4.5 Activité Antioxydante des huiles essentielles

Cette méthode a été choisie pour sa facilité de mise en œuvre et sa fiabilité dans l'évaluation de l'activité antioxydante des huiles essentielles. Il s'agit du test 1,1-Diphényl-2-picrylhydrazyle (DPPH) (Toure 2015).

#### I.4.5.1 Préparation de la solution de DPPH

Le 1,1-Diphényl -2- Picrylhydrazyle (DPPH) est solubilisé dans l'éthanol absolu à raison de 2,5mg dans 100 mL.

#### A. Solutions d'huiles essentielles

Pour les tests antioxydants, les échantillons ont été préparés par dissolution dans l'éthanol soluble. Pour les deux HE, on prépare des solutions dans de l'éthanol (REF : SPO11371021-2.5L) absolu à raison de 100 mg/mL. Ces solutions dites solutions mères.

#### B. Piégeage du radical DPPH

##### - Principe

Cette méthode reste largement utilisée pour évaluer l'activité antioxydante des extraits de plantes végétales. Le test 1,1-Diphényl-2-Picrylhydrazyle est réalisé par la méthode décrite par Ben Ammar et al, 2009 qui permet de mesurer le pouvoir réducteur par le calcul de l'IC50 des substances antioxydantes contenues dans un extrait. Le DPPH est un radical libre de couleur pourpre qui devient jaune quand il est réduit par un donneur de proton H<sup>+</sup> (Parejo, Codina et al. 2000).

DPPH + AH

(Couleur pourpre)

DPPH-H + A

(Couleur jaune)

Où AH est un composé capable de céder un H<sup>+</sup> au radical DPPH.

### ✓ Mode opératoire

À partir d'une solution mère d'huile essentielle de 0,1 mg/mL, des solutions diluées de différentes concentrations (100, 25, 50 et 75 µg /mL) ont été préparées par double dilution successive dans l'éthanol. 50 µL de chaque extrait ainsi que le contrôle positif sont ajoutés à 2 mL de la solution éthanolique de DPPH. Les mélanges ont été agités au vortex et incubés dans l'obscurité à température ambiante pendant 30 min à la température du laboratoire. Les absorbances sont mesurées à 517 nm, à l'aide d'un spectrophotomètre de type Genesys 10 UV-Visible de marque Thermo. La vitamine C (0,1 mg/mL) qui est la substance de référence a été préparée dans les mêmes conditions puis utilisée comme étalon.

L'évaluation de l'activité antioxydante en utilisant la méthode DPPH est exprimée en pourcentage selon l'équation suivante :

$$I(\%) = \frac{(\text{Abs Control} - \text{Abs Extrait})}{\text{Abs Control}} \times 100$$

Avec :

I % : pourcentage d'inhibition

Abs control : Absorbance de la réaction contrôle contenant tous les réactifs sauf l'huile (T= 0 min).

Abs Extrait : Absorbance de l'échantillon contenant une dose d'huile testée (T= 30 min). La valeur de la concentration inhibitrice IC 50 représente la dose des huiles essentielles qui neutralise 50% des radicaux de DPPH (Toure 2015).

### **I.4.6 Analyse d'HE par chromatographie phase gazeuse couplée à la spectrométrie de d'HE**

Cette étape a été réalisée pour déterminer qualitativement et quantitativement la composition chimique d'huile essentielle qui a donné un net effet inhibiteur *in vitro* des microorganismes responsables des pathologies du colza.

#### **I.4.6.1 Définition**

La chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse est une méthode d'analyse qui combine la séparation et l'identification des constituants

chimiques d'un mélange complexe (Tranchant, Arpino et al. 1995). La méthode est basée sur la séparation des constituants à l'aide de la CPG et leur identification par la spectrométrie de masse (Bouderara, 2013). Elle s'applique aux composés gazeux ou susceptibles d'être vaporisés par chauffage sans décomposition.

### ✓ **Principe**

Le principe consiste à transférer les composés séparés par chromatographie en phase gazeuse par la phase mobile (le gaz vecteur) dans le spectromètre de masse au niveau duquel, ils vont être fragmentés en ions de masses variables dont la séparation sera en fonction de leur masse. L'identification est ensuite réalisée par comparaison des indices de rétention et des données spectrales (spectre de masse) des constituants individualisés avec les caractéristiques de référence contenue dans des bibliothèques de spectres (Maack et Sablier, 1994).

#### **I.4.6.2 Analyse qualitative et quantitative**

##### **A. Qualitative**

Il est maintenant bien admis que l'identification d'une substance passe par la connaissance des grandeurs de rétention dans des conditions expérimentales standardisées suivantes : le temps de rétention relatif calculé par rapport à un standard interne, l'indice Kovats assimilant la molécule à un alcane dont le nombre de carbone est fictif (calcul à partir d'une gamme d'alcane à température constante). Ces grandeurs relatives obtenues à l'aide de molécules standards, choisies pour leur probabilité de présence dans le mélange à analyser, sont confrontées à déterminer les pics chromatographiques d'un mélange.

##### **B. Quantitative**

L'analyse quantitative consiste à utiliser un étalon interne qui subira le même processus d'extraction que l'échantillon, et devra permettre le calcul des pertes dues aux opérations préliminaires à l'analyse en CPG. Cet étalon doit posséder une structure voisine de celle du ou des composés à doser, le calcul du coefficient de réponse relatif du composé à l'étalon et la connaissance de la quantité d'étalon interne ajoutée à l'échantillon, permettent alors un dosage quantitatif précis (Aurousseau, 2009).

### ✓ **Méthode**

L'analyse chromatographique d'HE a été effectuée avec un chromatographe en phase gazeuse type TQ 8030 couplé à un spectromètre de masse. La fragmentation est effectuée par impact électronique à 70 eV.

Les conditions opératoires sont :

- La température de la colonne est programmée de 40 à 250°C ;
- Le gaz vecteur est l'hélium dont le débit est fixé à 3 mL/min ;

- Le mode d'injection est du mode split ;
- Le mode de contrôle de débit avec pression de 49,5 KPa ;
- L'appareil est relié à un système informatique gérant une bibliothèque de spectre de masse Q3 Scan permettant de suivre l'évolution des analyses chromatographiques ;
- Le volume de l'échantillon injecté est 0.5  $\mu$ l d'huile pure.
- L'identification des constituants a été faite sur la base de la comparaison de leurs indices de rétention avec ceux des composés standards de la banque de données informatisée (Q3 Scan).

## II. Résultats et discussion

### II.1 Résultats

#### II.1.1 Isolement des microorganismes à partir des échantillons de colza

Des dilutions décimales ont été préparées à partir des micro-organismes isolés des plantes de colza récoltées. Après 24h d'incubation à 37°C, des colonies apparaissent sur la gélose nutritiveensemencée par les dilutions décimales. Les résultats sont représentés dans le **tableau 6**.

**Tableau 6:** Dénombrement des colonies obtenues sur gélose nutritive à partir des dilutions décimales.

Echantillons Dilutions	Nombre de colonies (UFC/mL)				
	10 <sup>-1</sup>	10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-3</sup>	10 <sup>-4</sup>	10 <sup>-5</sup>
Plante de colza 1 (P1)	105	81	76	40	22
Plante de colza 2 (P2)	113	100	97	46	60
Plante de colza 3 (P2)	90	69	59	44	30





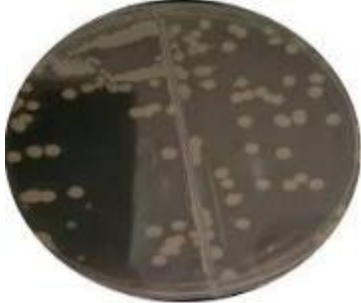

On observe à partir du tableau 6 que l'échantillon P1 contient entre 22 et 105 UFC par mL. Par contre celui de P2 contient entre 60 et 113 UFC par mL. Quant à l'échantillon 3, il a donné entre 30 et 90 UFC par mL. La gélose nutritive est un milieu favorable pour la croissance des bactéries qui ont contaminées le colza.

#### II.1.1.1 Purification des souches

A partir des colonies obtenues durant la première expérience, nous avons effectué un ensemencement sur les géloses nutritive et Sabouraud. Les boîtes de Pétri sont incubées à 37°C pendant 24h pour les bactéries et 25°C pendant trois jours pour les champignons (**tableau 7**).




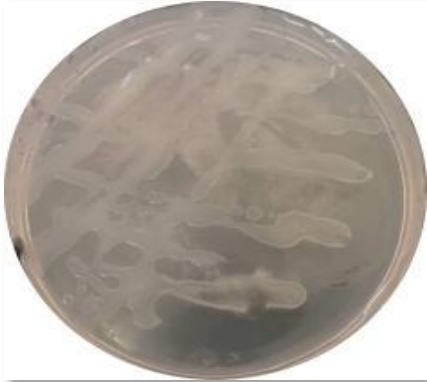

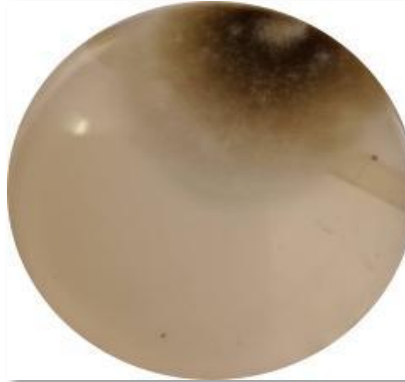



**Tableau 7:** Résultats de purification des bactéries et des champignons.

	GN	SAB
P1 10 <sup>-3</sup>		
P2 10 <sup>-3</sup>		
P3 10 <sup>-3</sup>		

**P1** : Plante 1 ; **P2** : Plante 2 ; **P3** : Plante 3 ; **GN** : Gélose Nutritive ; **SAB** : SABouraud

On observe dans le milieu SAB la formation des champignons de couleur noire et blanche. Sur milieu GN, il y a eu la formation des colonies orange, jaune et blanche ainsi que des champignons. Nous avons fait ensuite un deuxième et un troisième repiquage jusqu'à obtenir des colonies pures (**tableau 8**).

**Tableau 8:** Aspect des colonies sélectionnées pour l'étude microbiologique.

Milieu GN incubé pendant 24 h à 37°C		Milieu SAB incubé pendant 4 jours à 25° C	
Echantillon de la plante de colza			
			
B1	B2	P1	P2
			
B3		P3'N'	P3'B'

**B1** :Boite 1 ; **B2** :Boite 2 ; **B3** :Boite 3 ; **P** : Plante 1 ; **P2** :Plante 2 ;**P3' N'** : Plante 3 Noir ; **P3 'B'** :Plante 3 Blanche.





### II.1.2 Identification des microorganismes

Les microorganismes purifiés sont identifiés par un examen macroscopique qui est effectué après incubation. L'examen microscopique des champignons a été réalisé sur un frotti coloré au bleu de méthylène. Pour l'identification des bactéries nous avons réalisé : coloration de Gram, test de catalase et API E20.

#### II.1.2.1 Identification des champignons

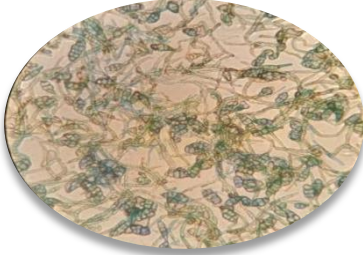
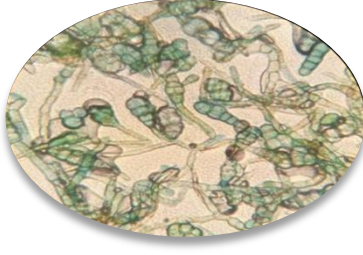
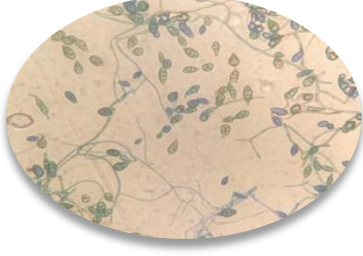
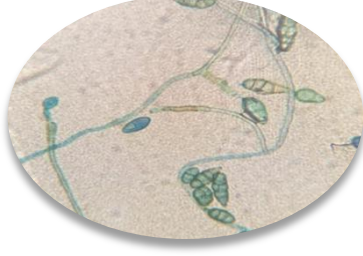
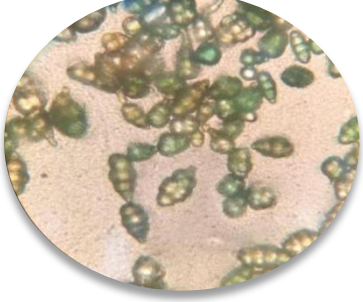
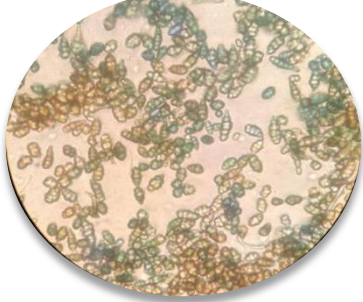
Le tableau suivant récapitule les résultats de l'examen macroscopique des champignons.

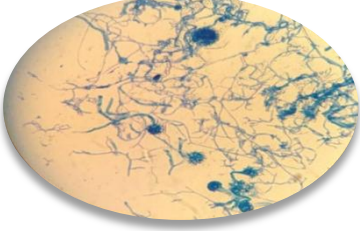
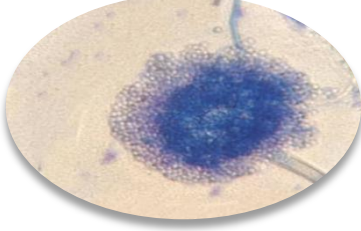
**Tableau 9:** Examen macroscopique des champignons.

Aspect sur gélose Sabouraud de l'échantillon de la plante de colza			
P1	P2	P3'N'	P3 'B'
			
Couleur : -Recto : marron -Verso : vert militaire Aspect : poudreux	Couleur : -Recto : dégradation de vert -Verso : gris Aspect : cotonneux	Couleur : -Recto : dégradation de marron à vert foncé -Verso : noir Aspect : peluche	Couleur : -Recto : blanc avec noir -Verso : jaune Aspect : granuleux

**P 1** : Plante 1 ; **P2** : Plante 2 ; **P3' N'** : Plante 3 Noir ; **P3 'B'** : Plante 3 Blanche.

**Tableau 10:** Examen microscopique des champignons.

Echantillon de plante du colza	Description	Observation microscopique		Espèce
P1	<ul style="list-style-type: none"> <li>-Hyphes : septés</li> <li>- Conidies : pluricellulaires</li> <li>-Présence des conidiospores</li> </ul>	G×40 	G×100 	Alternaria alternata
P2	<ul style="list-style-type: none"> <li>-Hyphes : septés</li> <li>- Conidies : pluricellulaires</li> <li>-Présence des conidiospores</li> </ul>			Alternaria alternata
P3'N	<ul style="list-style-type: none"> <li>-Hyphes : septés</li> <li>- Conidies : pluricellulaires</li> <li>-Présence des conidiospores</li> </ul>			Alternaria alternata

P3 'B'	<ul style="list-style-type: none"> <li>-Hyphes : septés</li> <li>- Conidies : unicellulaires</li> <li>-Présence des conidiospores</li> </ul>			Aspergillus niger
--------	--	--	---	-------------------


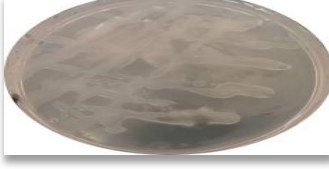

**P** : Plante 1 ; **P2** : Plante 2 ; **P3' N'** : Plante 3 Noir ; **P3 'B'** : Plante 3 Blanche

### II.1.2.2 Identification des bactéries

#### A .Examen macroscopique des bactéries

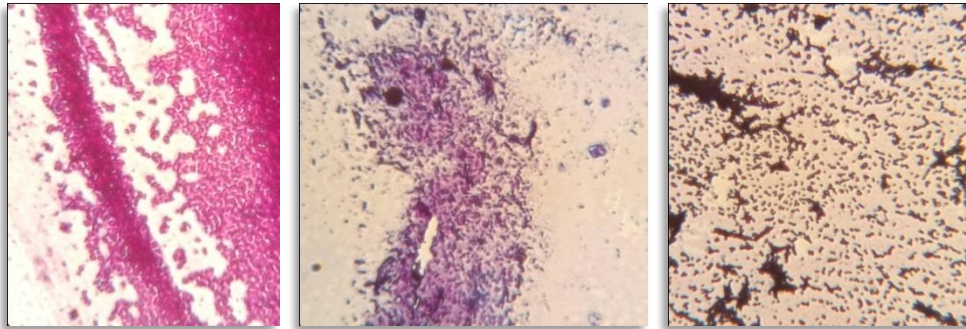
Les caractères macroscopiques des bactéries isolées sont présentes dans le **tableau 11**.

**Tableau 11:** Examen macroscopique des bactéries.

Echantillon de la plante de colza		
B1	B2	B3
		
Observation macroscopique		
<ul style="list-style-type: none"> <li>-Relief : Convexe</li> <li>-Contour : Régulier</li> <li>-Surface : Lisse</li> <li>-Couleur : Blanche</li> <li>-Opacité : Opaque</li> <li>- Consistance : Crémeuse</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>-Relief : Plat</li> <li>-Contour : Régulier</li> <li>-Surface : Lisse</li> <li>-Couleur : Transparente</li> <li>-Opacité : Translucide</li> <li>- Consistance : Sèche</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>-Relief : Convexe</li> <li>-Contour : Régulier</li> <li>-Surface : Lisse</li> <li>-Couleur : Blanche</li> <li>-Opacité : Opaque</li> <li>- Consistance : Muqueuse</li> </ul>

### B. Examen microscopique des bactéries

Les résultats des observations microscopiques des souches isolées et colorées par la méthode de Gram sont illustrés dans la **figure 13**.



**Figure 13:** Observation microscopique après coloration de Gram des bactéries B1, B2 et B3 (G×100).

A partir des feuilles contaminées du colza, nous avons identifié sous microscope optique des coques (B1 et B3) et une Bacille (B2).

### C. Test catalase

D'après le test de catalase, toutes les souches examinées possèdent cette enzyme catalase. Ce dernier décompose l'eau oxygénée en eau et en oxygène qui se dégage sous forme de bulles gazeuses (**figure 14**).



**Figure 14:** Résultat du test catalase.

### D. Identification des caractères biochimiques par Galerie API 20E

L'identification des caractères biochimiques des bactéries est réalisée par la Galerie API 20 E .Nous a permis de connaître les caractéristiques biochimiques des trois souches isolées. Les résultats sont présentés dans les **tableaux 12,13 et 14**.

**Tableau 12:** Résultat de la galerie API 20 E de la souche B1.

Tests	ONPG	ADH	LDC	ODC	CIT	H2S	URE	TDA	IND	VP	GEL	GLU	MAN	INO	SOR	RHA	SAC	MEL	AMY	ARA
Résultat	+	+	+	-	+	-	+	-	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+

**Tableau 13:**Résultat de la galerie API 20 E de la souche B2.

Tests	ONPG	ADH	LDC	ODC	CIT	H2S	URE	TDA	IND	VP	GEL	GLU	MAN	INO	SOR	RHA	SAC	MEL	AMY	ARA
Résultat	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+

**Tableau 14:** Résultat de la galerie API 20 E de la souche B3.

Tests	ONPG	ADH	LDC	ODC	CIT	H2S	URE	TDA	IND	VP	GEL	GLU	MAN	INO	SOR	RHA	SAC	MEL	AMY	ARA
Résultat	+	+	+	-	+	-	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Les souches B1 et B3 correspondent aux deux espèces *Klebsiella oxytoca* et *Klebsiella pneumoniae ssp pneumoniae* 1, respectivement. La souche B2 est un *Vibrio vulnificus*.

### II.1.3 Analyses physico-chimiques d'HE

Les propriétés physico-chimiques constituent un moyen de vérification et de contrôle de la qualité des huiles.

#### II.1.3.1 Indices physiques

Les résultats obtenus des caractères physiques sont présentés dans le **tableau 15**.

**Tableau 15:** Propriétés physiques des huiles essentielles de *Pelargonium graveolens* et *Juniperus phoenicea*.

Propriétés physiques	HE de Pelargonium graveolens	HE de Juniperus phoenicea
Indice de réfraction à 20 °C	1,467	1,468
Indice de pH	4,5	5,0

### ✓ Indice de réfraction :

Les indices de réfraction mesurés des deux huiles essentielles de *Pelargonium graveolens* et de *Juniperus phoenicea* varient entre 1,467 et 1,468, respectivement. Ces indices dépendent de la composition chimique qui augmente en fonction des longueurs des chaînes d'acides, de leurs degrés d'insaturation et de la température. La valeur de l'indice d'eau distillée est de 1,33.

L' $I_R$  des HE de *Pelargonium graveolens* et de *Juniperus phoenicea* est élevé par rapport à celui de l'eau distillée.

### ✓ Indice de pH

Le pH permet de déterminer le caractère acide, neutre ou basique d'une substance.

D'après le tableau précédent, le pH obtenu indique que nos huiles essentielles sont acides.

### II.1.3.2 Indices chimiques

Les résultats de la détermination des caractères chimiques des huiles essentielles obtenues par hydrodistillation sont :

### ✓ Indice d'acide

L'indice d'acide indique le comportement et la quantité des acides libres présents dans nos huiles.

On calcule les valeurs de l'indice acide et acidité de chaque huile par l'équation suivante :

$$IA = \frac{56,1 \times C \times V}{m}$$

- Pour HE de *Pelargonium graveolens*  $V = 0,2\text{mL}$ .

Donc :

$$IA = \frac{56,1 \times 0,5 \times 0,2}{1}$$

$I_A = 5,6 \text{ mg de KOH/g}$
---------------------------------



- Pour HE de *Juniperus phoenicea*  $V = 0,1\text{mL}$ .

Donc :

$$IA = \frac{56,1 \times 0,5 \times 0,1}{1}$$

$I_A = 2,8 \text{ mg de KOH/g}$
---------------------------------

D'après les calculs, l'huile essentielle de *J. phoenicea* présente un indice d'acide inférieur par rapport à celui d'huile essentielle de *P. graveolens*.

La formule suivante indique comment on a calculé l'acidité des HE :

$$IA\% = \frac{IA}{2}$$

- On a l'indice d'acide ( $I_A$ ) d'huile de *P. graveolens* (GR) = 5,6 mg de KOH/g.

Alors :

$$IA\% = \frac{5,6}{2}$$

$$I_A\% = 2,8\%$$

- $I_A$  de *J. phoenicea* (GP) = 2,8 mg de KOH/g.

$$I_A\% = 1,4\%$$

L'indice d'acidité de notre huile étudiée égale à 1,4%.

### ✓ Indice de saponification

Après saponification, nous avons ajouté trois gouttes d'indicateur coloré phénolphtaléine dont nous avons remarqué que l'HE était rose, mais après titrage avec un volume de HCl dans la burette on remarque que chaque HE reprend sa couleur. En revanche, un essai à blanc dans les mêmes conditions a montré une coloration rose par titrage de HCl.

Par la suite on calcule les valeurs de l'indice de saponification ( $I_S$ ) de chaque huile selon l'équation suivante :

$$I_S = \frac{28,05 \times (V_0 - V_1)}{ms}$$

On a :  $V_B = 23\text{mL}$  ;  $V_{P.graveolens} = 20\text{ mL}$  et  $V_{J.phoenicea} = 11,9\text{ mL}$

- $V_{GR} = 20\text{mL}$  :

$$I_S = \frac{28,05 \times (23 - 20)}{1}$$

$$I_S = 84,15 \text{ mg de KOH/g}$$

- $V_{GP} = 11,9\text{mL}$  :

$$I_S = 316,35 \text{ mg de KOH/g}$$

Les indices de saponification des deux huiles sont égales à 316,35 mg de KOH/g pour *J.phoenicea* et 84,15 mg de KOH/g pour *P.graveolens*.

### ✓ Indice d'ester

La neutralisation des acides libérés par l'hydrolyse en milieu basique (saponification) des esters contenus dans 1 g d'essence permet de calculer l'indice d'ester ( $I_E$ ) par l'équation suivante :

$$I_E = I_S - I_A$$

On a :

- Pour *P.graveolens*:

$I_S = 84,15 \text{ mg de KOH / g d'huile}$  ;  $I_A = 5,6 \text{ mg de KOH/g d'huile}$ .

Alors :

$$I_E = 84,15 - 5,6$$

On obtient :

$$I_E = 78,55 \text{ mg de KOH/g}$$

- Pour *J.phoenicea*:

$I_S = 316,35 \text{ mg de KOH / g d'huile}$  ;  $I_A = 2,8 \text{ mg de KOH/g d'huile}$ .

On obtient :



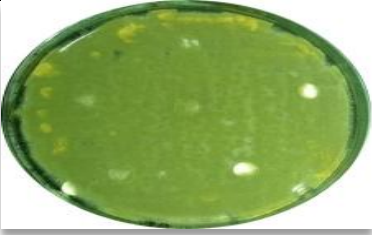

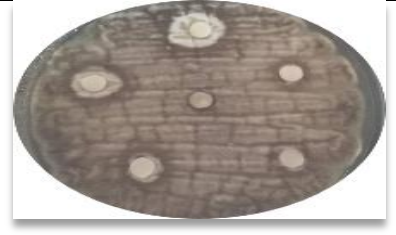
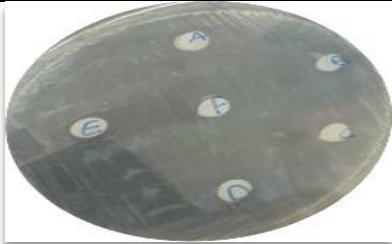

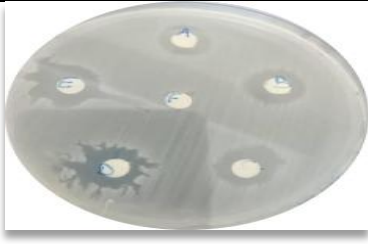
$$I_E = 313,55 \text{ mg de KOH/g}$$

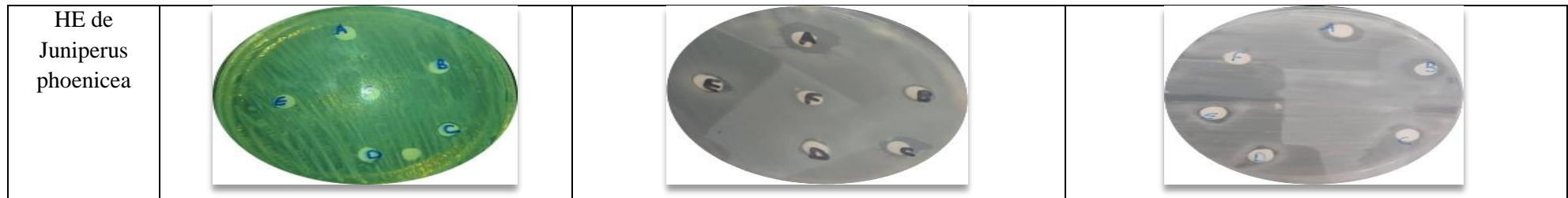
L'indice d'ester d'HE de *J.phoenicea* est supérieur à celui d'HE de *P.graveolens*.

### **II.1.4 Activité antimicrobienne *in vitro* des HE vis-à-vis des microorganismes isolés**

La méthode d'aromatogramme est utilisée pour déterminer l'activité antibactérienne et antifongique des huiles essentielles : *Pelargonium graveolens* et *Juniperus phoenicea*. C'est la méthode la plus répandue pour l'évaluation de l'activité antimicrobienne des huiles essentielles. Elle a été testée sur les différentes souches bactériennes et fongiques isolées de nos échantillons du colza. Les résultats sont présentés par les **tableaux 16 et 17**.

Tableau 16: Résultat de l'aromatogramme des HE (*Pelargonium graveolens*, *Juniperus phoenicea*).

Echantillon de la plante de colza			
Souches fongiques	<i>Alternaria alternata</i>	<i>Alternaria alternata</i>	<i>Aspergillus niger</i>
HE de <i>P. graveolens</i>			
HE de <i>J. phoenicea</i>			
Souches bactérienne	B1, <i>Klebsiella oxytoca</i>	B2, <i>Vibrio vulnificus</i>	B3, <i>Klebsiella pneumoniae</i> ssp <i>pneumoniae</i> 1
HE de <i>Pelargonium graveolens</i>			



D'après le **tableau 16**, *Pelargonium graveolens* et *Juniperus phoenicea* ont présenté *in vitro* une activité inhibitrice de la croissance de certains germes microbiens. Si on prend en considération les diamètres d'inhibition, l'HE de *Pelargonium graveolens* était plus actif sur *Aspergillus niger*, *Alternaria alternata*, *Vibrio vulnificus* et *Klebsiella pneumoniae ssp pneumoniae1*. Mais *Klebsiella oxytoca* a montré une grande résistance vis-à-vis des deux HE. L'huile extraite de *Juniperus phoenicea* n'a aucun effet inhibiteur des champignons *Aspergillus niger* et *Alternaria alternata*. Par contre, *Vibrio vulnificus* et *Klebsiella pneumoniae ssp pneumoniae1* ont une sensibilité envers l'HE de *Juniperus phoenicea*.

Les valeurs de diamètre des zones d'inhibition des microorganismes par les huiles essentielles utilisées dans notre travail après incubation sont présentés dans le **tableau17**.

**Tableau 17:** Diamètres des zones d'inhibition en mm des souches bactériennes et champignons.

Huile de <i>Pelargonium graveolens</i> (GR)						
Souches microbiennes	Diamètres des zones d'inhibition (mm)					
	A	B	C	D	E	F (témoin)
<i>Alternaria alternata</i> (P1)	20	15	-	-	-	-
<i>Alternaria alternata</i> (P2)	-	-	-	-	-	-
<i>Alternaria alternata</i> (P3N)	-	-	-	-	-	-
<i>Aspergillus niger</i> (P3'B')	25	30	-	-	-	-
<i>Klebsiella oxytoca</i> (B1)	-	-	-	-	-	-
<i>Vibrio vulnificus</i> (B2)	15	12	14	20	-	-
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ssp <i>pneumoniae</i> 1(B3)	10	10	10	15	15	-
Huile de <i>Juniperus phoenicea</i> (GP)						
Souches microbiennes	Diamètres des zones d'inhibition (mm)					
	A	B	C	D	E	F (témoin)
<i>Alternaria alternata</i> (P1)	-	-	-	-	-	-
<i>Alternaria alternata</i> (P2)	-	-	-	-	-	-
<i>Alternaria alternata</i> (P3N)	-	-	-	-	-	-
<i>Aspergillus niger</i> (P3'B')	-	-	-	-	-	-
<i>Klebsiella oxytoca</i> (B1)	-	-	-	-	-	-
<i>Vibrio vulnificus</i> (B2)	15	-	10	-	-	-
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ssp <i>pneumoniae</i> 1(B3)	10	10	10	18	-	-

A: HE / DMSO (SM); B: dilution 1/2; C: dilution 1/4; D: dilution 1/8; E: dilution 1/12; F : témoin.

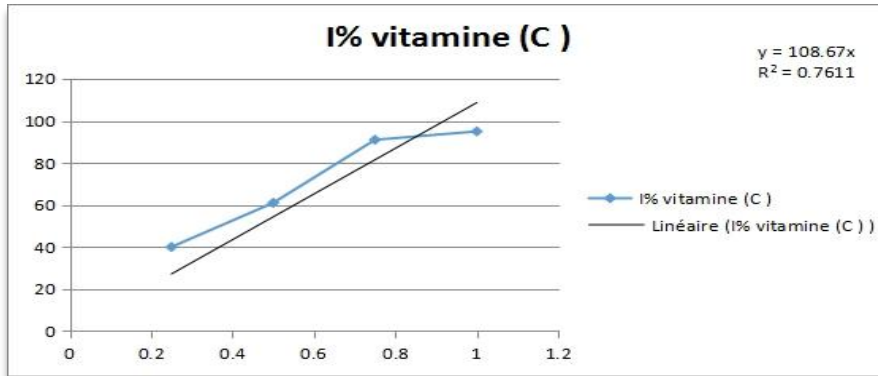
- : résistance, B1 : Boite 1 ; B2 : Boite 2 ; B3 :Boite3 ; P1 : Plante 1 ;P2 : Plante 2 ; P3' N' : Plante 3 Noir ; P3 'B' : Plante 3 Blanche.

D'après le **tableau 17**, nous pouvons dire que notre HE de *Pelargonium graveolens* a une activité antifongique et une activité antibactérienne. Cet effet antagoniste se traduit par des zones d'inhibition dont les diamètres varient entre 25 et 30mm.

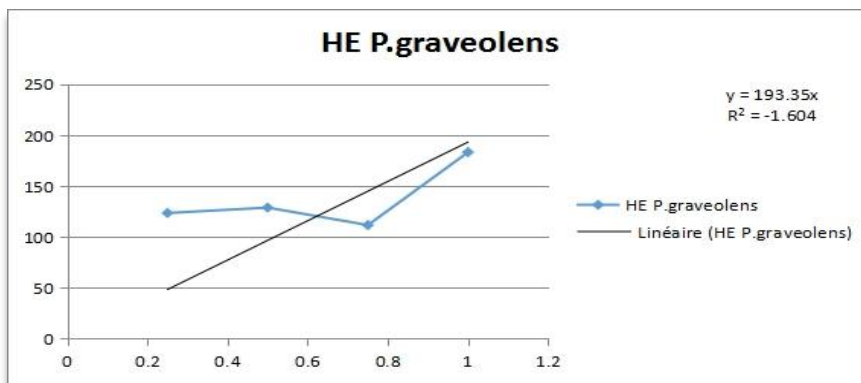
En revanche, pour les champignons aucune pousse n'est observée avec l'HE de *Juniperus phoenicea*. Tandis que les bactéries présentent une sensibilité à cette huile. Cela se traduit par des zones d'inhibition dont le diamètre est compris entre 10 et 18mm.

### II.1.5 Activité antioxydante

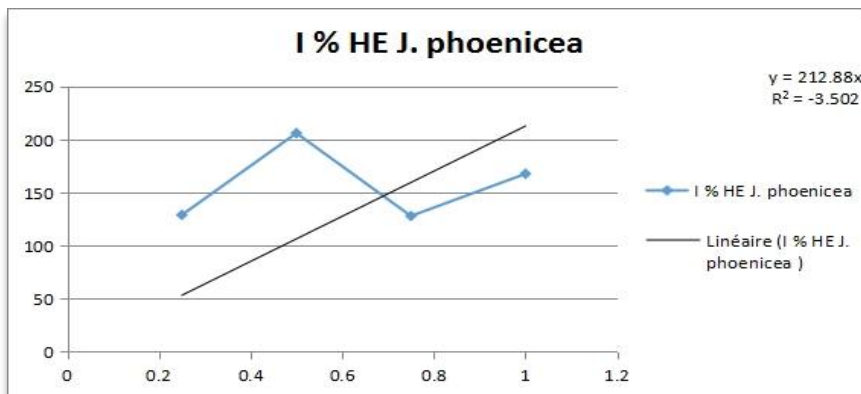
L'activité antioxydante des huiles essentielles de *P. graveolens*, et *J. phoenicea* a été évaluée à savoir, la vitamine C et par la méthode de piégeage du radical libre DPPH. A partir des représentations graphiques tracés par l'exel 2007, on a pu mesurer la valeur IC 50 des deux huiles et l'acide ascorbique (Ac asc) ou Vit C (**figures 15, 16 et 17**).



**Figure 15:** Pouvoir antioxydant de l'acide ascorbique ou Vit C.



**Figure 16:** Pouvoir antioxydant d'HE de *P. graveolens*.



**Figure 17:** Pouvoir antioxydant d'HE de *J. phoenicea*.

## Résultats et Discussion

Les résultats du pouvoir antioxydant des HE testées montrent que le pourcentage d'inhibition d'HE de *P. graveolens* est supérieur à 180% avec une concentration de l'ordre de 100µg/ml. Pour HE de *J. phoenicea* et l'acide ascorbique, le taux d'inhibition est estimé à 200% et 90%, avec des concentrations égales à 0.45µg/mL et 100 µg/mL, respectivement.

On a calculé la valeur de l' IC50 de chaque échantillon par la méthode suivante :

- Pour Ac asc : on utilise l'équation de  $Y=108,6x$

On a  $IC_{50}= 108,6x$                        $50=108,6x$

$$IC50 = \frac{50}{108,6}$$

IC50 de l'acide ascorbique égale 0,46µg/mL.

- Pour HE de *P. graveolens* :  $Y=193,3x$                        $50=193,3x$

$$IC50 = \frac{50}{193,3}$$

IC50 d'huile de *P. graveolens* égale 0,25µg/mL.

- Pour HE de *J. phoenicea* :  $Y=212,8x$

$$IC50 = \frac{50}{212,8}$$

IC50 d'huile de *J. phoenicea* égale 0,28µg/ml.

Ces résultats montrent qu'IC 50 d'HE de *J. phoenicea* est supérieure à celle d'HE de *P. graveolens*.

### II.1.6 Analyse d'huile essentielle de *Pelargonium graveolens* par CG/SM

Dans cette partie de travail, nous avons utilisé un appareil de chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse, il sert à analyser et identifier des constituants chimiques d'huile essentielle de *Pelargonium graveolens* qui a donné un net effet inhibiteur des microorganismes responsables de la détérioration des feuilles de colza.

Les analyses qualitative et quantitative d'huile essentielle a permis d'identifier et de quantifier 19 composés chimiques majoritaires, qui ont été présentés dans le **tableau 18**. Ces composés identifiés sont listés suivant l'ordre de leur prédominance.



## Résultats et Discussion

**Tableau 18 :** Composés majoritaires d'HE de *Pelargonium graveolens* déterminés par CG/SM.

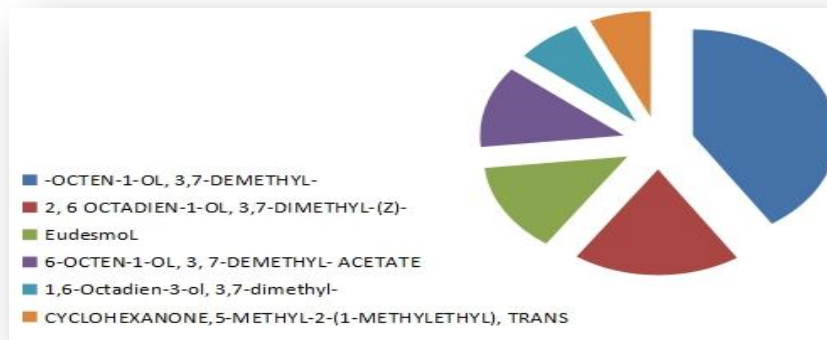
N	Composition chimique d'HE	Area%
01	6-OCTEN-1-OL, 3,7-DIMETHYL-	25,50
02	2,6-OCTADIEN-1-OL3, 7-DIMETHYL-,(Z)-	11,78
03	Eudesmol<gamma->	8,57
04	6- OCTEN-1-OL, 3,7-DIMETHYL-, ACETATE	7,81
05	1,6-Octadien-3-ol, 3, 7-dimethyl-	4,60
06	CYCLOHEXANONE, 5-METHYL-2-(1-METHYLETHYL)-, TRANS-	4,32
07	2,6- OCTADIEN-1-OL3, 7-DIMETHYL-, FORMATE,(E)-	2,89
08	Viridiflorene	2,79
09	1,6-CYCLODECADIENE,1-METHY-5-METHYLENE-8-(1-METHYLETHYL)-, [S-(E, E)].	2,22
10	2,6-octadien-1-ol3, 7-dimethyl-, (Z)-	2,07
11	Viridiflorol	1,95
12	Linalylformate	1,68
13	NAPHTHLENE,1,2,3,5,6,8A-HEXAHYDRO-4,7-DIMETHYL-1-(1-METHYLETHYL)-,	1,67
14	PHENYLETHYL TIGLATE 1	1,62
15	ROSE OXIDE B	1,54
16	Caryophyllene	1,28
17	2, 6,10- DODECATRIEN-1-OL, 3, 7,11-TRIMETHYL-	1,16
18	2,6-Octadien-1-OL, 3,7-dimethyl-, (Z)-	1,15
19	Naphthalene, 1,2,3,4,4a,5,6,8a-octahydro-7-methyl-4-methylene-1-(1-methyle)	1,05
<b>Totale</b>		<b>85,65%</b>

% : abondance relative aux composés mesurés.

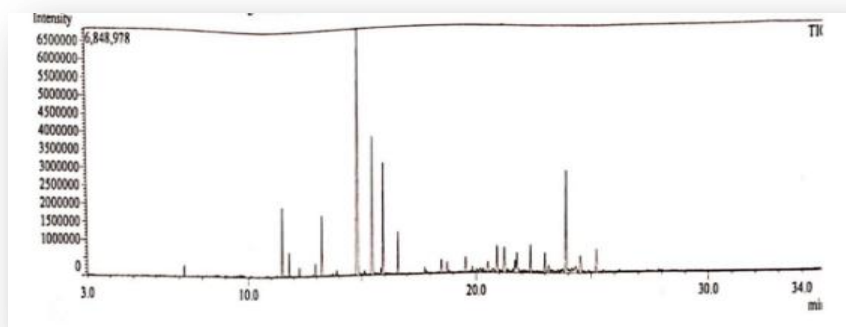
Au total, 69 composés ont été identifiés ce qui correspond à un pourcentage de 100 % par rapport à l'ensemble des constituants isolés. Le 6-OCTEN-1-OL, 3,7-DIMETHYL-apparaît comme le constituant majoritaire d'HE (25,50%), suivi par 2,6-OCTADIEN-1-OL3, 7-DIMETHYL-,(Z)- (11,78%), Eudesmol (8,57%), 6- OCTEN-1-OL, 3,7-DIMETHYL-, ACETATE (7,81%) ,1,6-Octadien-3-ol, 3, 7-dimethyl-(4,60%) et CYCLOHEXANONE, 5-METHYL-2-(1-METHYLETHYL)-, TRANS-(4,32%) qui présentent 85, 65% de la composition totale de notre huile (**figure 18**).

Le reste de la composition chimique sont des constituants minoritaires (14 ,35%) (**Voir annexe 3**).

Le profil chromatographique d'huile essentielle de *Pelargonium graveolens* est illustré dans la **figure 19**.



**Figure 18:** Distribution en fonction du pourcentage des composants d'huile essentielle de *Pelargonium graveolens*.



**Figure 18:** Profil chromatographique d'huile essentielle de *Pelargonium graveolens*.

L'analyse chimique a fait dévoiler 69 constituants chimiques d'huile essentielle de *Pelargonium graveolens*.

Les composés oxygénés constituent une importante partie de la composition chimique d'huile par rapport aux composés hydrocarbonés.

Le profil chromatographique d'absorbance en fonction du temps de notre HE montre qu'il possède tous les constituants nécessaires pour faire d'elle un chémotype. Le 6-OCTEN-1-OL, 3,7-DIMETHYL-apparaît comme le constituant majoritaire d'huile (25.50%).

### II.2 Discussion

L'objectif principal de notre recherche est l'évaluation de l'activité des deux huiles essentielles *Pelargonium graveolens* et *Juniperus phoenicea* sur les microorganismes qui provoquent des phytopathologies. Pour ce faire, on a choisi trois plantes de colza non traitées qui contiennent des taches noires sur les feuilles. On a isolé les souches à partir de ces taches noires dans le milieu GN. Ces microorganismes ont été purifiés sur GN pour les bactéries et SAB pour les champignons. Les colonies pures ont été traitées par des biopesticides végétaux en l'occurrence deux huiles essentielles : *Pelargonium graveolens* et *Juniperus phoenicea*.

La présence des bactéries dans le colza signifie qu'il y a une contamination par *Klebsiella oxytoca* et *Klebsiella pneumoniae ssp pneumoniae 1* se trouvant dans les appareils digestifs de l'homme et des animaux, et dans l'eau, le sol et la poussière (Maryse, Danielle, 2008, <file:///C:/Users/Lenovo/Downloads/2018-fiche-klebsiella-pneumoniae.pdf>). Quant à la bactérie *Vibrion vulnificus*, elle atteint la plante soit par l'eau estuarienne soit par des sédiments (ANSES, 2019). On a également identifié une contamination par des espèces de champignons qui sont : *Alternaria alternata* et *Aspergillus niger*. Toutefois, le colza non traité est dominé par *Alternaria alternata* dont les facteurs favorisant son apparition sont : l'alternance entre les périodes de pluies et de chaleurs à des températures supérieures à 18°C durant la formation des siliques ([https://www.bonnepratiqueagricole.ch/fileadmin/Grandes\\_cultures\\_et\\_herbages/Colza/6.51-52\\_maladies.pdf](https://www.bonnepratiqueagricole.ch/fileadmin/Grandes_cultures_et_herbages/Colza/6.51-52_maladies.pdf)).

Les résultats relatifs à l'utilisation des deux huiles essentielles dont leurs activités antimicrobiennes contre les micro-organismes qui affectent le colza révèlent que les caractères chimiques varient entre 4 et 10 mg de KOH/g d'huile. Par rapport à d'autres études, les résultats obtenus dans cette recherche sont en accord avec ceux obtenus dans l'étude de Boukhatem, Hamaidi et al. 2010 réalisée en Algérie.

Sachant que le pH influence les propriétés stabilisatrices d'une huile essentielle, on peut dire que *Juniperus phoenicea* est acide car son pH est égal à 5,0. Par conséquent, ce résultat peut amener à un bon caractère stabilisateur contre les microorganismes (Hamadou et Touki, 2017).

Dans la recherche du caractère de pureté d'huile, l'indice de réfraction des HE *Pelargonium graveolens* et de *Juniperus phoenicea* est 1,467 et 1,468 respectivement est élevé par rapport à celui de l'eau distillée (1.33). La détermination des indices

chimiques a donné certains renseignements sur la pureté de notre huile essentielle (Hamadou et Touki, 2017).

Conformément aux résultats obtenus, l'huile essentielle de *P.graveolens* a un effet inhibiteur sur les microorganismes responsables de la détérioration des feuilles du colza. Par contre, l'huile de *Juniperus phoenicea* n'a une inhibition que sur les bactéries. Concernant le pouvoir inhibiteur d'huile de *Pelargonium graveolens* sur les champignons, il a été confirmé par les études de Said et al en 2011 sur *Aspergillus niger*.

Plusieurs études ont été menées sur le pouvoir antimicrobien de *J. phoenicea* sur *Kelebsiella pneumoniae* et *Aspergillus niger* par Telaidji en 2018 qui sont en accord avec les résultats de la présente étude.

Pour le pouvoir antioxydant, les résultats montrent que l'HE de *P.graveolens* présente une activité antioxydante intéressante avec une IC<sub>50</sub> de 0, 25 µg/mL. Contrairement à l'HE de *J. phoenicea*, l'IC<sub>50</sub> est égale à 0, 28 µg/mL. Les valeurs d'IC<sub>50</sub> des deux huiles sont inférieures à celle obtenue pour l'acide ascorbique (0,46µg/mL). Selon la littérature, l'IC<sub>50</sub> obtenue pour l'acide ascorbique, est utilisé comme molécule de référence (Kacemi Ben Soutane, et Bahri, 2017). Les résultats des recherches sur l'activité antioxydante des huiles essentielles utilisées dans notre étude avoisinent ceux obtenus par Telaidji en 2018.

Afin d'établir l'identité des composants des deux huiles essentielles et les constituants responsables de l'inhibition, on a pratiqué une analyse par la méthode CG/SM. Cette analyse a permis d'identifier 19 composés chimiques majoritaires qui ont un net effet inhibiteur sur les microorganismes responsables de la pathologie du colza. En effet, les composants détectés sont nombreux, 12 composés ont été identifiés sur 18 ce qui représente un taux de 94%. Le composé majoritaire, le géraniol (28%) est suivi du 2,6-diméthyl decane (25,50%) et du linalool (8,7%). La majorité des composés appartiennent à la famille des alcools.

# Conclusion et Perspectives

---

### Conclusion

Nous avons étudié dans ce travail l'effet des huiles essentielles sur les microorganismes isolés à partir des feuilles du colza. Son but était de déterminer des propriétés antimicrobiennes de ces huiles essentielles sur cette plante contaminée qui appartient à la famille des *Brassicaceae* et qui est très fréquemment cultivée en Algérie.

L'expérimentation a été basée sur l'échantillonnage de la plante de colza et l'isolement des microorganismes qui ont affectée la plante. Ensuite, nous avons fait l'identification des caractères macroscopique, microscopique, biochimiques et physiologiques des bactéries isolées. Le pouvoir antimicrobien et antioxydant des deux huiles essentielles extraites de *Pelargonium graveolens* et *Juniperus phoenicea* a été aussi étudié. L'aromatogramme a permis d'obtenir des halos clairs autour des disques imbibés par les HE qui présentent des caractéristiques physicochimiques intéressantes.

A partir des feuilles de colza, deux espèces de champignons *Alternaria alternata* et *Aspergillus niger* et trois bactéries : *Klebsiella oxytoca*, *Klebsiella pneumoniae spp pneumoniae1* et *Vibrio vulnificus* sont isolés et identifiés.

Les résultats obtenus avec l'aromatogramme nous ont permis de sélectionner l'huile essentielle de *Pelargonium graveolens* qui a présenté un effet inhibiteur des microorganismes responsables de la pathologie de colza. En revanche, l'huile essentielle de *Juniperus phoenicea* présente seulement une activité antibactérienne.

L'évaluation de l'activité antioxydante des huiles essentielles est réalisée par la méthode de piégeage du radical DPPH. L'IC<sub>50</sub> d'huile de *Pelargonium graveolens* est égale à 0,25µg/ml et celle de *Juniperus phoenicea* 0,28µg/ml. Tandis que l'IC<sub>50</sub> de l'acide ascorbique a été estimée à 0.46 µg/mL.

L'analyse d'huile essentielle de *Pelargonium graveolens* menée par CG/SM a permis d'identifier et de quantifier 69 constituants chimiques, dont 19 composants sont majoritaires (85,65%).

### Perspectives :

Il est souhaitable de compléter cette recherche par :

- Valorisation de l'utilisation des biopesticides par des huiles essentielles ;
- Réaliser des recherches sur une synergie entre les biopesticides et leurs écosystèmes ;
- Encourager les responsables à promulguer de nouvelles lois et des législations pour évaluer l'utilisation des biopesticides au lieu des pesticides vue leur effet bénéfique sur les consommateurs et l'environnement ;
- En raison des exigences du développement durable, il est nécessaire de mise en place sur le marché des biopesticides par le développement de la biotechnologie.

Références  
bibliographiques et  
Webographiques

---

### Références bibliographiques et Webographique

Les références ont été préparées par le logiciel Endnote version 2010 fourni par la bibliothèque de l'université.

- **AFNOR, 1996.** Huiles essentielles. Volume 1 : échantillonnage et méthodes d'analyse. AFNOR, Paris, 440 p.
- **AFNOR, (2000)** : Huiles essentielles. Ed. PARA Graphic. Tome1 – Echantillonnage et méthode d'analyse 471 P. Tome 2 – Volume 1 Monographie relative aux huiles essentielles 323 P. Tome 2 – Volume 2 Monographie relative aux huiles essentielles 663 P.
- **Akashe, M., U. Pawade, et al. (2018).** "CLASSIFICATION OF PESTICIDES: A REVIEW." *International Journal of Research in Ayurveda and Pharmacy* 9: 144-150.
- **Aktar, W., D. Sengupta, et al. (2009).** "Impact of pesticides use in agriculture: their benefits and hazards." *Interdisciplinary Toxicology* 2(1): 1-12.
- **Aribi, N., B. Denis, et al. (2020).** "Azadirachtin, a natural pesticide with multiple effects L'azadirachtine, un pesticide naturel aux effets multiples." *médecine/sciences* 36(1): 44-49.
- **ATTOU. A, (2017).** Détermination de la Composition Chimique des Huiles Essentielles de Quatre Plantes Aromatiques de l'Ouest Algérien (Région d'Ain-Temouchent) Etude de Leurs Activités Antioxydante et Antimicrobienne. Thèse de Doctorat en Biologie. Université Abou Bekr Belkaid Tlemcen.
- **AU îdF / ORS, 2010,** « Produits phytosanitaires risques pour l'environnement et la santé » disponible en ligne sur :[https://www.institutparisregion.fr/fileadmin/NewEtudes/Etude\\_675/Produits\\_phytosanitaires.\\_Risques\\_pour\\_l\\_environnement\\_et\\_la\\_sante\\_avec\\_signets.pdf](https://www.institutparisregion.fr/fileadmin/NewEtudes/Etude_675/Produits_phytosanitaires._Risques_pour_l_environnement_et_la_sante_avec_signets.pdf)
- **AYAD MOKHTARI. N, 2012.** Identification et dosage des Pesticides dans l'Agriculture et les problèmes d'Environnement liés (en ligne). Diplôme de MAGISTER, faculté de Chimie Organique, université d'Oran, ALGERIE, pp23 <https://theses.univoran1.dz/document/TH3891.pdf>
- **Base Applicateur, 2006.**SÉRIE DE MANUELS DE FORMATION SUR L'UTILISATION DES PESTICIDES AU CANADA ATLANTIQUE.vol1 Chapitre 4 : Santé humaine P69 <https://www2.gnb.ca/content/dam/gnb/Departments/env/pdf/LandWasteTerreDechets/Manuals-Manuels/BaseApplicateur.pdf>
- **Belleau Francine. (1990).** Analyse de l'huile essentielle du *ledum groenlandicum retzius*. Mémoire de maîtrise, Université du Québec à Chicoutimi.
- **Bousbia. N, (2013).** Extraction des huiles essentielles riches en antioxydants à partir de produits naturels et de coproduits agroalimentaires. Autre. Université d'Avignon, 2011. Français. FfNNT : 2011AVIG0243ff. fftel-00915117ff.
- **Bouguerra. A, (2012).** Etude des activités biologiques de l'huile essentielle extraite des graines de *Foeniculum vulgare* Mill. En vue de son utilisation comme conservateur



## Références bibliographiques et Webographique

---

alimentaire. Mémoire Magister en sciences alimentaires. Université Mentouri Constantine. P1-128.

- **Bailleul, D. (2012).** Dispersion des graines de colza (*Brassica napus* L.) et origines des populations férales dans un agroécosystème, Université Paris Sud-Paris XI.
- **Bancé, A., P. A. Ouédraogo, et al. (2006).** "Etude de la rémanence du triflumuron, inhibiteur de la synthèse de la chitine, selon la nature du tissu à l'égard de la mouche tsé-tsé *Glossina palpalis gambiensis*, dans une perspective de lutte autocide." *Tropicicultura* 24.
- **Batsch, D. (2011).** Consequences of pesticides use on human health L'impact des pesticides sur la santé humaine, UHP - Université Henri Poincaré: non renseigné.
- **Boutabia, L., Telailia, S., Ismail Bouguetof, Faouzi Guenadil & Azzedine Chefrour,** «Composition chimique et activité antibactérienne des huiles essentielles de *Rosmarinus officinalis* L. de la région de Hammamet (Tébessa-Algérie)», *Bulletin de la Société Royale des Sciences de Liège* [En ligne], Volume 85 - Année 2016, Articles, 174 - 189 URL : <https://popups.uliege.be/0037-9565/index.php?id=6050> .
- **Boussena S.** Manuel des Travaux Pratiques de Bactériologie. Institut des Sciences Vétérinaires Département de Productions Animales 2019-2020.
- **Ben Ammar, R., W. Bhourri, et al. (2009).** "Antioxidant and free radical-scavenging properties of three flavonoids isolated from the leaves of *Rhamnus alaternus* L. (Rhamnaceae) : A structure-activity relationship study." *Food Chemistry* 116: 258-264.
- **Boukhatem, M. N., M. S. Hamaidi, et al. (2010).** "Extraction, composition et propriétés physico-chimiques de l'huile essentielle du Géranium Rosat (*Pelargonium graveolens* L.) cultivé dans la plaine de Mitidja (Algérie)." *Nature & Technology*(3): 37.
- **Buchel, K.H. (1983).** *Chemistry of Pesticides*, John Wiley & Sons, Inc. New York, USA.
- **BioMerieux .2009.** Disponible en ligne sur: <https://microbiologiemedicale.fr/wp-content/uploads/2019/02/API-20-NE.pdf> .
- **Brunner, K., S. Zeilinger, et al. (2005).** "Improvement of the fungal biocontrol agent *Trichoderma atroviride* to enhance both antagonism and induction of plant systemic disease resistance." *Applied and environmental microbiology* 71(7): 3959-3965.
- **Campbell, W. A. (1947).** "A New Species of *Coniothyrium* Parasitic on *Sclerotia*." *Mycologia* 39(2): 190-195.
- **Cédric, B.,** « Bio-Pesticides Organiques d'Origine Naturelle ». Disponible en ligne sur : <http://www.itab.asso.fr/downloads/actes%20suite/intrants-7oct-bertrand.pdf>
- **Chandler, D., A. S. Bailey, et al. (2011).** "The development, regulation and use of biopesticides for integrated pest management." *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 366: 1987 - 1998.
- **Chang, J. H., J. Y. Choi, et al. (2003).** "An improved baculovirus insecticide producing occlusion bodies that contain *Bacillus thuringiensis* insect toxin." *Journal of invertebrate pathology* 84 1: 30-37.

## Références bibliographiques et Webographique

---

- **Chen, C.-Y., C.-Y. Lin, et al. (2011).** "Baculovirus as a gene delivery vector: Recent understandings of molecular alterations in transduced cells and latest applications." *Biotechnology advances* 29: 618-631.
- **Chen, X., W. J. Zhang, et al. (2002).** "Comparative analysis of the complete genome sequences of *Helicoverpa zea* and *Helicoverpa armigera* nucleocapsid nucleopolyhedroviruses." *The Journal of general virology* 83: 673-684.
- **Chouitah, O. (2012).** Composition chimique et activité antimicrobienne des huiles essentielles des feuilles de *Glycyrrhiza glabra*. Thèse de doctorat es-sciences. Université Oran.
- **Chouitah, O. (2012)** « composition chimique et activité antibactérienne des huiles essentielles des feuilles de *Glycyrrhiza glabra* ».
- **Clem, R. and A. Passarelli (2013).** "Baculoviruses: Sophisticated Pathogens of Insects." *PLoS pathogens* 9: e1003729.
- **Deravel, J., F. Krier, et al. (2014).** "Les biopesticides, compléments et alternatives aux produits phytosanitaires chimiques (synthèse bibliographique)." *Biotechnologie, Agronomie, Société et Environnement* 18: 220-232.
- **Dodd, S., E. Lieckfeldt, et al. (2003).** "Hypocrea atroviridis sp. nov., the Teleomorph of *Trichoderma atroviride*." *Mycologia* 95: 27-40.
- **Drum, C. (1980).** *Soil Chemistry of Pesticides*, PPG Industries, Inc. USA.
- **Fargue Agnès, (2002).** Maîtrise des flux de gènes chez le colza : Etude *ex-ante* de l'impact de différentes innovations variétales. Thèse présentée pour l'obtention du titre de Docteur de l'Institut National Agronomique Paris – Grignon, mention : Agronomie. pp 168.
- **Eldridge, B.F. (2008).** Pesticide application and safety training for applicators of public health pesticides. California Department of Public Health, Vector-Borne Disease Section, 1616 Capitol Avenue, MS7307, P.O. Box 997377, Sacramento, CA. <http://culexpien.com/wp-content/uploads/2015/11/11-00-09-PestAppl-and-SafetyTraining-for-AppHPesticides.pdf>.
- **Fatima-Zahra, K. B. S. and B. Fatima (2017).** "Activité antioxydante des huiles essentielles du gingembre (*Zingiber officinale*) et du clou de girofle (*Syzygium aromaticum*)."
- **Fenibo, E. O., G. N. Ijoma, et al. (2020).** Biopesticides in Sustainable Agriculture: Current Status and Future Prospects.
- **Gabarty, A., H. M. Salem, et al. (2014).** "Pathogenicity induced by the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* in *Agrotis ipsilon* (Hufn.)." *Journal of Radiation Research and Applied Sciences* 7(1): 95-100.
- **Gamet-Payraastre, L. and C. Lukowicz (2017).** "Les effets des mélanges de pesticides." *Cahiers de Nutrition et de Diététique* 52(5): 234-238.
- **Haase, S., A. Sciocco-Cap, et al. (2015).** "Baculovirus Insecticides in Latin America: Historical Overview, Current Status and Future Perspectives." *Viruses* 7: 2230-2267.

## Références bibliographiques et Webographique

---

- **Hajek, A., I. Delalibera, et al. (2007).** Introduction of Exotic Pathogens and Documentation of their Establishment and Impact: 299-325.
- **Hayo M. G. V, (1997).** « évaluer l'impact des pesticides sur l'environnement », Courrier de l'environnement de l'INRA, N°31, Disponible sur : <https://hal.archives-ouvertes.fr/hal-01204849/file/C31Vanderwerf.pdf>
- **Ibid/ op cit**
- **Institut du SAHEL, 2001.** Disponible en ligne sur : [http://www.insah.org/doc/pdf/biopesticides\\_juin\\_2001.pdf](http://www.insah.org/doc/pdf/biopesticides_juin_2001.pdf)
- **International Labour Foundation for Sustainable Development ;(2021)** « MANUEL DE FORMATION SUR LES PESTICIDE » ; disponible en ligne sur : <https://www.iuf.org/wp-content/uploads/2021/02/2004-Manuel-de-formation-sur-les-pesticides.pdf>
- **ISO, 1997.** Norme ISO 9235 : Matières premières d'origine naturelle - Vocabulaire, 2p. Jacob M., Pellecuer J. & Tomei R., 1979. Centre régional d'étude et de développement des plantes à usage pharmaceutique. Rivista Italiana E.P.P.O.S. 11: pp. 26-30.
- **Jhala, J., A. S. Baloda, et al. (2020).** "Role of bio-pesticides in recent trends of insect pest management: A review." *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry* 9: 2237-2240.
- **Kerbouche. L, (2010).** Composition chimique et activité biologique des huiles essentielles de quelques plantes des familles de labiacées et de cupressacées. Mémoire de magister .École supérieure –El-Harrach.
- **Kumar, J., A. Ramlal, et al. (2021).** "An Overview of Some Biopesticides and Their Importance in Plant Protection for Commercial Acceptance." *Plants* 10(6): 1185.
- **Lacey, L. A., T. X. Liu, et al. (2011).** "Entomopathogenic fungi (Hypocreales) for control of potato psyllid, *Bactericera cockerelli* (Šulc) (Hemiptera: Triozidae) in an area endemic for zebra chip disease of potato." *Biological Control* 56(3): 271-278.
- **Lauzon, H. A. M., A. Garcia-Maruniak, et al. (2006).** "Genomic comparison of Neodiprion sertifer and Neodiprion lecontei nucleopolyhedroviruses and identification of potential hymenopteran baculovirus-specific open reading frames." *Journal of General Virology* 87(6): 1477-1489.
- **Lesley B., 1996.** Plantes médicinales et aromatiques, Ed. Lavoisier. Paris. pp. 58-61.
- **Liyana-Pathirana C.M. and Shahidi F., 2006.** Antioxydant properties of commercial soft and hard winter wheats (*Triticum aestivum* L.) and their milling fractions. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 86: pp. 477-485.
- **Leng, P., Z. Zhang, et al. (2011).** "Applications and development trends in biopesticides." *African Journal of Biotechnology* 10: 19864-19873.
- **Louchahi .M ,2015.** enquête sur les conditions d'utilisation des pesticides en agriculture dans la région centre de l'algérois et la perception des agriculteurs des risques associés à leur utilisation. Diplôme de magister, Faculté d'agronomie, p33 <http://dspace.ensa.dz:8080/jspui/bitstream/123456789/1279/1/Mémoire%20de%20Magister%20LOUCHAHI.pdf>

## Références bibliographiques et Webographique

---

- **Longevialle P., 1981-** Principe de la spectrométrie de masse des substances Lahlou M., 2004. Methods to study phytochemistry and bioactivity of essential oils. *Phytotherapy Research* 18: pp. 435-448.
- **Lucchesi, M.-E. (2005).** Solvent Free Microwave Extraction<br />Conception and application to the extraction of essential oils
- **Marriott P.J., Shellie R. and Cornwell C., 2001.** Review : Gas chromatographic technologies for the analysis of essential oils. *Journal of Chromatography A*, 936; pp. 1-22.
- **Mansouri, N., B. Satrani, et al. (2011).**"Etude chimique et biologique des huiles essentielles de *Juniperus phoenicea* ssp. *Lycia* et *Juniperus phoenicea* ssp. *Turbinata* du Maroc." *Biotechnologie, Agronomie, Société et Environnement*15: 415-424.
- **Mathon, C.-C. (1984).**"Le Floch Edouard. — Contribution à une étude ethnobotanique de la flore tunisienne. Publ. Sci. Tunisiennes, Programme flore et végétation tunisiennes, préface de Mohamed Abdelhamid Nabli, Impr. Off. Républ. Tunis., 1983." *Journal d'agriculture traditionnelle et de botanique appliquée*: 129-129.
- **McQuilken, MP., Gemmell, J., Hill, KA., & Whipps, JM. (2003).** Production of macrospore A by the mycoparasite *Coniothyrium minitans*. *FEMS Microbiology Ecology*, 219, 27 – 31.disponible en ligne sur <https://pure.sruc.ac.uk/en/publications/production-of-macrospore-a-by-the-mycoparasite-coniothyrium-mi>
- **Merhi M. 2008.** Etude de l'impact de l'exposition à des mélanges de pesticides à faible doses : caractérisation des effets sur des lignées cellulaires humaines et sur le système hématopoïétique marin. Thèse de doctorat. Université de Toulouse, pp140. <https://oatao.univ-toulouse.fr/7769/1/merhi.pdf>
- **Mergoud L. et Belmessikh.** A "Manuel des travaux pratiques de Microbiologie générale 2ème année LMD".Disponible en ligne sur : [https://fac.umc.edu.dz/snv/faculte/tc/2021/TP\\_n\\_3\\_microbiologie.pdf](https://fac.umc.edu.dz/snv/faculte/tc/2021/TP_n_3_microbiologie.pdf)
- **Merghid. M, Debbache. M et Foughali J, 2017.**Impacts des pesticides utilisés dans la plasticulture sur la santé humaine En Algérie - Etude de cas la wilaya de Constantine. Diplôme de Master, Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Université Constantine, ALGERIE, pp44. <https://fac.umc.edu.dz/snv/faculte/biblio/mmf/2017/Impacts%20des%20pesticides%20utilisés%20dans%20la%20plasticulture%20sur%20la%20santé%20humaine%20En%20Algérie%20%20Etude%20de%20cas%20la%20wilaya%20de%20Constantine%20-.pdf>
- **Meenatchi, R. and A. Negi (2021).**Biopesticides for Pest Management: 239-266.
- **Moro Buronzo A., (2008).** Le Grand Guide des Huiles Essentielles: Santé, Beauté, Bien être; Ed : Hachette Pratique, p: 14- 43.
- **Nawaz, M., J. Mabubu, et al. (2016).**"Current status and advancement of biopesticides: Microbial and botanical pesticides." *JOURNAL OF ENTOMOLOGY AND ZOOLOGY STUDIES* 4: 241-246.

## Références bibliographiques et Webographique

---

- **NIPHM, [Cited on 2018 May 5].** Pesticide Management division, syllabus, Pesticide classification on use, chemical nature, formulation toxicity and action etc., Hyderabad p.1-17 available from <https://niphm.gov.in/Recruitments/ASO-PMD.pdf> p.15
- **Ouchebbouk. Dj, Zibani- Amokrane. N, 2015.** Contribution à l'étude de l'utilisation des pesticides dans quelques vergers des régions de Tizi-Ouzou, Bouira et Boumerdes. diplôme de Master, faculté des sciences biologiques et des sciences agronomiques, université Tizi-Ouzou, ALGERIE, pp9 <https://www.ummo.dz/dspace/bitstream/handle/ummo/2028/Ouchebbouk%20Djamila%20%26%20Zibani-Amokrane%20Nouara.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- **Patrice. A, 2016.** « Développement et utilisation de biopesticides dans le secteur de la pomme de terre ». Disponible en ligne sur : [https://www.agrireseau.net/documents/Document\\_95199.pdf](https://www.agrireseau.net/documents/Document_95199.pdf) .
- **Parejo, I., C. Codina, et al. (2000).** "Evaluation of scavenging activity assessed by Co(II)/EDTA-induced luminol chemiluminescence and DPPH\* (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) free radical assay." *Journal of pharmacological and toxicological methods* 44(3): 507-512.
- **Pedrini, N., R. Crespo, et al. (2007).** "Biochemistry of insect epicuticle degradation by entomopathogenic fungi." *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* 146(1): 124-137.
- **Pharmacopée européenne 6.6. (2008).** Huiles essentielles - Aetherolea (01/2008 :2098).
- **Philippe. D, (2021).** "Identification des champignons d'importance médicale". Disponible en ligne : [https://www.inspq.qc.ca/sites/default/files/lspq/identification\\_champignons\\_importance\\_medicale.pdf](https://www.inspq.qc.ca/sites/default/files/lspq/identification_champignons_importance_medicale.pdf)
- **Piche M., 2008-** La dérive des pesticides : Prudence et solutions, Centre de référence en agriculture et agroalimentaire au Québec, Agriculture, Pêcherie et Alimentation n°08-0075, p4. <https://www.agrireseau.net/phytoprotection/documents/pesticide.pdf>.
- **Pibiri, M. C. (2001).** Assainissement microbiologique de l'air et des systèmes de ventilation au moyen d'huiles essentielles.
- **Regnault- Roger. C et al, (2008).** Biopesticides d'origine végétale. Ouvrage de 546 p. ISBN : 978-2-7430-1081-2. disponible en ligne sur : [https://books.google.dz/books?hl=fr&lr=&id=GeRhAQAAQBAJ&oi=fnd&pg=PA1&dq=les+biopesticides+vegetales+pdf&ots=exfhwde7cK&sig=tKUvZCrDgwWRqtuE5pyFHQzWYKg&redir\\_esc=y#v=onepage&q=les%20biopesticides%20vegetales%20pdf&f=false](https://books.google.dz/books?hl=fr&lr=&id=GeRhAQAAQBAJ&oi=fnd&pg=PA1&dq=les+biopesticides+vegetales+pdf&ots=exfhwde7cK&sig=tKUvZCrDgwWRqtuE5pyFHQzWYKg&redir_esc=y#v=onepage&q=les%20biopesticides%20vegetales%20pdf&f=false).
- **Rochefort Henri, Jouannet Pierre, 2011.** Endocrine disruptors and hormone dependent cancers. Mechanisms and proposals to reduce the risks, Acad. Natle Méd, Volume 195 N° 8.
- **Rhoads, M. (2018).** "Using Behavior of Agrochemicals and Pesticides and Their Impacts on Human Health: A Perception Based Rural Study in Bangladesh."

## Références bibliographiques et Webographique

---

- **Roger, P. (2015).** Roger PA, Garcia J-L (2001) Introduction à la microbiologie du sol. Polycopié de cours (Université de Provence, Université de la Méditerranée, Ecole Supérieure d'Ingénieurs de Luminy. 191pp.
- **Rosas, N. (2009).**"Biopesticide Production from *Bacillus thuringiensis*: An Environmentally Friendly Alternative."Recent patents on biotechnology 3: 28-36.
- **Ruiu, L. (2018).**"Microbial Biopesticides in Agroecosystems."Agronomy 8(11): 235.
- **Richardin P.,** La chromatographie. Centre de recherche et de restauration des musées de France Page 1-10, Cours, 1996.
- **Saheb D, 2007.** Activité acaricide de quatre huiles essentielles sur tetranychuscinnabarinnusboisduval 1867 5 Acari ; tetranychdae) et contribution à l'étude de leur composition chimique par GC /MS. Mémoire de magister. Institut national agronomique el Harrach, Alger.
- **Sacramento, C.A. (2008).**Department of pesticide regulation "What are the PotentialHealthEffects of Pesticides?" Community Guide to Recognizing and Reporting Pesticide Problems, pp. 27–29.[https://www.cdpr.ca.gov/docs/dept/comguide/commtty\\_guide.pdf](https://www.cdpr.ca.gov/docs/dept/comguide/commtty_guide.pdf)
- **Samuel O., et Saint-Laurent L., 2001-** Guide de prévention pour les utilisateurs de pesticides en agriculture maraîchère, l'Institut de Recherche en Santé et en Sécurité du Travail du Québec IRSST, p16 <https://www.irsst.qc.ca/media/documents/PubIRSST/RG-273.pdf?v=2022-02-26>
- **Samada, L. H. and U. S. F. Tambunan (2020).**"Biopesticides as Promising Alternatives to Chemical Pesticides: A Review of Their Current and Future Status."Journal of Biological Sciences 20: 66-76.
- **Schnepf, E., N. Crickmore, et al. (1998).**"*Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins."Microbiology and molecular biology reviews : MMBR 62(3): 775-806.
- **Soltani, Y., M. A. Bouzidi, et al. (2018).** "Activités antioxydantes des extraits de trois organes de *Juniperus phoenicea* L. de l'Ouest algérien." Phytothérapie 16: 142-148.
- **Toure, D. (2015).** Chemical and biological studies of essential oils of four medicinal aromatic plants of Ivory Coast Etudes chimique et biologique des huiles essentielles de quatre plantes aromatiques médicinales de Côte d'Ivoire, université Felix Houphouët-Boigny, Côte d'Ivoire.
- **Tranchant, Arpino, et al. (1995).** Manuel pratique de chromatographie en phase gazeuse, Paris ; Milan ; Barcelone : Masson, 1995.
- **Tranchant, Arpino, et al. (1995).** Manuel pratique de chromatographie en phase gazeuse, Paris ; Milan ; Barcelone : Masson, 1995
- **Thakore, Y. (2006).**"The Biopesticide Market for Global Agricultural Use."Industrial Biotechnology 2: 194-208.
- **Thakur, N., M. Devi, et al. (2014).** Role of Biopesticides in Integrated Pest Management (IPM) for Sustainable Agriculture.
- **Turner, G. J. and H. T. Tribe (1976).**"On *Coniothyrium minitans* and its parasitism of *Sclerotinia* species."Transactions of the British Mycological Society 66(1): 97-105.

## Références bibliographiques et Webographique

---

- **USDA-NRCS. 2014.** Brassica napus L. rape. United States Department of Agriculture. Natural Resources Conservation Service. [Online] Available: <http://plants.usda.gov/core/profile?symbol=BRNA> [2014].
- **Van Der Werf, H. M. G. (1997).**"Evaluer l'impact des pesticides sur l'environnement." Le Courrier de l'environnement de l'INRA 31(31): 5-22.
- **Whipps, J. M. and M. Gerlagh (1992).**"Biology of Coniothyrium minitans and its potential for use in disease biocontrol."Mycological Research 96(11): 897-907.
- **World Health, O. and S. International Programme on Chemical (2010).** The WHO recommended classification of pesticides by hazard and guidelines to classification 2009. Geneva, World Health Organization.
- **Wilkinson, J. M. (2006).** Methods for Testing the Antimicrobial Activity of Extracts. Modern Phytomedicine: 157-171.
- **Yadav, I. and N. Devi (2017).** Pesticides Classification and Its Impact on Human and Environment: 140-158.
  
- Consulter:<https://aromatherapie.ooreka.fr/comprendre/aromatherapieintroductn> .
- Consulter :<https://www.santemagazine.fr/medecines-alternatives/approches-naturelles/huiles-essentielles/comment-utiliser-les-huiles-essentielles-173082#Utiliser-les-huiles-essentielles-sur-la-peau%2C-en-massage-ou-en-friction> .
- Consulter: [https://www.who.int/fr/publications/i/item/9789240005662Classification OMS recommandée des pesticides en fonction des dangers qu'ils présentent et Lignes directrices pour la classification 2019 p6.](https://www.who.int/fr/publications/i/item/9789240005662Classification-OMS-recommandee-des-pesticides-en-fonction-des-dangers-qu'ils-presentent-et-Lignes-directrices-pour-la-classification-2019-p6)

**Annexe**

---



**Annexe1: Galerie API 20 E**

- 1- **ONPG test** : The ONPG test is used to detect the enzyme  $\beta$ -galactosidase
- 2- **ADH** : Decarboxylation of the amino acid arginine by arginine dihydrolase
- 3- **LDC**: Decarboxylation of the amino acid lysine by lysine decarboxylase
- 4- **ODC**: Decarboxylation of the amino acid ornithine by ornithine decarboxylase
- 5- **CIT** : Use of citrate as sole carbon source
- 6- **H<sub>2</sub>S** : Hydrogen sulfide production
- 7- **URE** : Urease enzyme test
- 8- **TDA (Tryptophan deaminase)** : Detection of the tryptophan deaminase enzyme (detected by adding Ferric chloride).
- 9- **IND** : Indole test : production of indole from tryptophan by the enzyme tryptophanase (Indole is detected by adding Kovac's reagent).
- 10- **VP** : The Voges-Proskauer test for the detection of acetoin (acetylmethylcarbinol) produced by fermentation of glucose by bacteria using the butylene glycol pathway
- 11- **GEL** : Production test of the enzyme gelatinase which liquefies gelatin
- 12- **GLU** : Glucose fermentation (hexose sugar)
- 13- **MAN** : Fermentation of mannose (sugar hexose)
- 14- **INO** : Fermentation of inositol (cyclic polyalcohol)
- 15- **SOR** : Fermentation of sorbitol (sugar alcohol)
- 16- **RHA** : Rhamnose fermentation (methyl pentose sugar)
- 17- **SAC** : Fermentation of sucrose (disaccharide)
- 18- **MEL** : Fermentation of melibiose (disaccharide)
- 19- **AMY** : Fermentation of amygdalin (glycoside)
- 20- **ARA** Fermentation of arabinose (pentose sugar)

**Annexe 2 : Préparation des solutions**

- **Solution de KOH :**

A l'aide d'une balance, peser 2,8g de KOH puis mettre dans 100 ml d'éthanol, agiter vigoureusement pour bien homogénéiser.

- **Solution de HCl :**

Diluer 25 ml de HCl dans 75 ml d'eau distillée.

**Annexe 3 : Composition chimique minoritaire d'huile essentielle de *Pelargonium graveolens*.**

Erea %	Compositions d'HE
0,65	Bicyclo[3.1.1]HEpt-2-ENE, 2,6,6-TRIMETHYL-
0,21	CYCLOHEXENE,1-METHYL-4-(1-METHYLETHNYL)-
0,13	Eucalyptol
0,09	1,3,7-OCTATRINE, 3,7-DIMETHYL-,(E)-
0,10	1,3,6-OCTATRINE, 3,7-DIMETHYL-,(E)-
0,09	.alpha.-Methyl-.alpha.-[4-methyl -3-pentenyl]oxiranemethanol

0,60	Rose Oxide B
0,85	CYCLOHEXENE, 5-Methy-2-(1-METHYLETHYL)-, TRANS-
0,20	CYCLOHEXANOL, 5-METHYL-2-(1-METHYLETHYL)-, [1R-(1.ALPHA.,2.BETA.,5.ALPI)]
0,39	3-CYCLOHEXENE-1-METHANOL, .ALPHA.,.ALPHA.,4-TRIMETHYL-
0,28	2,6-OCTADIENAL, 3,7-DIMETHYL-
0,42	2,6-Octadienal, 3,7-dimethyl-
0,11	2,6-Octadiene-1-OL, 3,7-DEMETHYL-,ACETATE, (Z)-
0,44	2,6Octadiene, 2,6-dimethyl
0,17	4-ISOPROPYL-3,7-DIMETHYL-3A,3B,4,5,6,7HEXAHYDRO-1H-CYCLOPENTA[2,3]C
0,86	CYCLOBUTA(1,2:3,4)DICYCLOPENTENE,1,2,3,3A,3B,BETA.,4,5,6,6A.BETA.,6B.ALI
0,23	2-BROMOPROPIONIC acide, 2-phenylethyl ester
0,13	1H-CYCLOPENTA(1,3)CYCLOPROPA[1,2]BENZENE, OCTAHYDRO-7-MITHYL-3-ME
0,43	6-OCTEN-1-OL, 3,7-DIMETHYL-, PROPANOATE
0,30	1H-CYCLOPROPA[A]NAPHTALENE, 1A,2,4,5,6,7,7A,7B-OCTAHYDRO-1,1,7,7A-T
0,10	1,6CYCLODECADIENE 1-METHYL-5-METHYLENE-8-(1-MITHYLETHYL)-, [S-(E,E)]
0,48	Gurjunene<alpha->
0,37	1,4,8-CYCLOUNDECATRIENE, 2,6,6,9-TETRAMETHYL-,(E,E)-
0,28	Cadina-1(6),4-diene(10betah-)
0,21	Azulene, 1,2,3,4,5,6,7,8-octahydro-1,4dimethyl-7-(1-methylethylidene)-, (1S- ci)
0,20	NAPHTHALENE, DECAHYDRO-4A-METHYL-1-METHYLENE-7-(1-METHYLETHENYL)
0,33	Nerolidyl acetate
0,26	Naphtalène, 1,2,3,4,4a,5,6,8a-Octahydro-7-methyl-4-methylene-1-(1-methylet)
0,84	Citronellyl isobutyrate
0,25	4-isoPropyl-1,6-Dimethyl-,2,3,7,8,8a-HEXAHYDRONAPHTHALENE
0,15	Naphtalène, 1,2,3,4,4a,7-hexahydro-1,6-dimethyl-4-(1-methylethyl)-
0,22	S-ISOPROPYL-3,8-DIMETHYL-1,2,4,5,6,7-HEXAHYDROZULENE
0,13	Cadala-1(10),3,8-triene
0,10	4-(5,5-DIMETHYLSPIRO[2,5]OCT-4-YL)-3-BUTEN-2-ONE
0,24	3-HEXYNE, 2,2,5,5-TETRAMETHYL
0,73	9-ISOPROPYL-1-METHYL-2-METHYLENE-5-OXA-TRICYCLO[5.0.0 3,8]UNDECANI
0,19	Neryl isovalerate
0,19	AZULENE, 1,2,3,3A,4,5,6,7-OCTAHYDRO-1,4-DIMETHYL-7-(1-METHYLETHYL)-,
0,17	1,1,4,7-TETRAMETHYLDECAHYDRO-1H-CYCLOPROPA[E]AZULEN-4-OL
0,21	Citronellyl valerate

---

0,28	Muurolol<alpha-,epi->
0,25	Di-ipi-alpha-cedrene-(1)
0,21	2-Naphtalène méthanol, 1,2,3,4,4a,5,6,7-octahydro-.alpha.,.alpha.,4a,8-tetra
0,43	2-(6,10-DEMETHYLSPIRO[4,5]DEC-6EN-2-YL)-2-PROPANOL #
0,10	(-)GLOBulol
0,17	Citronellyl isobutyrate
0,23	BUTANOIC ACID, 3,7-DIMETHYL-2,6-OCTADIENYL ESTER,(E)-
0,11	BUTANOIC ACID, 3,7-DIMETHYL-2,6-OCTADIENYL ESTER,(E)-
0,15	2-pentadécagone, 6,10,14-trimethyl-
0,09	BUTANOIC ACID, 3,7-DIMETHYL-2,6-OCTADIENYL ESTER,(E)-