



MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE  
UNIVERSITÉ MOULOUD MAMMÈRI DE TIZI-OUZOU  
FACULTÉ DES SCIENCES BIOLOGIQUES ET DES SCIENCES AGRONOMIQUES  
DÉPARTEMENT DE BIOCHIMIE- MICROBIOLOGIE

# Mémoire de fin d'étude

Mémoire présenté en vue de l'obtention du diplôme de Master 2

Domaine : Sciences de la nature et de la vie

Spécialité : Biotechnologie et valorisation des plantes

## Thème

---

Effet de l'huile essentielle de thym  
(*Thymus Vulgaris*) sur le  
développement du *Verticillium Dahliae*  
(agent pathogène de la verticilliose).

---

Présenté par :

Melle. KORICHI Nadia et Melle. KHIMOUD Farida

**Promoteur :** Dr. LEFSIH Khalef      Maître de Conférences Classe A      UMMTO

**Co-promotrice :** Mme KEBIR.N.      Chef de Service d'expérimentation      SRPV DBK

## Devant le Jury :

**Président :** Mr KHEDDACHE Arezki.      Maître de Conférences Classe B      UMMTO

**Examineur :** Mr. LIMANE Abdelkrim.      Maître de Conférences Classe A      UMMTO

**Invité d'honneur :** Mr.MIDOUN Faouzi.      Contrôleur phytosanitaire principal      SRPV DBK

Année universitaire 2023/2024

# REMERCIEMENTS

*Notre première gratitude va à Allah pour nous avoir donné la bénédiction, et la force pour accomplir ce travail.*

*Nous adressons nos sincères remerciements tout particulièrement à notre encadreur **Dr. LEFSIH Khalef** d'avoir accepté de superviser notre travail, nous le remercions pour sa disponibilité et son aide tout le long de ce modeste travail, ses bons conseils, ses immenses contributions, critique constructive, patience et compréhension.*

***Mr KHEDDACHE Arezki**, en tant que président du jury, votre expertise et votre expérience ont apporté une dimension enrichissante à l'évaluation de notre travail. Vos commentaires et vos insights ont été d'une grande valeur.*

*Nous souhaitons exprimer notre profonde gratitude à **Madame KEBIR. N**, en tant que Copromotrice pour ses précieux conseils et son soutien inestimable lors de nos travaux au laboratoire. Son expertise a grandement contribué à la réussite de notre projet.*

*Nous tenons à exprimer notre profonde gratitude à **Monsieur LIMANE Abdelkrim**, en tant que examinateur pour sa présence et pour ses remarques constructives lors de notre soutenance.*

*Nous tenons aussi à remercier la directrice de la Station Régionale de Protection des Végétaux Draa Ben Khedda (SRPV-DBK) pour nous avoir accueillies au sein de la station et de nous avoir ouvert les portes de ces laboratoires.*

*Nos remerciements s'adressent également au personnel de la station SRPV DBK spécialement, **Mr MIDOUN F** pour son précieux apport technique tout au long de l'expérimentation.*

*Nous tenons à remercier profondément tous ceux qui ont participé de loin ou de près à la réalisation de ce travail*

# *Dédicaces*

*Grâce à la miséricorde d'Allah, j'ai eu la force et la persévérance nécessaires pour accomplir ce travail et achever mes études. Hamdoulillah pour chaque bénédiction et chaque étape franchie*

*À ma mère et à mon père, dont l'encouragement et le soutien inébranlables ont été les piliers de mon succès, pour tout l'amour, les sacrifices que vous avez faits pour m'aider à devenir la personne que je suis aujourd'hui.*

*À mes sœurs, **Saloua, Karima, Yasmina, Kamilia et Tassadit** et mes petits bébés **Mirna, Nélya et Madjid** ainsi que mes frères **Said et Kamel** dont la présence constante et la force m'ont aidé à surmonter chaque obstacle. Votre amour et votre inspiration, sans lesquels rien de ce que j'ai accompli ne serait possible. Du fond du cœur, je vous suis reconnaissant pour tout ce que vous avez fait et continuez de faire pour moi*

*A ma précieuse binôme et amie fidèle **Nadia** pendant ces cinq années d'études. Je te suis reconnaissante pour ta complicité et ton soutien constant et pour ta précieuse collaboration et ton soutien indéfectible tout au long de ce travail de fin d'études Notre aventure ensemble restera gravée dans ma mémoire*

*À **Idir**, dont les conseils éclairés ont non seulement enrichi mes études mais ont aussi profondément influencé ma vie. Merci pour ton soutien inestimable.*

*À **Kenza et Razika**, vos sourires et votre soutien ont illuminé mon parcours d'études et enrichi ma vie. Merci d'avoir été des compagnes inoubliables dans cette aventure*

*À tous mes camarades et aux personnes incroyables rencontrées tout au long de ce parcours universitaire Chacun de vous a contribué à faire de cette aventure un chapitre précieux de ma vie*

*Je vous aime infiniment*

***Farida***

# *Dédicaces*

*À mes chers parents, piliers de ma vie,*

*Vous m'avez guidée sur le chemin de la sagesse. Vos sacrifices ont tissé ma réussite, ma richesse. Pour votre assistance, vos conseils, votre patience, votre soutien et vos sacrifices, je vous en suis infiniment reconnaissante.*

*À mes sœurs, Ikram et Meriem, et à mes frères, Arezki et Mustapha, mes compagnons de toujours,*

*À vos côtés, j'ai grandi, j'ai appris, et j'ai vécu des moments inoubliables. Nos liens indéfectibles et nos rires partagés resteront gravés dans mon cœur à jamais. Vous êtes les piliers de ma vie, ma motivation quotidienne pour exceller. Votre présence chaleureuse et vos encouragements constants ont été mes bouffées d'air frais pendant ces années d'efforts inlassables. Vous êtes ancrés dans mon cœur.*

*À Zak mon conseiller,*

*Tes paroles sages sont un réconfort permanent. À travers les hauts et les bas, tu es toujours là. Tu as été une source inépuisable d'inspiration, un pilier dans les moments de doute, et ta présence a rendu cette aventure tout simplement inoubliable. Ton soutien inconditionnel a été la clé de mon succès, et ton affection sincère m'enveloppe, me comble de joie.*

*À Farida,*

*Travailler à tes côtés a été une expérience incroyable. Ta détermination, ta créativité et ton dévouement ont été une source d'inspiration constante. Cette réussite n'aurait pas été la même sans ton talent et ton amitié.*

*Je tiens également à dédier ce mémoire à mes amis Qays, Nessrine, Razika, ainsi qu'à tous mes camarades avec qui j'ai passé des moments inoubliables qui resteront gravés dans notre mémoire.*

*NADIA*

## Table des matières

Remerciements

Dédicaces

Liste des figures

Liste des abréviations

**Introduction générale** .....1

### Chapitre I : Les huiles essentielles

Introduction.....	3
1.1.Définition .....	3
1.2. Les composés chimiques des huiles essentielles .....	4
1.2.1. Terpènes.....	4
1.2.2. Les composés aromatiques .....	5
1.2.3. Composés d'origine diverses .....	6
1.3. Localisation des huiles essentielles.....	6
1.4. Le rendement en huiles essentielles .....	7
1.5. Méthodes d'extraction des huiles essentielles .....	7
1.5.1. Extraction par entraînement à la vapeur d'eau.....	7
1.5.2. Extraction par Hydrodistillation.....	8
1.5.3. Extraction par solvant organique .....	10
1.5.4. Extraction assistée par micro-ondes.....	10
1.5.5. Extraction par fluide à l'état supercritique.....	12
1.6.Bioactivités des constituants des huiles essentielles.....	13
1.6.1. Activité antibactérienne .....	13
1.6.2. Activité antioxydante .....	14
1.6.3. Activité antifongique.....	15
1.6.4. Activité anticancéreuse .....	16
1.6.5. Activité anti-inflammatoire.....	17

### Chapitre II : Les champignons pathogènes

Introduction.....18

2.1. Définition .....	18
2.2. Modes de vie des champignons pathogènes des plantes.....	18
2.2.1. Biotrophes .....	19
2.2.1.1 Biotrophes obligatoires .....	19
A. Les rouilles .....	19
B. L'œidium.....	20
2.2.1.2 Biotrophes non obligatoires .....	21
2.2.2. Nérotrophes .....	21
2.2.3. Hémibiotrophes .....	22
2.3. La lutte contre les champignons pathogènes de la plante .....	23
2.3.1. Contrôle chimique .....	23
2.3.2. Variétés résistantes .....	23
2.3.3. Contrôle biologique .....	24
2.4. Les stratégies d'adaptations des champignons pathogènes .....	25
2.4.1. Stratégies fongiques pour la pénétration chez l'hôte .....	25
2.4.2. Les stratégies fongiques pour éviter la reconnaissance par les plantes .....	26
2.4.3. Les stratégies fongiques pour inhiber les réponses de défense de l'hôte .....	26

### **Chapitre III : Les tests antifongiques**

Introduction.....	27
3.1. Diagnostic des maladies fongiques chez les plantes.....	27
3.1.2. Méthodes conventionnelles.....	27
3.1.2.1. Méthode d'examen visuel .....	27
3.1.2.2. Méthodes de culture et de placage.....	28
3.1.2.3. Analyse des isoenzymes .....	28
3.1.3. Méthodes de détection directe .....	29
3.1.2.1. Méthodes basées sur l'immunologie .....	29
3.1.4. Les méthodes indirectes.....	30
a. Les techniques spectroscopiques et d'imagerie .....	31
b. La détection des composés organiques volatils (COV) .....	31
3.2. Méthodes de diffusion.....	32
3.2.1. Méthode de diffusion sur disque d'agar .....	32
3.2.2. Méthode de diffusion en puits sur gélose .....	33

3.3. La méthode de dilution .....	34
3.3.1. Le protocole de méthode par dilution.....	35

## **Chapitre IV Matériels et méthodes**

4.1. Objectif de travail .....	37
4.2. Localisation géographique .....	37
4.3. Matériels .....	38
4.3.1. Matériel végétal .....	39
4.3.2. Matériel fongique .....	39
4.4. Méthodologie .....	39
4.4.1. Isolement de l'agent pathogène <i>Verticillium Dahliae</i> .....	39
4.4.1.1. Désinfection des échantillons .....	40
4.4.1.2. Isolement de l'agent pathogène à partir de fragments de rameaux .	41
4.4.1.3. Préparation du milieu de culture.....	41
4.4.1.4. Identification microscopique .....	42
4.5. Les tests Antifongiques.....	43
4.5.1. L'objectif .....	43
4.5.2. Protocol.....	43
a. Les concentrations de Fongicide .....	44
b. Les concentrations d'huile essentielle .....	44
4.5.3. Ensemencement .....	45
4.5.4. La combinaison de la concentration minimale inhibitrice d'huile essentielle et le fongicide .....	46

## **Chapitre V Résultats et discussion**

5.1. Résultats de l'identification microscopique de <i>Verticillium dahliae</i> .....	47
5.2. Activité antifongique .....	47
5.2.1. Test de sensibilité sur gélose avec l'huile essentielle du thym ( <i>Thymus vulgaris</i> ) .....	47
5.2.2. Test de sensibilité sur gélose avec le fongicide ECONAZYL (Nitrate d'Econazole 1%) .....	48
5.3. Tests de synergie entre l'huile essentielle et le fongicide.....	49
6.1. Discussion des résultats sur l'huile essentielle .....	50
6.2. La discussion sur les résultats du fongicide chimique .....	51

6.3. Discussion des résultats des tests de synergie entre l'huile essentielle et le fongicide.....	52
<b>Conclusion générale</b> .....	55
<b>Références bibliographiques</b> .....	56
<b>Résumés</b>	

## Liste des figures

Figure 1. Principaux constituants bioactifs et biologiquement importants présents dans les huiles essentielles.....	6
Figure 2 : Schéma de l'extraction par entraînement à la vapeur.....	8
Figure 3 : Principe schématisé de l'hydrodistillation (HD).....	9
Figure 4 : La maladie de la rouille .....	20
Figure 5 : la maladie de l'oïdium.....	20
Figure 6 : La maladie de l'ergot.....	21
Figure 7 : maladie causal par le champignon du blast du riz.....	22
Figure 8 : méthode de diffusion sur disque d'agar .....	33
Figure 9 : La méthode de diffusion en puits sur gélose .....	34
Figure 10 : Méthode de microdilution en bouillon d'extraits de plantes contre <i>B. subtilis</i> en utilisant la résazurine comme indicateur de croissance.....	36
Figure 11 : Carte satellitaire de la région d'Ahnif, Wilaya de Bouira, illustrant ses frontières administratives .....	37
Figure 12 : Photos du matériel de laboratoire : (01) Autoclave, (02) La Hotte, (03) Agitateur, (04) Les Boites de Petrie, (05) Étuve, (06) Microscope Optique.....	38
Figure 13 : Technique d'isolement de l'agent pathogène.....	40
Figure 14 : Technique de la désinfection du l'échantillon isolé.....	40
Figure 15 : L'ensemencement et l'incubation .....	41
Figure 16 : Préparation de milieu de la culture de Sabouraud .....	42
Figure 17 : Identification de <i>Verticillium Dahliae</i> sous un microscope optique avec le grossissement $\times 40$ .....	43
Figure 18 : La figure présente les étapes de préparation des milieux de culture contenant différentes concentrations de l'huile essentielle de <i>Thymus Vulgaris</i> .....	44

Figure 19 : La figure présente les étapes de préparation des milieux de culture contenant différentes concentrations de fongicide .....	45
Figure 20 : Technique d'ensemencement et l'incubation des Boites de Pétri.....	45
Figure 21 : La combinaison entre la CMI d'huile essentielle et la solution mère de fongicide.....	46
Figure 22 : Observation microscopique de <i>Verticillium dahliae</i> avec le grossissement 40...	47
Figure 23 : Résultats du test de sensibilité sur gélose contenant des concentrations décroissantes d'huile essentielle du thym ( <i>Thymus vulgaris</i> ) .....	47
Figure 24 : Résultats du test de sensibilité sur gélose contenant des concentrations décroissantes du fongicide ECONAZYL (Nitrate d'Econazole 1%) .....	48
Figure 25 : Résultats de l'activité synergique sur gélose contenant des concentrations décroissantes du fongicide plus la CMI d'huile essentielle.....	49

## Liste des abréviations

**HE** : Les huiles essentielles

**ANSM** : L'Agence Nationale de la Sécurité du Médicament

**CMI** : la concentration minimale inhibitrice

**SRPV-DBK** : station régionale de la protection des végétaux Draa Ben Khedda

**ED** : l'eau distillé

***V. dahliae*** : *Verticillium Dahliae*

**AFNOR** : L'Agence Française de Normalisation

**COV** : composés organiques volatils

**HD** : hydrodistillation

**SFME** : Le protocole expérimental de l'extraction sans solvant assistée par micro-ondes

**SFE** : L'extraction par fluide supercritique

**TBA** : test au thiobarbiturique

**ROS** : la production accrue d'espèces réactives de l'oxygène

**ICAM** : la molécule d'adhésion intercellulaire

**VCAM** : la molécule d'adhésion cellulaire vasculaire

**GIR** : la Gestion Intégrée des Ravageurs

**POP** : les polluants organiques persistants

**GM** : Les variétés génétiquement modifiées

**CAZymes** : Les enzymes actives sur les glucides

**COV** : composés organiques volatils

**CLSI** : Clinical and Laboratory Standards Institute) (Institut clinique des laboratoires standards

**EUCAST** : Comité européen pour les tests de sensibilité aux antimicrobiens

# **Introduction générale**

## INTRODUCTION GENERALE

Les cultures, étant des sources de subsistance fondamentales, peuvent être sérieusement endommagées par des ravageurs tels que les insectes, les mauvaises herbes, les champignons, les pathogènes, les vecteurs des maladies, etc., et les pesticides sont les produits chimiques utilisés pour les contrôler ou les prévenir. Parmi les méthodes de contrôle les plus utilisées se trouvent les fongicides synthétiques, mais ils présentent des coûts élevés ainsi que des risques environnementaux et toxicologiques pour les agriculteurs. De plus, la recherche ardente pour la préservation de l'environnement ainsi qu'une meilleure sensibilisation écologique ont inspiré le besoin de produits d'origine naturelle, principalement d'origine végétale, visant à être un outil alternatif pour la gestion des phytopathogènes (Venturoso, Bacchi et al. 2011). Pour atténuer les problèmes mentionnés ci-dessus, de nouveaux produits dérivés des métabolites secondaires des plantes sont potentiellement utiles. De nombreuses plantes présentant une activité pesticides ont été trouvées pour être utilisées dans le contrôle des maladies des plantes, ainsi que comme matière première pour la formulation de nouveaux produits alternatifs. Les huiles essentielles (HE), étant des métabolites secondaires, peuvent être extraites de diverses végétaux. Il existe de nombreux rapports de littérature sur les activités antimicrobiennes des huiles essentielles obtenues à partir d'extraits de plantes, et ces effets peuvent être uniquement dus à la présence de composants bioactifs (Burt 2004). Plus intéressant encore, il a été découvert que ces activités peuvent être considérablement renforcées si l'huile essentielle est appliquée sous forme de petites gouttelettes (de préférence dans la gamme nano). Actuellement, les huiles essentielles sont régulièrement étudiées pour leurs propriétés antimicrobiennes, insecticides, antifongiques, antiulcéreuses, antihelminthiques, répulsives, cytotoxiques, antivirales, ovicides, anesthésiques, molluscicides, immunomodulatrices, antioxydantes, anti-inflammatoires, larvicides et antinociceptives ainsi que pour leur utilisation comme conservateurs alimentaires (Pandey, Kumar et al. 2017). Diverses études ont décrit l'utilisation des huiles essentielles comme agents antifongiques contre différents champignons détériorant les aliments et champignons de stockage. Avec l'augmentation des bactéries résistantes aux antibiotiques et le manque de nouveaux antibiotiques mis sur le marché, des stratégies alternatives doivent être trouvées pour faire face aux infections résultant des bactéries résistantes aux médicaments. Une solution possible consiste à combiner les antibiotiques existants avec des substances phytochimiques afin d'améliorer l'efficacité des antibiotiques. Les huiles essentielles (HE) et leurs composants constituent un groupe de produits phytochimiques qui auraient de tels effets, selon des études in vitro. Entre autres, les HE contenant du carvacrol, du cinnamaldéhyde, de l'acide cinnamique, de l'eugénol et du thymol

## INTRODUCTION GENERALE

peuvent avoir un effet synergique en combinaison avec des antibiotiques. Plusieurs modes d'action ont été avancés, selon lesquels les antibiotiques et les composants des huiles essentielles peuvent agir en synergie, notamment en affectant des cibles multiples, par des interactions physicochimiques et en inhibant les mécanismes de résistance antibactérienne. De nombreux essais rapportés montrent une additivité ou une synergie modérée, ce qui indique que les HE peuvent offrir des possibilités de réduction de l'utilisation des antibiotiques (Langeveld, Veldhuizen et al. 2014).

La lutte contre *Verticillium dahliae*, responsable de la verticilliose de l'olivier, représente un défi majeur pour les producteurs oléicoles. Les méthodes de contrôle actuelles, principalement basées sur l'utilisation de fongicides chimiques, suscitent des préoccupations croissantes en raison de leur impact environnemental et des risques de résistance des pathogènes. Dans ce contexte, les huiles essentielles, et notamment l'huile essentielle de thym, offrent une alternative naturelle et potentiellement efficace. Des études préliminaires ont démontré les propriétés antifongiques de cette huile, mais son efficacité spécifique contre *Verticillium dahliae* reste à explorer en profondeur. De plus, l'examen des interactions synergiques entre l'huile essentielle de thym et les fongicides conventionnels pourrait révéler des approches de gestion intégrées plus durables.

L'objectif de notre étude est d'évaluer l'efficacité de l'huile essentielle de thym contre *Verticillium dahliae* et de déterminer la synergie potentielle lorsqu'elle est utilisée en combinaison avec un fongicide. Nous espérons ainsi proposer une stratégie innovante et écologique pour la gestion de la verticilliose de l'olivier. Comment l'utilisation combinée de l'huile essentielle de thym et d'un fongicide peut-elle améliorer le contrôle de *Verticillium dahliae* tout en minimisant l'impact environnemental des traitements phytosanitaires ? Est-il possible de remplacer complètement les fongicides chimiques par l'huile essentielle de thym dans la lutte contre cette maladie ?

# **Chapitre I**

## **Les huiles essentielles**

## Introduction

L'Agence Nationale de la Sécurité du Médicament (ANSM) définit les huiles essentielles comme « des produits odorants, généralement de composition complexe, obtenus à partir d'une matière première végétale botaniquement définie, soit par entraînement à la vapeur, soit par distillation sèche, soit par un procédé mécanique adapté sans chauffage ». Environ 30 000 plantes peuvent être utilisées pour produire des huiles essentielles et plus de 150 types d'huiles différentes sont disponibles sur le marché. Connus depuis des centaines d'années, ils sont utilisés dans de nombreux domaines, comme l'industrie agroalimentaire, la parfumerie, les produits d'entretien, la médecine traditionnelle et l'aromathérapie (De Groot and Schmidt 2016).

Depuis de nombreuses années, de multiples recherches scientifiques en pathologie humaine se sont concentrées sur les propriétés antimicrobiennes, anti-inflammatoires et anxiolytiques des huiles essentielles. Actuellement, les principales huiles essentielles étudiées pour leur activité antifongique sont l'huile de thym, riche en thymol et en carvacrol, l'huile d'arbre à thé riche en terpènes et l'huile de menthe poivrée ou de clou de girofle, bien que de nombreuses autres se soient également révélées efficaces contre les champignons. Les huiles essentielles présentées dans cette revue ont été choisies en raison de leur effet antifongique prouvé et de leur utilisation fréquente. Il en existe bien d'autres ailleurs, mais nous avons choisi d'en étudier un nombre limité afin de ne pas surcharger cette présentation (Rajkowska, Otlewska et al. 2017).

### 1.1. Définition

Les huiles essentielles sont des liquides volatils fortement concentrés, huileux, hydrophobes, générés par différents matériaux végétaux, y compris les racines, les fruits, le bois, les herbes, l'écorce, les brindilles, les feuilles, les graines, les bourgeons, les rhizomes, les écorces, les fleurs et l'ensemble de la plante appartenant à une espèce botanique distincte (Wani, Yadav et al. 2021).

### 1.2. Les composés chimiques des huiles essentielles

Depuis des millénaires, les huiles essentielles sont extraites des plantes aromatiques et essentielles et utilisées dans diverses applications. Elles sont réputées pour leurs propriétés thérapeutiques, en particulier anti-infectieuses, souvent sous-forme de produits non médicamenteux. Étant donné qu'il s'agit de composés volatils, elles jouent également un important rôle dans la défense des plantes et des forêts contre les agressions naturelles. Leurs

composés, grâce à leurs caractéristiques physico-chimiques, sont appelés composés organiques volatils (COV). Ce terme est parfois aussi utilisé pour désigner d'autres composés volatils issus proprement de l'activité humaine et qui sont volatiles à température ambiante (Soualeh and Soulimani 2016). La plupart des huiles essentielles sont composées de constituants aromatiques aliphatiques ; de terpènes, de terpénoïdes de faible poids moléculaire ; de métabolites végétaux secondaires lipophiles et hautement volatils ; de mono- et sesquiterpènes ; et de phénols allyliques et isoallyliques.

### 1.2.1. Terpènes

Ils sont formés par la condensation de deux ou plusieurs unités d'isoprène représentées par la formule chimique  $(C_5H_8)_n$  par le biais de la voie de l'acide mévalonique, qui se produit dans le cytoplasme de la cellule (Basavegowda, Patra et al. 2020). En fonction du nombre d'atomes de carbone présents dans la structure, les terpènes sont classés comme mono-, sesqui-, di-, ses-, tri- et tétraterpènes (caroténoïdes), et des hémiterpènes alternatifs. Les terpènes sont souvent des hydrocarbures, mais les alcools, les aldéhydes ou les cétones sont des composés contenant de l'oxygène et ces terpènes sont connus sous le nom de terpénoïdes.

Les monoterpènes sont les structures les plus fragiles, composées de deux unités d'isoprène couvrant une large gamme d'états d'oxydation tels que des formes monocycliques, bicycliques et acycliques, et des groupes fonctionnels organiques comprenant des hydrocarbures (myrcène, camphène,  $\alpha$ -pinène,  $\alpha$ -terpinène et *p*-cymène) et des alcools (menthol, nérol, bornéol et linalol). Il existe d'autres groupes fonctionnels comme les aldéhydes (géraniol et citronellal), les esters (acétate de citronellyle, acétate de linalyle et menthyle), les cétones (camphre, pulégone et carvone), les peroxydes (ascaridole), les phénols (carvacrol et thymol) et les éthers (1,8-cinéole et menthofurane), qui sont également des constituants principaux des huiles essentielles (Eslahi, Fahimi et al. 2017).

Les sesquiterpènes sont les principaux types de terpènes formés à partir de la combinaison de trois unités d'isoprène. Les sesquiterpènes fournissent la note épicée et sont des composés insaturés, qui comprennent des hydrocarbures (azulène,  $\beta$ -bisabolène, cadinènes, germacrène, humulène, farnésènes, zingibérène et  $\beta$ -caryophyllène), des sesquiterpènes oxygénés (oxyde de caryophyllène, spathuléol et nérolidol), des alcools (patchoulol, bisabolol,  $\beta$ -nérolidol, farnésol,  $\beta$ -santalol et patchoulol), des acides (acide benzoïque et acide géranique), des aldéhydes (citral), des cétones (germacrone, benzophénone, acétophénone,  $\beta$ -vétinone et

turmérones), des époxydes (oxyde de caryophyllène et époxydes d'humulène) et des lactones (bergaptène) (Swamy, Akhtar et al. 2016).

Il existe également des huiles essentielles qui contiennent différents types de composés organiques, tels que les stéroïdes (Manayi, Nabavi et al. 2016), les alcaloïdes (Silva, Zimmer et al. 2016), les tanins (Salini, Pandian et al. 2015) et les flavonoïdes (Martin-Rodriguez, Guillen-Grima et al. 2015).

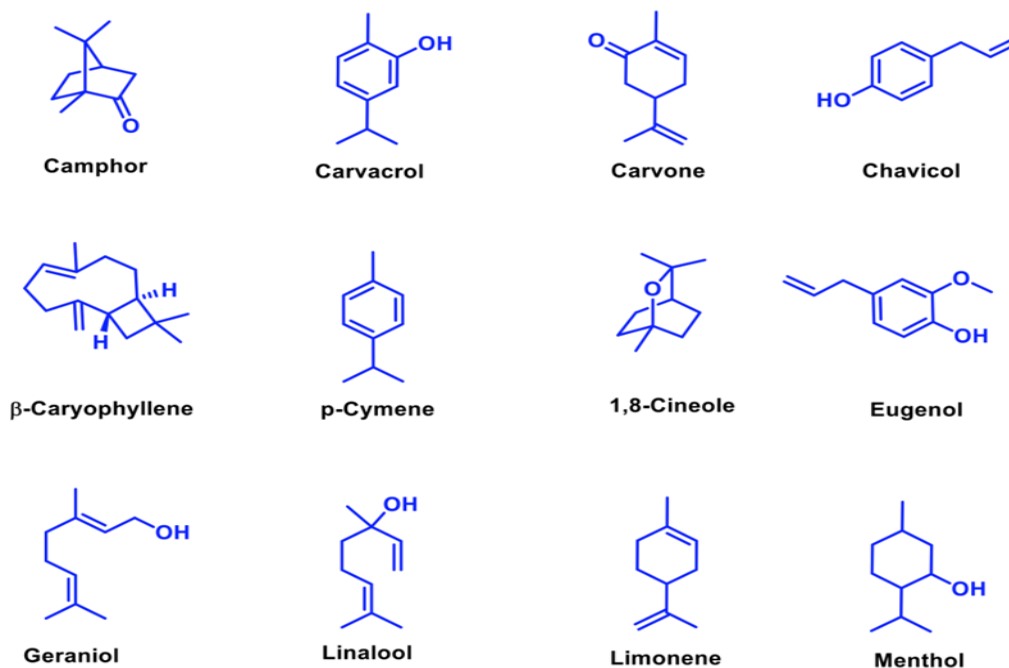
### 1.2.2. Les composés aromatiques

Par rapport aux terpènes, ils représentent une petite partie des huiles essentielles. Ils renferment de l'alcool (alcool cinnamylique) ; du benzène (styrène) ; des aldéhydes (cinnamaldéhyde) ; des phénols (chavicol, eugénol, vanilline et cinnamaldéhyde) ; des composés méthoxy (méthyleugénol, élémicine, estragole et anéthole), et des dérivés méthylènedioxy (safrole, myristine et apiol) (Grayson 2000).

### 1.2.3. Composés d'origine diverses

Les huiles essentielles contiennent également des composés soufrés et azotés sous forme d'aglycone ou de glucosinolates (Geranpour, Assadpour et al. 2020). Les composés contenant du soufre, à savoir le sulfure de diméthyle, le sulfure d'allyle, le sulfure de diallyle et le diméthylthiophène, sont principalement responsables de l'odeur et du goût caractéristiques (Iranshahi 2012). Les composés contenant de l'azote, comme l'indole, la pyridine, le méthylanthranilate et la pyrazine, se trouvent dans seulement quelques huiles essentielles (Morsy and plants 2017).

Les constituants chimiques majeurs et biologiquement importants des huiles essentielles et leurs structures sont représentés dans la Figure 1.



**Figure 1.** Principaux constituants bioactifs et biologiquement importants présents dans les huiles essentielles (Abd-Elsalam and Murugan 2022).

### 1.3. Localisation des huiles essentielles

Plusieurs plantes contiennent des huiles essentielles, cependant, les parties des plantes qui servent de source principale d'huile essentielle peuvent être différentes (Tableau 1). Celles-ci comprennent les racines, les écorces, les feuilles, les graines, les fruits, les écorces, etc.

Selon Masango (2005) les huiles essentielles végétales sont souvent composées d'un mélange complexe de composés naturels, à la fois polaires et non polaires.

**Tableau 1.** Les parties de la plante contenant des huiles essentielles (Tongnuanchan and Benjakul 2014).

Parties de la plante	Plantes
Feuilles	Basilic, feuille de laurier, cannelle, sauge commune, eucalyptus, citronnelle, citronnelle de Java, melaleuca, menthe, organ, patchouli, menthe poivrée, pin, romarin, menthe verte, arbre à thé, thym, gaulthérie, lime de Kaffir, laurier, sarriette, estragon, cajeput, lantana, myrte citronnée, citron théier, niaouli, Chang de mai, petit grain, cyprès

## CHAPITRE 1 : LES HUILES ESSENTIELLES

---

Graines	Amande, anise, cardamome, carvi, carotte, céleri, coriandre, cumin, muscade, persil, fenouil
Bois	Amyris, cèdre de l'Atlas, cèdre de l'Himalaya, camphre, bois de rose, bois de santal, myrte, bois de gaïac
Écorce	Cassia, cannelle, sassafras, katrafay
Baies	Piment de la Jamaïque, genièvre
Résine	Oliban, myrrhe
Fleurs	Tanaisie bleue, camomille, sauge sclarée, clou de girofle, cumin, géranium, hélichryse, hysope, jasmin, lavande, manuka, marjolaine, orange, rose, baccharises, palmarosa, patchouli, anthopogon de rhododendron, rosélia, ajowan, ylang-ylang, marjolaine sylvestre, estragon, immortelle, néroli
Écorce	Bergamote, pamplemousse, lime de Kaffir, citron, lime, orange, mandarine
Racine	Gingembre, plai, curcuma, valériane, vétiver, nard, angélique
Fruits	Xanthoxylum, noix de muscade, poivre noir

---

### 1.4. Le rendement en huiles essentielles

Les HE sont des sécrétions naturelles élaborées par le végétal et contenues dans les cellules ou parties de la plante (Serrato-Valenti, Bisio et al. 1997). Seules les parties sécrétrices ou les plus concentrées de la plante sont récoltées à la période de rendement optimum : avant la floraison (menthes), pendant (lavandes) et après celle-ci (plantes à graines) ou encore après la rosée du matin (fleurs fragiles) (Sacco, Maffei et al. 1999). Les quantités d'HE produites par les plantes sont minimales, entraînant des rendements d'extraction extrêmement faibles, généralement inférieurs à 2%. Le rendement le plus faible est observé pour l'Iris qui demande environ 4 kg de poudre pour obtenir 1 g pur, ce qui explique le tarif exorbitant de cette huile essentielle.

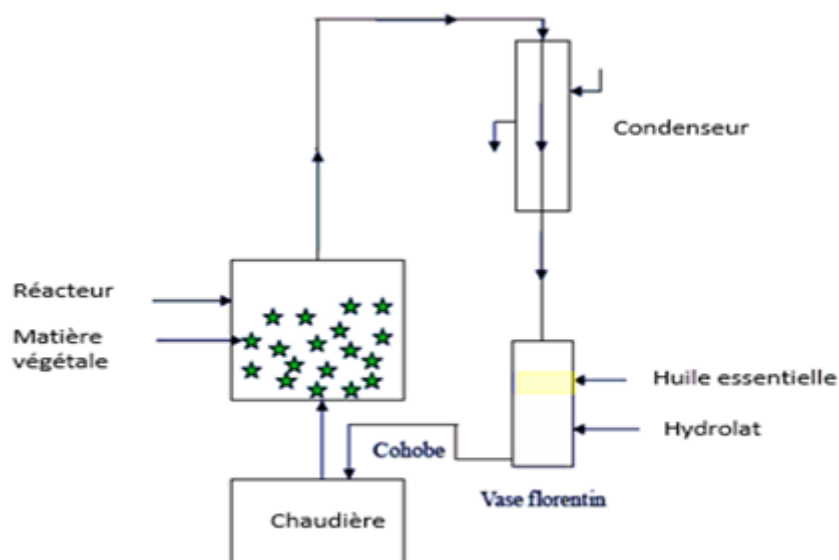
### 1.5. Méthodes d'extraction des huiles essentielles

#### 1.5.1. Extraction par entraînement à la vapeur d'eau

C'est l'une des méthodes officielles utilisées pour obtenir des HE (Figure 2) (Européenne 2007). Dans ce système d'extraction, le matériel végétal est soumis à un courant de vapeur sans macération préalable. Les vapeurs saturées en composés volatils sont condensées puis

décantées dans l'essencier, avant d'être séparées en une phase aqueuse (HA) et une phase organique (HE). L'absence de contact direct entre l'eau et la matière végétale, puis entre l'eau et les molécules aromatiques, permet d'éviter certains phénomènes d'hydrolyse ou de dégradation qui pourraient altérer la qualité de l'huile. De plus, le parfum de l'HE obtenue est plus délicat et la distillation, qui est régulière et plus rapide, entraîne une richesse en esters dans les notes de tête (Raaman 2006). Les fractions dites « de tête », fragrances très volatiles dues à des molécules légères, apparaissent en premier.

Le plus souvent, une demi-heure permet de recueillir 95 % des molécules volatiles, ce qui suffit aux besoins de l'industrie et de la parfumerie, comme pour la lavande. L'emploi en aromathérapie impose de prolonger l'opération aussi longtemps qu'il est nécessaire afin de récupérer la totalité des composants aromatiques volatils (Kaloustian and Hadji-Minaglou 2012).



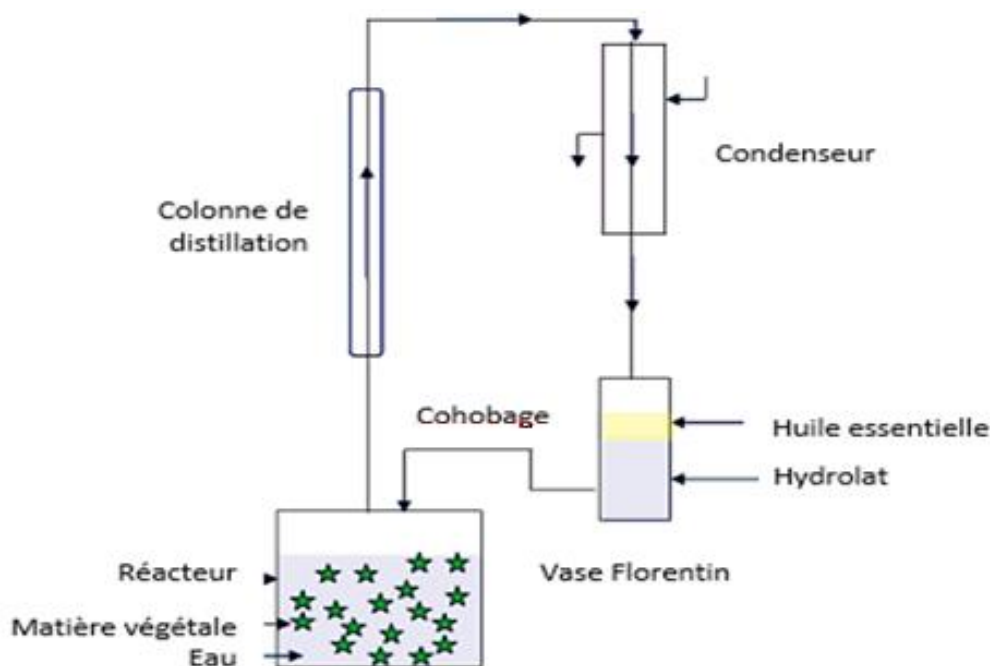
**Figure 2 :** Schéma de l'extraction par entraînement à la vapeur (Farhat 2010).

### 1.5.2. Extraction par Hydrodistillation

Elle consiste à immerger la matière première dans un bain d'eau et l'ensemble est porté à ébullition, à pression atmosphérique (Figure 3). La distillation peut s'effectuer avec ou sans cohobage des eaux aromatiques obtenues lors de la décantation. Ce procédé présente des inconvénients principalement liés à l'action de la vapeur d'eau ; Certains organes végétaux, en particulier les fleurs, sont trop fragiles et ne supportent pas les traitements par entraînement à la vapeur d'eau et par hydrodistillation (HD) (Farhat 2010). Toutefois, le contact direct des

## CHAPITRE 1 : LES HUILES ESSENTIELLES

constituants de l'HE avec l'eau occasionne des réactions chimiques conduisant à des changements dans la composition finale de l'extrait (Raaman 2006). Les conditions opératoires, notamment, la durée de distillation a une influence considérable sur le rendement et la composition de l'HE. C'est la raison pour laquelle des modèles mathématiques ont été développés pour optimiser ces conditions, afin de produire des HE de manière reproductible. La labilité des constituants des HE explique que la composition du produit obtenu par HD soit, le plus souvent, différente de celle du mélange initialement présent dans les organes sécréteurs du végétal (Boukhatem 2018). L'hydrodistillation présente des limites notables. Parmi celles-ci, la dégradation de certaines molécules aromatiques qui est principalement attribuable à un chauffage prolongé et intense. Ce processus peut entraîner des changements indésirables dans la composition chimique des huiles essentielles. De plus, l'eau présente dans le système ainsi que l'acidité peuvent aggraver ce phénomène en favorisant l'hydrolyse des esters, des réarrangements moléculaires, des isomérisations, des racémisations et/ou des oxydations, ce qui altère davantage la qualité et la composition des huiles essentielles extraites (Bruneton 1999), ce qui explique les variations importantes de la composition des huiles essentielles relevées dans la littérature.



**Figure 3:** Principe schématisé de l'hydrodistillation (HD) (Farhat 2010).

### 1.5.3. Extraction par solvant organique

Les solvants les plus utilisés sont l'hexane, cyclohexane, l'éthanol, et moins fréquemment le dichlorométhane et l'acétone. Le choix du solvant est important, il doit être autorisé et possédant une certaine stabilité face à la chaleur, à la lumière ou à l'oxygène. Idéalement, il doit avoir une température d'ébullition basse afin de faciliter son élimination, et il ne doit pas réagir chimiquement avec l'extrait. L'extraction est réalisée avec un appareil de Soxhlet. Ces solvants sont préférés pour leur capacité d'extraction plus élevée par rapport à l'eau, ce qui permet d'extraire non seulement les composés volatils, mais aussi une gamme étendue de composés non volatils tels que les cires, les pigments, les acides gras et diverses autres substances (Boukhatem, Ferhat et al. 2019).

Selon la méthode et le solvant utilisé, on obtient des hydrolysats (eau comme solvant), des alcoolats (éthanol dilué), des teintures (éthanol/eau), des résinoïdes (extraits éthanoliques concentrés) et des concrètes (extraits à froid et à chaud au moyen de solvants divers) (Hernandez Ochoa 2005).

La technique d'extraction « classique » par solvant, consiste à placer, dans un extracteur, un solvant volatil et la matière végétale à traiter. Grâce à des lavages successifs, le solvant va se charger en molécules aromatiques, avant d'être envoyé au concentrateur pour y être distillé à pression atmosphérique. La limitation de l'utilisation de solvants organiques volatils est motivée par son coût, les problèmes de sécurité et de toxicité, ainsi que la réglementation en matière de protection de l'environnement. Toutefois, les performances sont habituellement supérieures à celles de la distillation et cette méthode évite l'effet hydrolysant de la vapeur d'eau (Lucchesi 2005).

Face à cette situation, deux nouvelles techniques ont été mises au point, ces dernières années, pour la distillation des substances d'arômes à partir des plantes : l'extraction assistée par micro-ondes et l'extraction par le CO<sub>2</sub> supercritique.

### 1.5.4. Extraction assistée par micro-ondes

L'avantage de ce procédé réside dans sa capacité à réduire considérablement la durée de distillation et incrémenter le rendement. Toutefois, aucun développement industriel n'a été réalisé à ce jour. La distillation assistée par micro-ondes fait aujourd'hui l'objet de nombreuses études et ne cesse d'être améliorée, car elle offre de nombreux avantages tels que : technologie

verte, économie d'énergie et de temps, investissement initial réduit et dégradations thermiques et hydrolytiques minimisées (Olivero-Verbel, González-Cervera et al. 2010).

L'emploi des micro-ondes constitue, par ailleurs, une méthode d'extraction à part entière en plein développement. À titre d'exemple, la SFME (Solvent Free Microwave Exatrcction) est une combinaison originale des techniques de chauffage par micro-ondes et de distillation sèche. Elle consiste à placer le matériel végétal dans un réacteur au sein d'un four micro-ondes sans ajout d'eau ou de solvant. Les cellules de la plante sont dilatées par le chauffage interne de l'eau, ce qui entraîne la rupture des glandes et des réceptacles oléifères, l'HE ainsi libérée est évaporée avec l'eau de la plante (Wang, Ding et al. 2006). Comparée à L'hydrodistillation traditionnelle, on observe une diminution de la consommation énergétique et des rejets en CO<sub>2</sub>, mais, surtout, le temps d'extraction qui est 9 fois plus rapide. Les huiles essentielles provenant de cette méthode contiennent une proportion plus élevée de composés oxygénés, avec des valeurs odorantes plus importantes, tandis que les monoterpènes sont présents en moindre quantité (Golmakani and Rezaei 2008).

Le protocole expérimental de l'extraction sans solvant assistée par micro-ondes (SFME) s'articule autour de trois points importants :

- La quantité de matière végétale a été fixée de manière à obtenir une quantité d'HE suffisante pour une séparation par simple décantation. Le but de ce protocole étant d'éviter l'usage de solvant organique afin d'obtenir un produit le plus « propre » possible ;
- La puissance micro-ondes appliquée (300-450 Watts) lors de l'extraction SFME est obligatoirement en fonction de la quantité de matière végétale à traiter. Cette grandeur représente la quantité de puissance appliquée en Watts par kilogramme de matériel végétal traité ;
- Le temps total de l'extraction est composé du temps de chauffage (première étape = 10 mn) et du temps d'extraction (seconde étape = 10 mn). Étant donné que les micro-ondes ont une capacité de chauffage bien supérieure à celle d'un chauffage traditionnel, l'extraction sous micro-ondes sera beaucoup plus rapide que l'hydrodistillation traditionnelle (Farhat 2010). Là encore, des expériences préliminaires ainsi que les données de la littérature, ont montré que sous micro-ondes, contrairement à une extraction classique de type « hydrodistillation », il n'était pas nécessaire de chauffer pendant de longues périodes pour obtenir des rendements intéressants (Cravotto 2013) . Les micro-ondes agissent sur certaines molécules, telles que l'eau, qui absorbent l'onde,

et convertissent son énergie en chaleur. Contrairement au chauffage classique par conduction ou convection, le dégagement de chaleur a lieu dans la masse. Ainsi dans une plante, les micro-ondes sont absorbées par les parties les plus riches en eau (les vacuoles, véritables réservoirs liquides des cellules), puis converties en chaleur. Il en résulte une soudaine augmentation de la température à l'intérieur du matériel, jusqu'à ce que la pression interne dépasse la capacité d'expansion des parois cellulaires. La vapeur détruit la structure des cellules végétales, et les substances situées à l'intérieur des cellules peuvent alors s'écouler librement à l'extérieur du tissu biologique, et l'HE est alors entraînée par la vapeur d'eau (Farhat 2010).

(Lucchesi 2005) ont extrait des HE par SFME de trois herbes aromatiques : basilic, menthe et thym. Grâce à cette méthode, ils ont isolé et concentré les composés volatiles en une seule étape, sans ajout de solvant ou d'eau. Les HE extraites sont plus riches en composés oxygénés, comparativement à la méthode conventionnelle. En réalité, la présence élevée de composés oxygénés dans l'huile essentielle est associée à la rapidité du chauffage des substances polaires à l'aide des micro-ondes et à la faible quantité d'eau dans le milieu, ce qui empêche la dégradation des composés par réactions thermiques et hydrolytiques. Cette technique offre plusieurs avantages comme un temps d'extraction plus courts, une réduction de la quantité de solvant, une très bonne reproductibilité ainsi que de bons rendements.

Les HE obtenues par distillation ne représentent jamais exactement l'arôme et le parfum existants naturellement dans la plante. L'extraction assistée aux micro-ondes, une nouvelle technique innovante et écologique, peut permettre de résoudre certains problèmes de la distillation.

### 1.5.5. Extraction par fluide à l'état supercritique

L'extraction par fluide supercritique, également connue sous le nom de SFE, est unique en raison de l'utilisation de solvants dans leur état supercritique, c'est-à-dire dans des conditions de température et de pression où le solvant se trouve dans un état intermédiaire entre les phases liquide et gazeuse, et possède des propriétés physico-chimiques distinctes, telles qu'un pouvoir de solvation plus élevé. Si, en pratique, de nombreux solvants peuvent être employés, 90% des SFE sont réalisées avec le dioxyde de carbone (CO<sub>2</sub>), principalement pour des raisons pratiques. En plus de sa facilité d'obtention due à ses pression et température critiques relativement basses, le CO<sub>2</sub> est relativement non toxique, disponible à haute pureté et à faible prix, et il possède l'avantage d'être éliminé aisément de l'extrait (Leszczynska 2007).

La SFE est une technique dite « verte » n'utilisant pas ou peu de solvant organique et présentant l'avantage d'être bien plus rapide que les méthodes traditionnelles. Les compositions chimiques des HE ainsi obtenues peuvent présenter des différences, qualitatives et quantitatives, avec celles issues de l'hydrodistillation (Pereira, Meireles et al. 2010).

### 1.6. Bioactivités des constituants des huiles essentielles

Les huiles essentielles provenant de différentes parties de plantes présentent différentes activités biologiques (Cowan 1999). Les activités biologiques des huiles essentielles comprennent des propriétés antioxydantes, antimicrobiennes, antivirales, antifongiques et anticancéreuses (Bakkali, Averbeck et al. 2008). Les composés inactifs peuvent influencer la résorption, le taux de réactions et l'activité biologique des composés actifs. La combinaison des constituants majeurs et mineurs modifie l'activité pour exercer un effet significatif synergique ou antagoniste (Pandey, Singh et al. 2014) .

#### 1.6.1. Activité antibactérienne

Les huiles volatiles de nombreuses plantes sont connues pour avoir une activité antimicrobienne (Piccaglia, Marotti et al. 1993) . Cette activité pourrait agir comme une défense chimique contre les maladies pathogènes des plantes.

Les agents pathogènes peuvent facilement pénétrer au niveau des sites de blessure causés, par exemple, par les herbivores. Si une blessure se produit au niveau des feuilles qui sont recouvertes de glandes d'huiles volatiles, cela provoque la rupture des glandes, entraînant l'écoulement de l'huile sur la plaie. L'existence, par conséquent, d'une activité antimicrobienne dans l'huile serait d'un bénéfice considérable pour la plante. En effet, une grande majorité des plantes aromatiques et médicinales ne succombent pas à bon nombre des maladies les plus courantes. Il est également suggéré qu'une huile complexe présente une barrière plus importante à l'adaptation des pathogènes qu'un mélange plus simple de monoterpènes. Cette théorie est bien documentée dans l'étude détaillée de l'huile volatile de *Myrica gale* et de ses propriétés inhibitrices contre un large spectre d'espèces fongiques (Svoboda, Inglis et al. 1998).

Les mélanges complexes de monoterpènes et de sesquiterpènes dans l'ensemble de l'huile représentaient la barrière la plus forte contre l'infection fongique. Deans and Ritchie (1987) ont examiné 50 huiles volatiles de plantes pour leurs propriétés antibactériennes contre 25 genres de bactéries, en utilisant une technique de diffusion sur agar. Les principales espèces végétales et les microorganismes étudiés par d'autres chercheurs au fil des années en utilisant cette même

technique, avec ou sans modifications, les huiles volatiles ont montré diverses réductions de la croissance des microorganismes, en fonction de la concentration en huile et de la composition chimique. Les microorganismes alimentaires (par exemple, *Salmonella enteritidis* et *Listeria monocytogenes*) suscitent un intérêt particulier (Fyfe, Armstrong et al. 1998).

### 1.6.2. Activité antioxydante

Des études ont été menées sur l'évaluation de l'activité antioxydante des huiles essentielles issues des plantes dans le but de déterminer leur capacité à préserver les lipides hautement insaturés présents dans les tissus animaux (Deans, Noble et al. 1993). Les huiles ont montré leur action en tant qu'agents hépato-protecteurs chez les mammifères vieillissants, et ces études ont décrit l'impact bénéfique des huiles volatiles sur les acides polyinsaturés, en particulier les acides longs en C20 et C22.

D'autres substances ont été proposées pour agir comme antioxydants in vivo. Elles comprennent le bêta-carotène, l'albumine, l'acide urique, les œstrogènes, les polyamines, les flavonoïdes, l'acide ascorbique, les phénoliques végétaux, la vitamine E et certains médicaments tels que les anti-inflammatoires non stéroïdiens. Ils peuvent stabiliser les membranes en diminuant leur perméabilité et ont également la capacité de lier les acides gras libres. Par ailleurs, il a été aussi suggéré que les huiles volatiles pourraient agir en tant qu'agents de ce type. Ils ont découvert que certaines huiles volatiles et leurs composants sont cytostatiques pour les lignées cellulaires tumorales et peuvent offrir un potentiel en tant qu'agents antiprolifératifs novateurs (Svoboda and Hampson 1999). (Damien Dorman, Deans et al. 1995) ont testé *Pelargonium sp.*, *Monarda citriodora var. citriodora*, *Myristica fragrans*, *Origanum vulgare ssp. hirtum* et *Thymus vulgaris* pour leur effet antioxydant à l'aide d'un test au thiobarbiturique (TBA). Les huiles ont montré des capacités antioxydantes actives à des niveaux de dilution extrêmement bas.

Le romarin, par exemple, est depuis longtemps reconnu pour ses molécules antioxydantes, identifiées comme l'acide carnosique, la carnosol, l'acide carsolique, le rosmaridiphénol et l'acide rosmarinique, présents dans la fraction soluble dans l'éthanol. Les propriétés antioxydantes se trouvent également dans la fraction d'huile volatile. Cependant, il est très important de comprendre que, dans certains cas, les antioxydants peuvent être pro-oxydants et peuvent stimuler des réactions de radicaux libres (Damien Dorman, Deans et al. 1995).

### 1.6.3. Activité antifongique

Les champignons sont des causes importantes d'infections humaines (Cavaleiro, Pinto et al. 2006). Plusieurs cultures sont susceptibles d'attaques fongiques, que ce soit dans le champ ou lors du stockage (Reyes-Jurado, Franco-Vega et al. 2015). Les résidus de fongicides posent des problèmes pour l'industrie alimentaire (Will, Krüger et al. 1999). La prévention de la croissance fongique est un moyen efficace d'empêcher l'accumulation de mycotoxines (Varga, Kocsubé et al. 2010). Les huiles essentielles ont la capacité d'attaquer le cycle de vie des moisissures (Sridhar, Rajagopal et al. 2003).

Les huiles essentielles et leurs constituants agissent sur les structures cellulaires fongiques de manière similaire à ce qui est décrit pour leur activité antibactérienne : les huiles provoquent des changements dans les fonctions essentielles à la survie microbienne. Les principales cibles de ces substances sont impliquées dans le maintien de la membrane fongique et de la paroi cellulaire (de Sousa, Damasceno et al. 2023).

Les changements de perméabilité de la membrane plasmique sont largement liés aux effets des huiles essentielles impliquant l'ergostérol. Les mécanismes d'action les plus étudiés comprennent à la fois la modulation de la biosynthèse de l'ergostérol et la liaison directe à l'ergostérol ; ces effets ont été visualisés pour les huiles essentielles d'*Anethum graveolens* L. et de *Coriandrum sativum* L., respectivement. Il n'a pas encore été entièrement élucidé, mais les enzymes impliquées dans la formation de l'ergostérol peuvent également fonctionner comme cibles pharmacologiques (Freires, Murata et al. 2014).

L'effet des huiles essentielles d'*Anethum graveolens* L. sur la membrane cellulaire fongique favorise une augmentation de l'activité de pompage des protons, avec une acidification consécutive induite par la présence de glucose dans l'environnement externe. L'action sur la membrane mitochondriale peut contribuer à la diminution de l'activité de l'ATPase intracellulaire, possiblement par action sur les déshydrogénases mitochondriales. Ce dommage cellulaire peut être mesuré par la production accrue d'espèces réactives de l'oxygène (ROS), un marqueur biochimique important du processus d'apoptose (Shahwar, El-Ghorab et al. 2012).

Inhiber la formation de la paroi cellulaire fongique est un autre mécanisme potentiel d'action des huiles essentielles et de leurs constituants. Des modèles expérimentaux *in vitro*, complétés par du sorbitol (un protecteur osmotique) dans le milieu de culture, et des études informatiques *in silico* indiquent que certaines huiles peuvent agir sur des enzymes telles que la delta-14-

stérol réductase et la 1,3- $\beta$ -glucane synthase, impliquées dans la synthèse de la paroi cellulaire (Danielli, Pippi et al. 2018).

L'évaluation de l'effet des huiles essentielles et de leurs constituants sur la micromorphologie fongique a contribué à augmenter notre connaissance de leurs mécanismes d'action. À titre d'exemple, l'huile essentielle de *C. sativum* a entraîné une réduction significative du développement des hyphes, pseudohyphes, chlamydoconidies et blastoconidies chez *Candida albicans* (Freires, Murata et al. 2014). L'huile essentielle de *C. sativum* L. contient généralement une quantité significative de linalol et une plus petite quantité de gamma-terpinène dans sa composition chimique (Shahwar, El-Ghorab et al. 2012). Ces monoterpènes ont une action antifongique contre diverses souches de champignons (Rivera-Yañez, Terrazas et al. 2017). Par conséquent, ils peuvent contribuer à l'activité antifongique des huiles essentielles qui les contiennent.

#### 1.6.4. Activité anticancéreuse

Le cancer est une maladie multifactorielle entraînant la prolifération incontrôlée de cellules anormales, conduisant à la formation d'une tumeur (Pavet, Portal et al. 2011).

Les métabolites secondaires de différentes plantes sont capables d'arrêter le développement du cancer (Rajput and Mandal 2012). En effet, les constituants des huiles essentielles ont des activités cytotoxiques et antitumorales, et jouent un rôle important dans la prévention et le traitement du cancer (Bhalla, Gupta et al. 2013). Les huiles essentielles peuvent être utilisées en combinaison avec la thérapie anticancéreuse pour réduire les effets secondaires des médicaments (Hadfield 2001).

La cytotoxicité des huiles essentielles est due à leur action sur l'intégrité cellulaire, entraînant la nécrose et l'apoptose, l'arrêt du cycle cellulaire et la perte de la fonction des organites clés (Russo, Corasaniti et al. 2015). Par conséquent, l'évaluation de l'activité anticancéreuse des huiles essentielles et leur sécurité sur les lignées cellulaires normales sont d'une grande importance (Sieniawska, Świątek et al. 2016). Par exemple, L'huile essentielle des feuilles de *Ricinus communis* a montré une activité antiproliférative modérée contre la ligne de cancer du col de l'utérus (Zarai, Chobba et al. 2012).

### 1.6.5. Activité anti-inflammatoire

L'inflammation est une réponse protectrice normale induite par une lésion tissulaire ou une infection, et elle fonctionne pour combattre les envahisseurs dans le corps (micro-organismes et cellules non propres) et éliminer les cellules hôtes mortes ou endommagées (Stevenson, Hurst et al. 2007). Dans la réponse inflammatoire, il y a une augmentation de la perméabilité des cellules tapissant les vaisseaux sanguins et un afflux de leucocytes sanguins dans l'interstitium, une explosion oxydative et la libération de cytokines (interleukines et facteur de nécrose tumorale- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ ). En même temps, l'activité de plusieurs enzymes (oxygénases, synthases d'oxyde nitrique, peroxydases) ainsi que le métabolisme de l'acide arachidonique sont induits. Dans le processus inflammatoire, il y a également l'expression de molécules d'adhésion cellulaire, telles que la molécule d'adhésion intercellulaire (ICAM) et la molécule d'adhésion cellulaire vasculaire (VCAM) (Gomes, Fernandes et al. 2008).

En plus de la capacité de certaines huiles essentielles à neutraliser les radicaux libres, il existe également des preuves que certaines huiles essentielles possèdent une activité anti-inflammatoire. Par exemple, l'huile essentielle de camomille est utilisée depuis des siècles comme anti-inflammatoire et aussi pour atténuer les symptômes associés à l'eczéma, la dermatite et d'autres irritations prononcées (Kamatou and Viljoen 2010). Cependant, il existe d'autres exemples d'huiles essentielles (eucalyptus, romarin, lavande, millefeuille) ainsi que d'autres plantes (pin, clou de girofle et myrrhe) qui ont été utilisées sous forme de formulations mixtes en tant qu'agents anti-inflammatoires (Darshan, Doreswamy et al. 2004).

L'œdème de la patte de souris induit par la carraghénane est fréquemment utilisé pour déterminer l'activité anti-inflammatoire de divers composés bioactifs tels que les extraits de plantes et les huiles essentielles. Bien que cette méthode permette de dépister l'activité anti-inflammatoire des échantillons, très peu d'informations sont données sur son mécanisme (Santos, Rao et al. 2000).

L'activité anti-inflammatoire des huiles essentielles peut être attribuée non seulement à leurs activités antioxydantes, mais aussi à leurs interactions avec les cascades de signalisation impliquant les cytokines et les facteurs de transcription régulateurs, ainsi qu'à l'expression des gènes pro-inflammatoires.

# **Chapitre II**

## **Les champignons pathogènes**

### Introduction

Les champignons présentent la plus grande diversité eucaryote de la planète avec une estimation prudente de 1,5 million d'espèces et ils sont l'un des principaux décomposeurs de l'écosystème (Capote, Pastrana et al. 2012). Les champignons se comportent à la fois comme des amis et des ennemis. De nombreuses espèces de champignons sont bénéfiques pour la santé humaine, végétale, animale et environnementale en raison de leurs utilisations économiques, médicales et commerciales. Par ailleurs, beaucoup d'entre eux sont nuisibles en raison de leur capacité à agir comme des agents pathogènes et à provoquer des maladies (Aslam, Tahir et al. 2017). A l'image du champignon *Verticillium dahliae*, responsable de la verticilliose, une maladie dévastatrice qui affecte diverses cultures agricoles en provoquant le flétrissement des plantes.

### 2.1. Définition

Les champignons font partie des agents causaux dominants des maladies végétales. Pour coloniser les plantes et provoquer des maladies, les champignons pathogènes utilisent diverses stratégies. Certains champignons tuent leurs hôtes et se nourrissent de matière morte (nécrotrophes), tandis que d'autres colonisent les tissus vivants (biotrophes). Pour une invasion réussie des organes végétaux, le développement pathogène est étroitement régulé et des structures d'infection spécialisées sont formées. Pour coloniser davantage les hôtes et établir la maladie, les pathogènes fongiques déploient une pléthore de facteurs de virulence. Selon la stratégie d'infection, les facteurs de virulence remplissent différentes fonctions. Alors que pratiquement tous les agents pathogènes interfèrent avec la défense primaire des plantes, les nécrotrophes sécrètent des toxines pour tuer les tissus végétaux. En revanche, les biotrophes utilisent des molécules effectrices pour supprimer la mort cellulaire végétale et manipuler le métabolisme végétal en faveur du pathogène (Doehle, Ökmen et al. 2017). Cependant, des combinaisons de ces modes de vie et de ces stratégies nutritionnelles existent également, et les pathogènes qui présentent une biotrophie initiale et transitoire, suivie d'une nécrotrophie, sont appelés hémibiotrophes (Rapilly 2001).

### 2.2. Modes de vie des champignons pathogènes des plantes

La catégorisation traditionnelle des pathogènes des plantes (nécrotrophes, biotrophes, hémibiotrophes) différencie les champignons en fonction de leur mode de vie pathogène et de la façon dont ils se nourrissent de l'hôte. Des découvertes récentes suggèrent que la division est moins stricte qu'on ne le pensait auparavant ; cependant, cette catégorisation définit des

dénominateurs de base qui sont communs à tous les organismes de chaque classe et simplifie la discussion sur les modes de vie pathogènes (Doehlemann, Ökmen et al. 2017).

### 2.2.1. Biotrophes

Les pathogènes ayant un mode de vie biotrophe peuvent être soit obligatoires, soit non obligatoires. Les biotrophes obligatoires sont, par exemple, les agents responsables des maladies de l'oïdium (*Ascomycota*) et de la rouille (*Basidiomycota*). Les vrais-mildious et les rouilles blanches sont également des parasites obligatoires ; cependant, ces espèces sont des *Oomycota* (*protozoaires*). Nous limiterons également la discussion aux parasites et n'inclurons donc pas les champignons biotrophes non pathogènes tels que les mycorhizes qui sont symbiotiques (Schulze-Lefert and Panstruga 2003).

#### 2.2.1.1 Biotrophes obligatoires

Les pathogènes biotrophes obligatoires, tels que les rouilles et l'oïdium, ont évolué pour correspondre au cycle de vie de leurs plantes hôtes et dépendent de celles-ci pour accomplir leur cycle de vie (Petersen 1974).

#### A. Les rouilles

Les champignons de la rouille (*Uredinales* ou *Pucciniales*) constituent un ordre dans le phylum très diversifié des *Basidiomycota* (Kirk, Cannon et al. 2008). Les rouilles sont des champignons obligatoirement biotrophes et exclusivement pathogènes sur les plantes vasculaires, y compris les fougères, les gymnospermes et la plupart des familles d'angiospermes. Ils sont présents dans tous les écosystèmes terrestres contenant des plantes. Leur exploitation des tissus vivants des plantes hôtes est connue pour causer d'importants dégâts aux cultures agricoles et forestières (Park and Wellings 2012), ainsi que pour provoquer des niveaux récurrents de maladies de faible à moyen niveau dans les populations végétales indigènes (Dinoor and Eshed 1984, Burdon, Thrall et al. 2006). De nombreuses espèces de rouille présentent des cycles de vie compliqués avec une spécificité variable des plantes hôtes (Anikster 1989). Comme les rouilles en croissance active ne peuvent pas survivre dans des conditions défavorables sur des tissus végétaux morts, des téliosporos de repos sont normalement produites à la fin de la saison de croissance et de nombreuses rouilles ont des cycles de vie annuels. Une caractéristique commune à de nombreuses rouilles est un cycle de vie hétéroécique, nécessitant deux taxons de plantes hôtes exclusifs et non apparentés pour leur achèvement, comme illustré dans l'exemple bien documenté de la rouille des tiges de blé sur les espèces de *Berberis* (épine-

vinette) et *Triticum* (blé). Ce cycle de vie peut comprendre jusqu'à cinq stades de spores (Cummins and Hiratsuka 2003). (Figure 4)



**Figure 4 :** Quelques symptômes de la maladie de la rouille (<https://www.planete-agrobio.com>)

### **B. L'oïdium**

Les champignons responsables de l'oïdium sont des ascomycètes pathogènes des plantes. Ces espèces font partie de la famille des *Erysiphacées*, la seule famille de l'ordre des *Erysiphales*. Ces champignons comprennent 900 espèces et plus de 80 genres (Braun 2011). Ils sont responsables des maladies de l'oïdium, qui sont probablement les maladies végétales les plus fréquentes et facilement reconnaissables. Les champignons de l'oïdium causent des maladies chez une large gamme d'hôtes angiospermes, y compris les plantes dicotylédones et monocotylédones. Les principales cultures telles que les céréales, les raisins, de nombreux fruits, légumes et plantes ornementales, font partie de leurs hôtes. Les symptômes facilement reconnaissables de l'oïdium incluent la présence de taches blanches poudreuses sur les deux faces des feuilles, les pétioles, les tiges, les fleurs et même les fruits (figure 5) (Green, Carver et al. 2002). Les oïdiums sont des parasites biotrophes obligatoires ; par conséquent, ces champignons ne causent pas directement la mort des cellules végétales, car ils ont besoin de cellules vivantes pour obtenir des nutriments et compléter leur cycle de vie (Vogel, Raab et al. 2004).



**Figure 5** : Quelques symptômes de la maladie de l'oïdium (<https://fr.wikipedia.org/>)

### 2.2.1.2 Biotrophes non obligatoires

Les pathogènes végétaux biotrophes non obligatoires sont taxonomiquement plus variables que les biotrophes obligatoires et peuvent être trouvés dans un plus large éventail de genres. Parmi eux, on trouve les charbons (*Basidiomycota*, *Ustilaginales*) et certaines espèces de *Claviceps* (*Ascomycota*, *Claviceptacea*). Contrairement aux espèces obligatoires, les espèces non obligatoires peuvent survivre et vivre sans l'hôte. Par exemple, le champignon responsable de la maladie de l'ergot (figure 6) , *Claviceps purpurea*, se comporte comme un vrai biotrophe chez la plante, mais peut être facilement cultivé en culture axénique ([Tudzynski and Scheffer 2004](#)).



**Figure 6** : Quelques symptômes de la maladie de l'ergot  
([https://fr.wikipedia.org/wiki/Ergot\\_du\\_seigle](https://fr.wikipedia.org/wiki/Ergot_du_seigle))

### 2.2.2. Nécrotrophes

Contrairement aux pathogènes biotrophes, qui se nourrissent de tissus végétaux vivants, les pathogènes végétaux nécrotrophes se nourrissent de tissus morts. Il est important de faire la distinction entre les vrais pathogènes nécrotrophes, qui attaquent et tuent les plantes saines, et les pathogènes nécrotrophes secondaires, qui ont une nature saprophyte mais peuvent

occasionnellement infecter des plantes qui ont été préalablement affaiblies, par exemple, par d'autres agents pathogènes, des blessures ou des effets abiotiques. Ici, nous discutons uniquement des vrais nécrotrophes. Le concept de base de la nécrotrophie est défini comme le mode d'infection dans lequel le pathogène tue le tissu avant la colonisation (Oliver and Solomon 2010). Cette définition est quelque peu oxymorique puisque le contact initial du moins est avec un tissu vivant. En effet, les premiers stades suivant la première rencontre avec l'hôte sont les plus critiques ; pour survivre, le pathogène doit subvertir la défense de la plante et générer une zone de tissu mort (nécrotique) dans laquelle il sera protégé de l'hôte et sur laquelle il pourra se nourrir. Les stades suivants des maladies nécrotrophes sont caractérisés par la propagation de la nécrose autour de la zone d'infection initiale, qui précède la progression du pathogène (Doehlemann, Ökmen et al. 2017).

### 2.2.3. Hémibiotrophes

Intuitivement, les pathogènes hémibiotrophes sont des espèces qui combinent des modes de vie biotrophes et nécrotrophes. La plupart des scientifiques définissent les hémibiotrophes comme des espèces qui ont une phase biotrophe variable avant de passer à la nécrotrophie (Perfect, O'Connell et al. 1998). Cette définition implique une phase biotrophe initiale réelle qui est médiée par des organes biotrophes spéciaux. Pendant cette phase, les pathogènes fongiques sécrètent également des effecteurs pour supprimer la défense de la plante. À la fin de la phase biotrophe transitoire, le champignon subit un changement développemental massif qui médié la transition d'un mode biotrophe à un mode nécrotrophe. Deux cas correspondent le mieux à ce scénario : le champignon du blast du riz *M. oryzae* (figure 7) et les espèces du genre *Colletotrichum*. Les pathogènes appartenant à ces groupes répondent à la définition classique de l'hémibiotrophie : après la pénétration dans les cellules subépidermiques ou épidermiques, ils développent des hyphes spécialisés qui forment des contacts étroits avec l'hôte et invaginent la membrane cellulaire de l'hôte, formant ainsi une véritable interphase biotrophe (bien que transitoire). Après une certaine période, qui peut durer de 1 à plusieurs jours (selon l'espèce), le champignon passe à un mode nécrotrophe classique. Cette transition comprend la différenciation du nouveau type d'hyphes, la sécrétion d'enzymes et de toxines, et la libération d'effecteurs spécialisés (Yi and Valent 2013).



**Figure 7** : maladie causal par le champignon du blast du riz  
(<https://fr.wikipedia.org/wiki/Pyriculariose>)

### **2.3. La lutte contre les champignons pathogènes de la plante**

#### **2.3.1. Contrôle chimique**

Il y a eu une forte dépendance aux produits chimiques pour contrôler les maladies et les ravageurs en agriculture et même aujourd'hui, ils restent le principal composant de la Gestion Intégrée des Ravageurs (GIR), comme le démontre l'utilisation croissante des fongicides depuis les années 1960 (Rampersad 2020). Ces formulations chimiques, bien qu'essentielles pour prévenir les pertes à grande échelle et la propagation des maladies dans les cultures, présentent plusieurs inconvénients tels que l'écotoxicité, la bioaccumulation, les effets néfastes sur les plantes et les animaux non ciblés, et la santé humaine (Raymaekers, Ponet et al. 2020). En outre, les données de la FAO-OMS et de l'Administration américaine des denrées alimentaires et des médicaments montrent que les polluants organiques persistants (POP) ne se dégradent pas facilement et restent déposés sur les fruits et légumes, pénétrant finalement dans les sources alimentaires d'origine animale telles que les produits laitiers, la volaille et la viande (Ab Rahman, Singh et al. 2018). De plus, l'utilisation de pesticides chimiques a conduit à une augmentation continue des pathogènes résistants, entraînant une efficacité réduite de la plupart des méthodes de contrôle chimique.

#### **2.3.2. Variétés résistantes**

Le processus de sélection des cultures et d'amélioration des plantes sont des critères bien connus et éprouvés qui sont appliqués en agriculture pour améliorer les variétés de cultures et

produire des cultivars résistants aux maladies. Ces pratiques sont encore utilisées aujourd'hui et se sont avérées bénéfiques dans la lutte contre divers types de pathogènes végétaux pathogènes (Ab Rahman, Singh et al. 2018) . La voie génétique est l'une des applications biotechnologiques les plus favorisées dans notre lutte sans fin pour augmenter la production alimentaire. Les variétés génétiquement modifiées (GM) ne sont pas seulement résistantes aux maladies, mais produisent également des cultures de meilleure qualité et réduisent considérablement le besoin d'apports externes de produits chimiques coûteux, rendant ainsi leur production économiquement viable. Malgré ces avantages, les cultures GM nécessitent l'approbation des agences réglementaires à un coût élevé et ne sont pas facilement acceptées par les consommateurs. De plus, ces cultures peuvent également présenter une susceptibilité aux pathogènes quelques années après leur cultivation en raison de plusieurs causes comme des mutations survenant dans les pathogènes ciblés, une réduction de la résistance sur le terrain due à divers événements de recombinaison, et un manque d'uniformité génétique au sein des cultures GM. De nombreuses cultures ont montré des indications de défaillance de la résistance, y compris la résistance à la pyriculariose du riz, la maladie de la boucle des feuilles du coton, le mildiou de la vigne et la rouille jaune du blé. Néanmoins, des résultats encourageants sont obtenus en laboratoire en utilisant l'édition du génome par CRISPR/Cas9 et l'insertion de cassettes géniques à l'aide de technologies intragéniques et il est prévu qu'à l'avenir proche, ces approches puissent être la voie à suivre et puissent être utilisées au même niveau que les technologies conventionnelles d'amélioration des plantes. D'autres méthodes de sélection impliquant le pyramidalage de gènes, la rotation de gènes et les variétés multilignées offrent également des avantages dans le contrôle de la résistance. Il est impératif que de nouveaux outils biotechnologiques meilleurs et plus récents soient développés et appliqués afin d'accélérer la production de cultivars résistants aux maladies améliorées afin de gérer les nouveaux pathogènes agressifs (Miah, Rafii et al. 2017).

### 2.3.3. Contrôle biologique

Parmi les méthodes non chimiques de lutte contre les ravageurs et les pathogènes, le contrôle biologique semble être le plus adapté à la culture biologique. Il est écologiquement sûr, durable, économiquement viable et hautement spécifique. Un certain nombre de ces méthodes sont actuellement utilisées, comme l'utilisation de micro-organismes du sol naturellement présents contre divers ravageurs et pathogènes (Mishra, Ellouze et al. 2018). Une compréhension plus approfondie des relations entre les plantes et les pathogènes ainsi que des facteurs environnementaux prévalant dans une zone particulière doit être comprise avant la mise en

œuvre du contrôle biologique, en particulier dans des conditions de maladies généralisées. En phytopathologie, le contrôle biologique est défini comme l'interaction de nombreux éléments environnementaux dans le but de réduire les impacts négatifs des espèces nuisibles tout en favorisant la croissance des cultures bénéfiques, des insectes utiles et des micro-organismes (Pal and Gardener 2006). Le contrôle biologique dépend de nombreuses interactions agonistes et antagonistes entre les plantes et les microbes vivant dans la rhizosphère et la phyllosphère (Mishra, Singh et al. 2015), et de leur application pour minimiser les maladies et maîtriser les ravageurs. Les organismes de la rhizosphère peuvent être exploités à partir de l'environnement environnant (approche de la boîte noire) ou peuvent être introduits dans le champ à partir de sources externes (approche de la balle d'argent). Il est avantageux d'appliquer un consortium de micro-organismes aux propriétés collaboratives plutôt que de se fier à un seul organisme car les consortia microbiens constituent une rhizosphère stable offrant un contrôle plus efficace contre les pathogènes (Ram, Keswani et al. 2018). Outre les applications microbiennes, l'utilisation d'autres produits végétaux tels que les extraits, les biofertilisants et les biopesticides, les ennemis naturels des ravageurs et des pathogènes, et les produits géniques contribuent également à la mise en œuvre du contrôle biologique (Ab Rahman, Singh et al. 2018).

### **2.4. Les stratégies d'adaptations des champignons pathogènes**

#### **2.4.1. Stratégies fongiques pour la pénétration chez l'hôte**

Les champignons pathogènes doivent surmonter les barrières cellulaires des hôtes pour les envahir. Ils utilisent des appressoria pour exercer une pression de turgescence et des enzymes dégradant la paroi cellulaire pour pénétrer les parois cellulaires végétales (Ryder and Talbot 2015). Les enzymes actives sur les glucides (CAZymes) sont essentielles à cette tâche, les champignons produisant différents types d'enzymes pour dégrader les parois cellulaires hôtes (Lombard, Golaconda Ramulu et al. 2013). Les champignons pathogènes végétaux ont généralement plus de gènes CAZyme que les espèces saprophytes et pathogènes animales (Zhao, Liu et al. 2014). Alors que les biotrophes obligatoires ont des catalogues d'enzymes dégradant la paroi cellulaire moins étendus, les champignons nécrotrophes comptent sur de vastes catalogues pour initier la colonisation (Bolton, Thomma et al. 2006). Ces enzymes peuvent agir en synergie pour augmenter la virulence du champignon (Paccanaro, Sella et al. 2017). Les champignons sécrètent également des enzymes pour modifier leurs propres parois cellulaires, facilitant ainsi la colonisation de l'hôte (Doehlemann, Ökmen et al. 2017).

### 2.4.2. Les stratégies fongiques pour éviter la reconnaissance par les plantes

Les champignons ont développé diverses stratégies pour éviter une reconnaissance par les plantes. Les récepteurs immunitaires des plantes détectent les ligands pathogènes (Couto and Zipfel 2016), tels que les composants de la paroi cellulaire fongique comme les glucanes et la chitine. En réponse, les plantes activent leurs défenses en sécrétant des enzymes pour compromettre l'intégrité des parois cellulaires fongiques. Cependant, les champignons ont évolué pour modifier la composition de leurs parois ou sécréter des effecteurs afin d'éviter cette reconnaissance (Côté, Roberts et al. 2000). Par exemple, champignon *Magnaporthe oryzae* est un pathogène fongique hémibiotrophe, et l'agent causal de la maladie de la pyriculariose du riz (Dean, Talbot et al. 2005). Il accumule des  $\alpha$ -1,3-glucanes pour inhiber la dégradation de la chitine par les plantes. Pendant l'infection, *M. oryzae* répond au composant de cire épidermique 1,16-hexadécane-1,16-diol en accumulant des  $\alpha$ -1,3-glucanes à la surface de la paroi cellulaire, ce qui entraîne l'inhibition de la dégradation de la chitine par les chitinases des plantes (Fujikawa, Sakaguchi et al. 2012), tandis que d'autres champignons sécrètent des protéines effectrices pour supprimer l'immunité des plantes. De plus, certains champignons produisent des protéines pour affecter les enzymes hydrolytiques des plantes et empêcher la détection des composants de la paroi cellulaire (Sánchez-Vallet, Mesters et al. 2015).

### 2.4.3. Les stratégies fongiques pour inhiber les réponses de défense de l'hôte

Les stratégies fongiques pour contourner les défenses des plantes comprennent plusieurs tactiques, telles que la production de radicaux oxygénés pour inhiber les réponses de défense de l'hôte et la manipulation du pH du tissu hôte. De plus, les champignons ciblent les protéases et perturbent les voies de signalisation hormonale des plantes. Les effecteurs fongiques, notamment les petites protéines riches en cystéine, jouent un rôle crucial dans l'établissement de la relation parasitaire en manipulant les cellules hôtes. Les champignons sécrètent également des métabolites secondaires et des toxines spécifiques à l'hôte pour favoriser la virulence. Certains pathogènes fongiques utilisent des effecteurs pour subvertir le mécanisme de résistance de l'hôte, mettant en lumière leur ingéniosité pour favoriser l'infection. En outre, les petits ARN produits par certains champignons manipulent la machinerie d'interférence ARN de l'hôte, soulignant l'importance de comprendre ces interactions pour développer des stratégies de contrôle des maladies fongiques (Rodriguez-Moreno, Ebert et al. 2018).

# **Chapitre III**

## **Les tests antifongiques**

### Introduction

Un éventail de techniques de détection en laboratoire peut être employé pour évaluer ou cibler l'activité antimicrobienne in vitro d'un extrait ou d'un composé pur. Parmi les approches les plus couramment utilisées figurent la diffusion sur disque ainsi que les méthodes de dilution en milieu liquide ou gélosé. Pour les tests antifongiques, des méthodes spécifiques telles que la méthode des aliments empoisonnés sont également utilisées. Pour une analyse approfondie de l'effet antimicrobien d'un agent, il est recommandé d'utiliser des tests de temps de mort et des méthodes de cytofluorométrie en flux. Ces méthodes fournissent des informations détaillées sur la nature de l'effet inhibiteur (bactéricide ou bactériostatique), en fonction du temps ou de la concentration, ainsi que sur les dommages cellulaires infligés au microorganisme testé. En ce qui concerne la détection des maladies fongiques chez les plantes, plusieurs approches peuvent être adoptées. Cela inclut l'utilisation de méthodes conventionnelles, l'application de techniques spectroscopiques et d'imagerie, ainsi que l'exploration des métabolites organiques volatils en tant que biomarqueurs potentiels pour la détection des maladies, chacune présentant ses propres avantages et limites.

### 3.1. Diagnostic des maladies fongiques chez les plantes

La capacité à détecter, identifier et quantifier avec précision les agents pathogènes des plantes est la pierre angulaire de la pathologie végétale. L'identification fiable des organismes responsables d'une maladie des plantes est une condition préalable essentielle à la mise en œuvre des stratégies de gestion des maladies. Par conséquent, dans le diagnostic des infections fongiques chez les plantes, il est essentiel de réaliser un processus de détection de la maladie correct. Étant donné que de nombreux agents pathogènes fongiques produisent des symptômes similaires, il est important de pouvoir distinguer entre différentes espèces.

#### 3.1.1. Méthodes conventionnelles

Les méthodes conventionnelles de détection et d'identification des agents pathogènes fongiques causant des maladies chez les plantes reposent principalement sur des identifications morphologiques, microbiologiques et biochimiques

##### 3.1.1.1. Méthode d'examen visuel

La méthode traditionnelle pour les agents pathogènes fongiques des plantes implique l'interprétation des symptômes visuels de la maladie (par exemple, taches, flétrissure, galles, tumeurs, chancre, flétrissement, pourriture ou dépérissement), suivie de l'isolement de l'agent pathogène et de techniques de microscopie. L'examen visuel est devenu plus précis et fiable et a fait l'objet de recherches intensives en raison de la disponibilité de directives détaillées et des

normes requises pour l'évaluation (Guan and Nutter Jr 2001). Néanmoins, l'examen visuel est toujours sujet à l'expérience individuelle et donc les résultats ne sont pas toujours concluants, car ils peuvent être affectés par des variations temporelles. Cette variation entraîne une variabilité significative et des changements dans la reproductibilité. De plus, la procédure d'identification visuelle nécessite un microbiologiste expert, ce qui rend cette technique impraticable pour le diagnostic sur site des agents pathogènes fongiques des plantes (Nutter Jr, Gleason et al. 1993).

### 3.1.1.2. Méthodes de culture et de placage

La méthode de culture implique l'isolement des champignons en utilisant des milieux artificiels appropriés cultivés sur divers milieux artificiels dans différentes conditions, suivie de techniques de microscopie. L'observation microscopique implique le diagnostic de l'agent pathogène sur la base de ses caractéristiques morphologiques telles que la morphologie des spores, les motifs de sporulation, la production et les caractéristiques des structures sporulantes produisant des formes de spores asexuées et sexuées, qui sont utilisées pour la classification taxonomique des champignons (Narayanasamy 2011). Les méthodes de culture ont été utilisées pour la détection d'un large éventail d'agents pathogènes fongiques. Les exemples incluent *Coniophora putana* (Olfat 2011), *Fusarium spp* (Lievens, Claes et al. 2007), *Rhizoctonia solani*, *Phytophthora capsici* (Mitchell, Larkin et al. 1995), *Phialocephala Dimorphospora* (Richard and Fortin 1973).

Bien que cette méthode soit la moins chère et la plus simple, l'exactitude et la fiabilité de la méthode dépendent de l'expérience et de l'habileté de la personne effectuant le diagnostic. De plus, cette méthode est longue car elle prend généralement quelques jours ou semaines pour la confirmation et n'est donc pas adaptée au diagnostic rapide des agents pathogènes. Malgré les inconvénients, les méthodes de culture sont toujours utilisées en combinaison avec d'autres méthodes de détection des agents pathogènes comme les méthodes basées sur les anticorps ou biochimiques pour obtenir de meilleurs résultats (McCartney, Foster et al. 2003).

### 3.1.1.3. Analyse des isoenzymes

L'analyse des isoenzymes est utilisée pour détecter, différencier et identifier des espèces morphologiquement similaires ou étroitement apparentées. De plus, l'analyse des isoenzymes fournit un outil bien établi et efficace pour révéler la variabilité génétique dans les populations fongiques (Micales, Bonde et al. 1986). Le polymorphisme des protéines reflète l'origine génétique des microorganismes (Shaw 1965). L'expression des allèles codant pour différents isoenzymes offre un moyen relativement neutre de déterminer la variation génétique. L'analyse

des isoenzymes est considérée comme une technique relativement précise, économique et rapide pour le dépistage de grandes populations et l'identification des espèces (Guarro, Gené et al. 1999).

Malgré ces avantages, l'application des techniques d'isozymes dans les études des champignons phytopathogènes a été limitée jusqu'à présent. La principale raison de l'utilisation limitée des isoenzymes pourrait être le faible niveau de polymorphisme trouvé dans divers taxons fongiques examinés (Burdon 1993). Cette approche a été appliquée avec succès dans l'identification de *Fusarium spp* (Laday and Szecsi 2002), *Pythium spp* (Takenaka, Kawasaki et al. 1994), *Phytophthora spp* (Oudemans and Coffey 1991), *Rhizoctonia solani* (Liu and Nickrent 1990), *Fusarium solani* (Skovgaard and Rosendahl 1998), *Fusarium oxysporum* (Bosland and Williams 1987), *Phytophthora infestans* (Tooley, Fry et al. 1985).

Les méthodes traditionnelles n'étaient pas assez sensibles et donc de nouvelles méthodes ont été développées au cours de la dernière décennie pour détecter et identifier les agents pathogènes des plantes. Les méthodes actuelles de détection des maladies fongiques des plantes sont largement classées en méthodes directes et indirectes.

### 3.1.2. Méthodes de détection directe

Les techniques de détection directe sont classées en deux grands sous-groupes : les méthodes immunologiques, utilisant des anticorps ou des alternatives d'anticorps, et les méthodes basées sur la PCR utilisant des sondes d'acides nucléiques. De plus, les techniques basées sur la PCR et sérologiques ont surmonté de nombreuses lacunes des tests conventionnels (Sankaran, Mishra et al. 2010). Ces méthodes permettent une caractérisation et une différenciation précises des champignons phytopathogènes et sont beaucoup plus rapides que les techniques conventionnelles. De plus, ces techniques peuvent également être appliquées sur des micro-organismes non cultivables, car l'organisme n'a pas besoin d'être isolé pour être identifié (Leisova, Minarikova et al. 2006).

#### 3.1.2.1. Méthodes basées sur l'immunologie

Les méthodes basées sur la liaison antigène-anticorps sont largement utilisées pour la détection des agents pathogènes fongiques des plantes. Le principal prérequis pour effectuer divers tests immunologiques pour l'identification des agents pathogènes fongiques des plantes est la disponibilité d'antisérums appropriés. Des antisérums comprenant des anticorps conventionnels et lourds, des anticorps polyclonaux, des anticorps monoclonaux et des anticorps recombinants affichés par phages ont été développés pour correspondre aux niveaux de sensibilité et de spécificité nécessaires des réactions immunologiques. Les méthodes de

détection basées sur l'immunologie ne sont pas aussi spécifiques et sensibles que les méthodes de détection basées sur les acides nucléiques, mais elles sont plus rapides, plus robustes, simples à réaliser et rentables (Ray, Ray et al. 2017).

Des exemples de techniques immunologiques comprennent le test d'immunodiffusion (Charudattan and DeVay 1981), l'enzyme-linked immunosorbent assay (Meyer, Spotts et al. 2000, Choi, Tapias et al.), le radio-immunosorbent assay (RISA) (Sharon, Amsellem et al. 1993), le dipstick immunoassay (Pettitt, Wakeham et al. 2002).

Les méthodes basées sur l'immunologie sont souvent associées à des méthodes basées sur la PCR comme la PCR-ELISA pour la confirmation des agents pathogènes fongiques (Cullen, Toth et al. 2005).

La réaction en chaîne par polymérase (PCR) est largement utilisée depuis longtemps dans le diagnostic des agents pathogènes fongiques des plantes en raison de sa haute précision et de sa sensibilité élevée, plusieurs variantes de PCR ont été développées pour améliorer la spécificité et la sensibilité de la détection ainsi que pour quantifier la population d'agents pathogènes dans les plantes. Parmi celles-ci, on trouve :

- La PCR en transcription inverse (RT-PCR) (Kozlakidis, Citir et al. 2007),
- La PCR imbriquée (Qi, Zhang et al. 2009),
- La PCR en temps réel multiplexe (Atallah, Bae et al. 2007),
- La PCR en temps réel quantitative (Justesen, Hansen et al. 2008),
- la bio-PCR (Mbofung and Pryor 2010),
- La PCR par hybridation de capture magnétique (Langrell and Barbara 2001),

### 3.1.3. Les méthodes indirectes

Des méthodes indirectes basées sur le profilage du stress végétal, le profilage des métabolites gazeux et le profilage des métabolites végétaux ont été utilisées pour l'identification des maladies fongiques chez les plantes. Dans ces approches, les maladies des plantes ne sont pas identifiées par une identification directe de l'agent pathogène, mais en détectant l'impact de l'agent pathogène sur la réponse physiologique de la plante. Les techniques de détection indirecte sont catégorisées en techniques spectroscopiques et d'imagerie (techniques de détection des maladies basées sur le stress) et en techniques de détection de composés organiques volatils (COV) (techniques de détection basées sur les biomarqueurs) (Ray, Ray et al. 2017).

### a. Les techniques spectroscopiques et d'imagerie

Les techniques spectroscopiques et d'imagerie évaluent la santé des plantes en faisant passer de la lumière de longueurs d'onde spécifiques sur les tissus de la plante, puis en mesurant l'intensité des longueurs d'onde de la lumière réfléchi. Ces longueurs d'onde de lumière peuvent être utilisées pour étudier différentes maladies fongiques chez les plantes. Les étapes de base utilisées pour la détection des maladies des plantes à l'aide de la technique d'imagerie. Diverses techniques spectroscopiques et d'imagerie ont été étudiées pour la détection des maladies chez les plantes. Certaines méthodes sont la spectroscopie de fluorescence (Lins, Belasque et al. 2009), la spectroscopie visible (CHEN, LI et al. 2008), la spectroscopie infrarouge (Purcell, O'Shea et al. 2009), la spectroscopie par résonance magnétique nucléaire (RMN) (Choi, Tapias et al. 2004), l'imagerie par fluorescence (Chaerle, Hagenbeek et al. 2004), l'imagerie multispectrale ou hyperspectrale (Qin, Burks et al. 2009), l'imagerie par rayons X (Narvankar, Singh et al. 2009), l'imagerie par résonance magnétique nucléaire (RMN) (Goodman, Williamson et al. 1992), l'imagerie thermique ou thermographie (Oerke, Lindenthal et al. 2005).

### b. La détection des composés organiques volatils (COV)

Cette technique utilise la GC-MS est une autre méthode indirecte. Les plantes émettent de nombreux composés organiques volatils (COV) dans leur environnement et ces volatils végétaux influents à leur tour sur leur relation avec les plantes et les agents pathogènes (Vuorinen, Nerg et al. 2007). Les COV émis par les plantes malades varient par rapport aux COV émis dans des conditions de santé normale des plantes. De telles techniques fourniront des informations diagnostiques sur l'état de santé physiologique de l'hôte en réponse à l'infection et permettront le dépistage à haut débit et la détection subséquente de l'infection pathogène chez les plantes économiquement importantes (Goff and Klee 2006). La méthode courante utilisée pour évaluer le profil des métabolites volatils émis par les plantes est la technique basée sur la chromatographie en phase gazeuse (GC). La GC combinée à la spectrométrie de masse (GC-MS) est une technique couramment utilisée pour une analyse qualitative et quantitative des métabolites volatils émis par les plantes dans différentes conditions environnementales et physiologiques. Les études de GC-MS ont été réalisées par quelques chercheurs pour évaluer les changements dans les volatils causés par les infections fongiques dans diverses plantes (Vikram, Lui et al. 2006) (Prithviraj, Vikram et al. 2004).

### 3.2. Méthodes de diffusion

#### 3.2.1. Méthode de diffusion sur disque d'agar

Test de diffusion sur disque Le test de diffusion sur disque est une méthode semi-quantitative de diffusion sur gélose utilisant des disques antifongiques. Il s'agit d'une autre alternative aux méthodes de référence pour la pratique clinique, bien que pour l'instant uniquement pour le luconazole et le voriconazole, et il a été démontré qu'il se compare positivement au protocole à Etest. Le CLSI a également publié récemment une méthode approuvée pour l'antibiogramme antifongique par diffusion sur disque du fluconazole contre les espèces de *Candida*. Aujourd'hui, de nombreuses normes acceptées et approuvées sont publiées par le Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) pour les tests sur les bactéries et les levures. Bien que toutes les bactéries fastidieuses ne puissent pas être testées avec précision par cette méthode, la normalisation a été effectuée pour tester certains pathogènes bactériens fastidieux comme les streptocoques, *Haemophilus influenzae*, *Haemophilus parainfluenzae*, *Neisseria gonorrhoeae* et *Neisseria meningitidis*, en utilisant des milieux de culture spécifiques, diverses conditions d'incubation et des critères d'interprétation pour les zones d'inhibition ([Balouiri, Sadiki et al. 2016](#)).

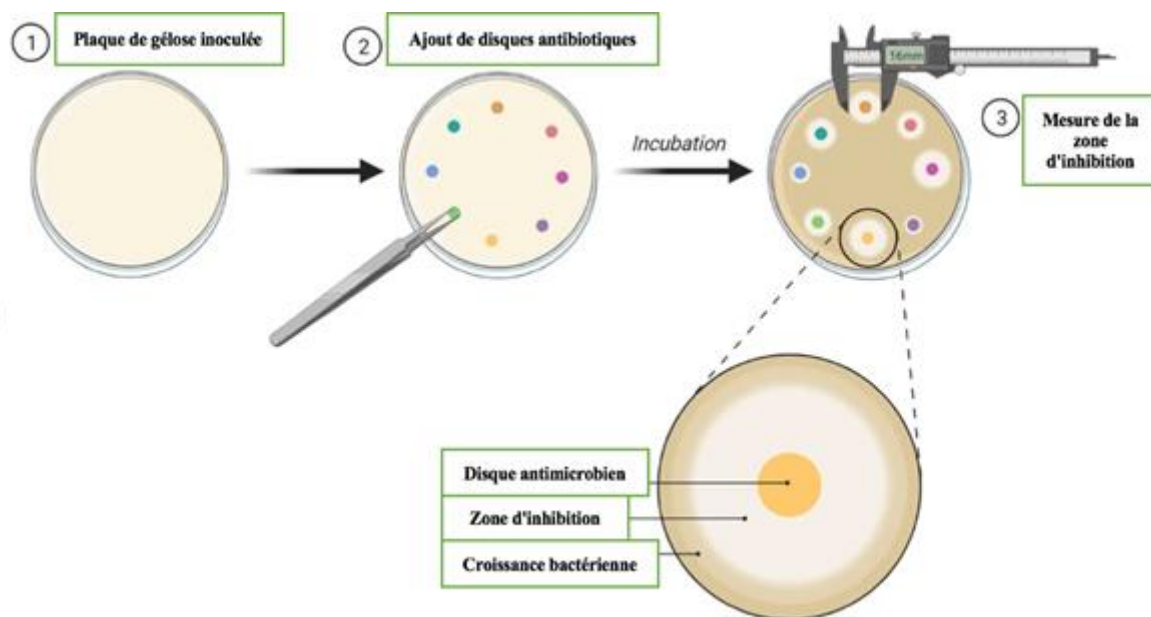
- **Le protocole de méthode de diffusion sur disque d'agar :**

Voici les étapes concernant la méthode de diffusion sur disque d'agar ([James and Mary Jane 1998](#)) : (figure 8 )

- a. Inoculation des plaques d'agar :** Les plaques d'agar sont inoculées avec un inoculum standardisé du microorganisme à tester.
- b. Placement des disques de papier filtre :** Des disques de papier filtre, d'environ 6 mm de diamètre, contenant le composé à tester à une concentration désirée, sont placés à la surface de l'agar.
- c. Incubation :** Les boîtes de Pétri sont incubées dans des conditions appropriées. Généralement, l'agent antimicrobien se diffuse dans l'agar et inhibe la germination et la croissance du microorganisme testé.
- d. Mesure des zones d'inhibition :** Les diamètres des zones d'inhibition de la croissance sont mesurés.

Le test de diffusion sur disque offre de nombreux avantages par rapport à d'autres méthodes : sa simplicité, son faible coût, sa capacité à tester un grand nombre de micro-organismes et

d'agents antimicrobiens, ainsi que la facilité d'interprétation des résultats fournis (Kreger, Craven et al. 1980).



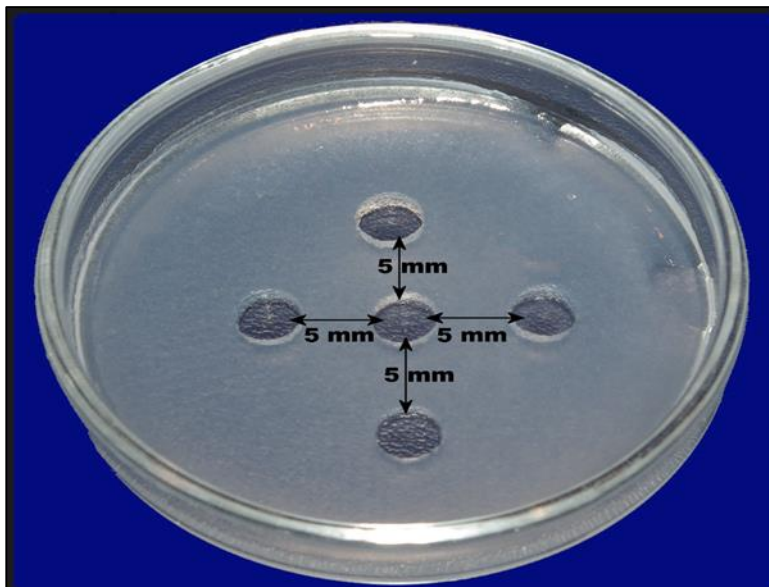
**Figure 8:** méthode de diffusion sur disque d'agar (Espitia and Batista 2024).

### 3.2.2. Méthode de diffusion en puits sur gélose

la méthode de diffusion en puits sur gélose est une technique largement utilisée pour évaluer l'activité antimicrobienne des extraits de plantes ou de microorganismes. D'après Valgas, Souza et al. (2007), le protocole de méthode de diffusion en puits sur gélose comprend les étapes suivantes (figure 9) :

- a. Inoculation de la surface de la gélose :** Un volume d'inoculum microbien est étalé sur toute la surface de la gélose de manière à la recouvrir uniformément.
- b. Préparation du puits :** Un trou d'un diamètre de 6 à 8 mm est percé de manière aseptique dans la gélose. Cela peut être effectué à l'aide d'un foret en liège stérile ou d'une pointe stérile.
- c. Introduction de l'extrait :** Un volume précis (20 à 100  $\mu$ L) de l'agent antimicrobien ou de l'extrait à la concentration désirée est introduit dans le puits préalablement préparé.
- d. Incubation :** Les plaques de gélose sont placées dans des conditions d'incubation appropriées en fonction du microorganisme testé. Cette étape permet à l'agent antimicrobien de se diffuser dans le milieu de gélose.

- e. **Déffusion de de l'agent antimicrobien** : L'agent antimicrobien se diffuse dans le milieu de gélose et inhibe la croissance de la souche microbienne testée. Les zones d'inhibition de la croissance microbienne autour du puits sont ensuite mesurées pour évaluer l'activité antimicrobienne de l'agent testé.



**Figure 9:** La méthode de diffusion en puits sur gélose

### 3.3. La méthode de dilution

Les méthodes de dilution sont les plus appropriées pour la détermination des valeurs de CMI, car elles permettent d'estimer la concentration de l'agent antimicrobien testé dans la gélose (dilution en gélose) ou dans le bouillon (macrodilution ou microdilution). La méthode de dilution en bouillon ou en gélose peut être utilisée pour mesurer quantitativement l'activité antimicrobienne in vitro contre les bactéries et les champignons. La valeur CMI enregistrée est définie comme la concentration la plus faible de l'agent antimicrobien testé qui inhibe la croissance visible du micro-organisme testé, et elle est généralement exprimée en  $\mu\text{g/mL}$  ou  $\text{mg/L}$ . Il existe de nombreuses lignes directrices approuvées pour les tests de sensibilité antimicrobienne par dilution des bactéries fastidieuses ou non fastidieuses, des levures et des champignons filamenteux. Les normes les plus reconnues sont celles du CLSI et du Comité européen pour les tests de sensibilité aux antimicrobiens (EUCAST). Comme indiqué, ces lignes directrices fournissent une procédure uniforme pour les tests qui sont pratiques à réaliser dans la plupart des laboratoires de microbiologie clinique (Pfaller, Sheehan et al. 2004).

### 3.3.1. Le protocole de méthode par dilution

Les étapes de la méthode de dilution en bouillon, qui peut être soit une micro-dilution, soit une macro-dilution (Balouiri, Sadiki et al. 2016) :

**a. Préparation des dilutions d'agent antimicrobien :**

- Les dilutions en deux fois de l'agent antimicrobien sont préparées (par exemple 1, 2, 4, 8, 16 et 32 µg/ml.
- Les dilutions sont préparées dans un milieu de croissance liquide.

**b. Distribution dans des tubes ou une plaque de microtitrage :**

- Les dilutions sont réparties dans des tubes contenant un volume minimum de 2 ml pour la macro-dilution.
- Pour la micro-dilution, des volumes plus petits sont utilisés dans une plaque de microtitrage à 96 puits.

**c. Inoculation avec un inoculum microbien :**

- Chaque tube ou puits est inoculé avec un inoculum microbien.
- L'inoculum est préparé dans le même milieu après dilution d'une suspension microbienne standardisée ajustée à l'échelle de 0,5 de McFarland.

**d. Incubation :**

- Les tubes inoculés ou la plaque de microtitrage à 96 puits sont incubés dans des conditions appropriées selon le micro-organisme testé.
- L'incubation se fait généralement sans agitation ( figure 10 ).

**e. Analyse :**

- Après incubation, les résultats sont analysés pour déterminer la sensibilité ou la résistance des micro-organismes aux agents antimicrobiens.



**Figure 10** : Méthode de microdilution en bouillon d'extraits de plantes contre *B. subtilis* en utilisant la résazurine comme indicateur de croissance (Balouiri, Sadiki et al. 2016).

# **Chapitre IV**

## **Matériels et méthodes**

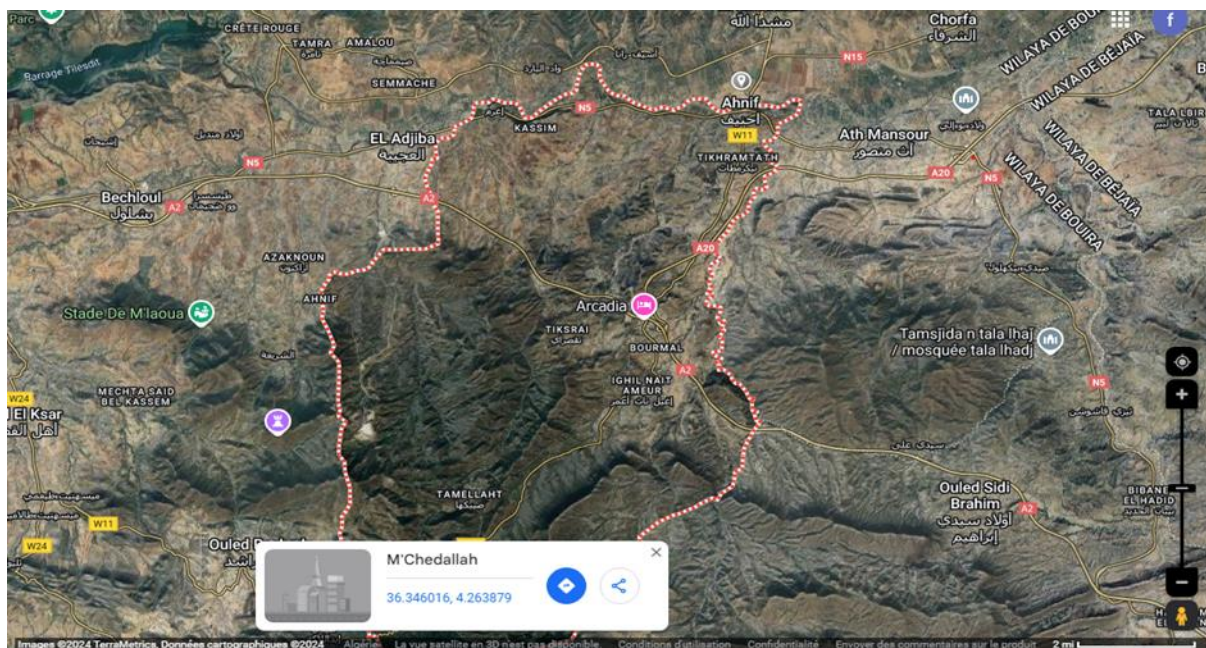
### 4.1. Objectif du travail

Notre travail a pour objectif :

- ✓ D'effectuer l'isolement et l'identification du champignon *Verticillium* qui cause la verticilliose à partir d'un spécimen d'olivier Chamlal.
- ✓ D'analyser l'efficacité antifongique d'un fongicide ainsi que de l'huile essentielle de thym sur le champignon *Verticillium*, et d'estimer la synergie entre les deux.

### 4.2. Localisation géographique

Le lieu-dit Chikh Left est situé dans la commune d'Ahnif, relevant de la daïra de M'Chedallah, dans la wilaya de Bouira, en Algérie (Figure 11). Géographiquement, il est positionné dans la région montagneuse de la Kabylie, caractérisée par un relief accidenté et des altitudes variées. Les coordonnées GPS approximatives de Chikh Left sont 36°19' de latitude nord et 4°22' de longitude est. Cette localité bénéficie d'un climat méditerranéen, avec des étés chauds et secs et des hivers modérément humides. Le paysage environnant est dominé par des formations naturelles typiques de la région, incluant des forêts de chênes et d'oliviers, ainsi que des terres agricoles en terrasses, témoignant de pratiques agricoles traditionnelles.



**Figure 11** : Carte satellitaire de la région d'Ahnif, Wilaya de Bouira, illustrant ses frontières administratives (Google Earth Pro, 2024).

### 4.3. Matériels

- ❖ **Sur le terrain** : Sur le terrain, des sacs en plastique ont été employés pour la collecte des échantillons avec un sécateur.
- ❖ **En laboratoire** : Toutes les manip ont été effectuées au laboratoire de la SRPV-DBK. Plusieurs outils sont mis à notre disposition pour mener à bien l'expérimentation (Figure 12) :
  - Un microscope optique, des lames et lamelles ainsi qu'un ruban adhésif transparent pour les observations microscopiques.
  - Un autoclave pour stériliser les milieux de culture, en plus des boîtes de Pétri destinées à les contenir. Ces milieux sont versés de manière stérile près d'une flamme provenant d'un bec Bunsen, sous une hotte.
  - Enfin, des pipettes Pasteur ont été utilisées pour l'ensemencement, ainsi qu'une étuve réglée à 25°C pour l'incubation.



**Figure 12** : Photos du matériel de laboratoire : (01) Autoclave, (02) La Hotte, (03) Agitateur, (04) Les Boites de Petrie, (05) Étuve, (06) Microscope Optique (Originales 2024).

### 4.3.1. Matériel végétal

La recherche est réalisée en se focalisant exclusivement sur une unique variété autochtone, *Olea europaea*, plus connue sous l'appellation variété Chamlal.

La variété d'olivier Chamlal est l'une des plus développées dans la région d'Ahnif, située dans la commune de Mechdalah. Cette variété est particulièrement prisée pour sa production d'huile d'olive de qualité. Cependant, l'olivier Chamlal est également connu pour sa sensibilité accrue au *Verticillium Dahliae*, qui cause une maladie fongique qui peut gravement affecter la santé des arbres et compromettre la récolte. Cette vulnérabilité nécessite des mesures de gestion phytosanitaire rigoureuses pour préserver les plantations et assurer une production durable.

### 4.3.2. Matériel fongique

Les rameaux de chaque échantillon ont été inspectés à l'œil nu pour détecter les symptômes caractéristiques de la verticilliose. Parmi les symptômes observés figuraient le flétrissement des feuilles, le jaunissement ou le brunissement des tissus foliaires, ainsi que la nécrose des vaisseaux conducteurs. La portion des rameaux touchée et l'étendue de l'épidémie ont été méticuleusement enregistrées.

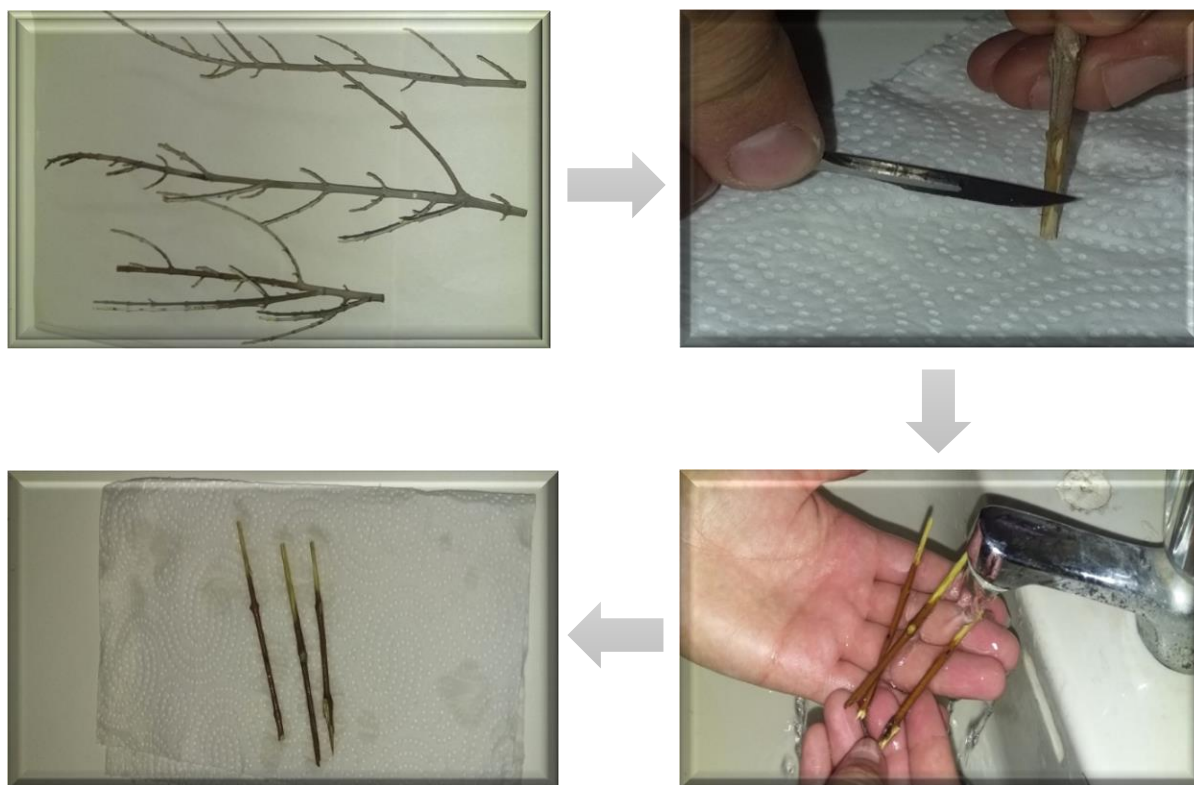
En plus des signes de verticilliose, des symptômes de ravageurs et de certains facteurs abiotiques ont également été relevés. Les symptômes spécifiques de la verticilliose comprennent l'apparition de stries brunes longitudinales sur les rameaux et la nécrose vasculaire visible en coupe transversale.

Tous les rameaux affectés ont été conservés dans des conditions appropriées pour constituer une collection et une banque d'échantillons. Ces échantillons seront utilisés pour des analyses et tests futurs, notamment pour confirmer la présence du champignon *Verticillium Dahliae* à l'aide de techniques de culture sur milieu sélectif.

## 4.4. Méthodologie

### 4.4.1. Isolement de l'agent pathogène *Verticillium Dahliae*

Après avoir récolté les branches, on les place dans des sacs en plastique hermétiquement fermés. Une fois arrivées au laboratoire, les branches sont coupées en petits morceaux, et la couche supérieure est retirée à l'aide d'un bistouri avant de passer à l'étape de rinçage avec de l'eau ensuite on les laisse sécher sur un papier absorbant (figure 13).

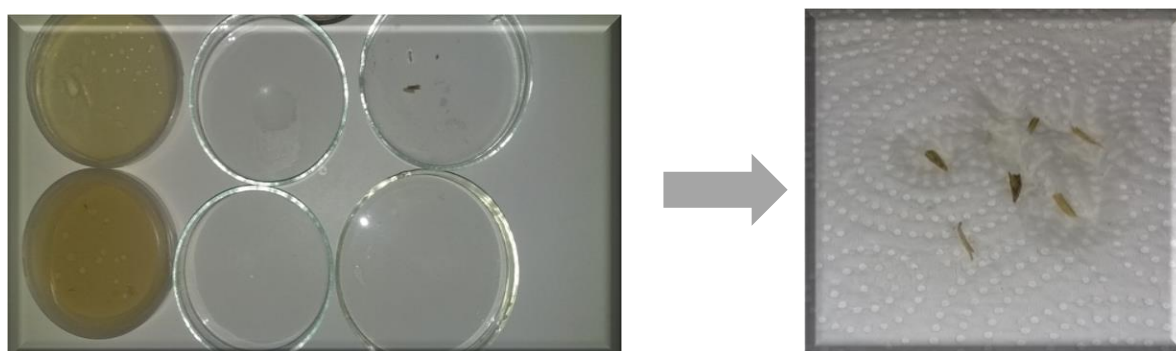


**Figure 13** : Technique d'isolement de l'agent pathogène (Originales 2024).

### 4.4.1.1. Désinfection des échantillons

Après avoir séché les rameaux, nous procéderons à l'extraction de petits fragments à partir de ces derniers, il est nécessaire de procéder à une désinfection pour éliminer la microflore présente à la surface des fragments.

Des petits fragments présentant les symptômes caractéristiques de la verticilliose ont été immergées dans une solution d'eau de Javel à 2 % pendant 5 minutes, suivies de 3 rinçages à l'eau distillée stérile sous la hotte (chaque rinçage durant 5 minutes), puis séchées à l'air libre avec du papier absorbant (Figure 14).



**Figure 14** : Technique de la désinfection de l'échantillon isolé. (Originale 2024).

### 4.4.1.2. Isolement de l'agent pathogène à partir de fragments de rameaux

Après le séchage des échantillons sur du papier filtre stérile, les fragments sont déposés dans des boîtes de pétri sur le milieu. La face interne contre ce dernier. Ce milieu est communément utilisé pour isoler des champignons filamenteux. Les boîtes sont ensuite incubées entre 25 et 28° C à l'obscurité, pendant 4 à 7 jours (figure 15).



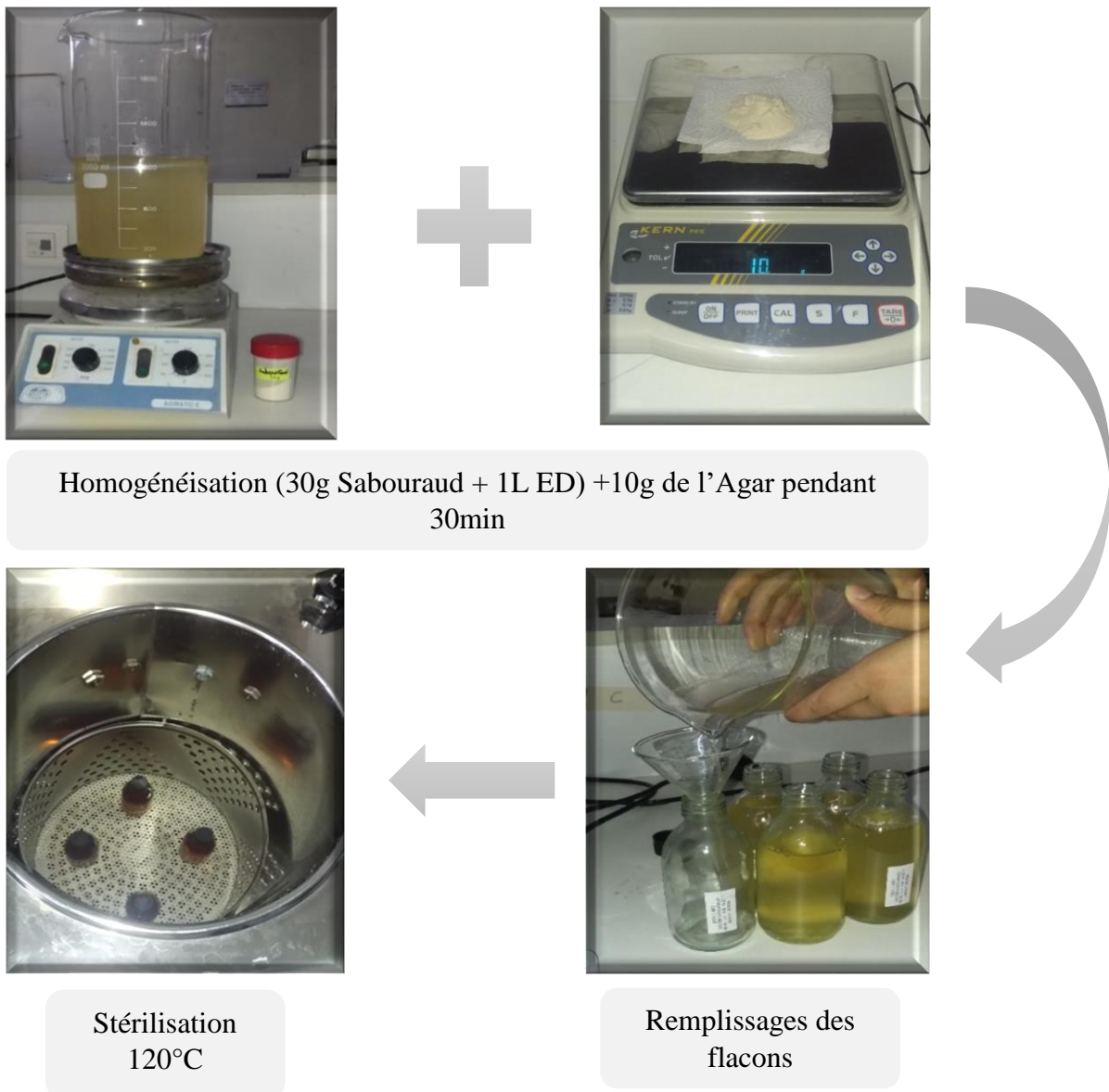
**Figure 15** : L'ensemencement et l'incubation (Originale 2024).

### 4.4.1.3. Préparation du milieu de culture

- **Peptone** : Source d'azote et de nutriments pour la croissance microbienne. 10 g/litre
- **Dextrose (ou glucose)** : Source de carbone pour les champignons et les levures. Il fournit de l'énergie pour la croissance. 40 g/litre
- **Agar** : Un polymère extrait d'algues marines, utilisé comme agent gélifiant pour solidifier le milieu de culture. 15-20 g/litre (pour la version solide)
- **Eau distillée** : Utilisée comme solvant pour dissoudre les composants et constituer le milieu de culture.

Le pH du milieu de Sabouraud est généralement ajusté à environ 5.6 pour favoriser la croissance des champignons et des levures tout en inhibant la croissance des bactéries.

Les étapes de la préparation de milieu de culture Sabouraud sont résumées dans la Figure 16.



**Figure 16** : Préparation de milieu de la culture de Sabouraud (Originales 2024).

#### 4.4.1.4. Identification microscopique

Le prélèvement d'une souche de champignon pathogène *Verticillium Dahliae* est réalisé en utilisant une lame et une lamelle sous un microscope optique. On prélève délicatement un échantillon de tissu infecté à l'aide d'un scalpel stérile, puis on le place sur une lame de microscope. Une goutte d'eau distillée est ajoutée pour faciliter l'observation. La lamelle est ensuite posée délicatement sur l'échantillon pour éviter les bulles d'air. L'ensemble est observé sous le microscope, permettant de visualiser les structures caractéristiques du champignon et de confirmer son identification (Figure 17).



**Figure 17 :** Identification de *Verticillium Dahliae* sous un microscope optique avec le grossissement  $\times 40$  (Originale 2024).

### 4.5. Les tests Antifongiques

#### 4.5.1. L'objectif

L'objectif de cette étude est d'évaluer l'efficacité de l'huile essentielle de thym (*Thymus Vulgaris*), celle d'un fongicide ECONAZYL (Nitrate d'Econazole 1%), ainsi que leur combinaison dans le traitement de la verticilliose chez l'olivier, causée par le pathogène *Verticillium Dahliae*. Cette recherche comprendra des expériences en laboratoire pour évaluer les effets de l'huile essentielle de thym et du fongicide individuellement sur le pathogène, ainsi que des essais sur des plants d'olivier infectés pour observer les effets de leur combinaison.

#### 4.5.2. Protocol

Les champignons examinés ont été prélevés à partir de rameaux et de feuilles d'oliviers, puis isolés. Ils ont été cultivés dans un milieu standard Sabouraud. Deux expériences sont programmées, utilisant chacune de milieu de culture Sabouraud. Dans la première expérience, 2ml de fongicide (le fongicide utilisé c'est ECONAZYL (Nitrate d'Econazole 1%)) sont ajoutés au 38ml de milieu de culture pour préparer la solution mère (figure 19), tandis que dans la seconde, 0.4 ml d'huile essentielle (*Thymus vulgaris*) sont incorporés à 39,6ml de milieu de culture pour préparer la solution mère (Figure 18). Ces solutions mères seront ensuite diluées selon des ratios spécifiques pour réaliser différentes dilutions, permettant d'évaluer les effets respectifs du fongicide et de l'huile essentielle sur la croissance de champignon sur le milieu de culture solide.

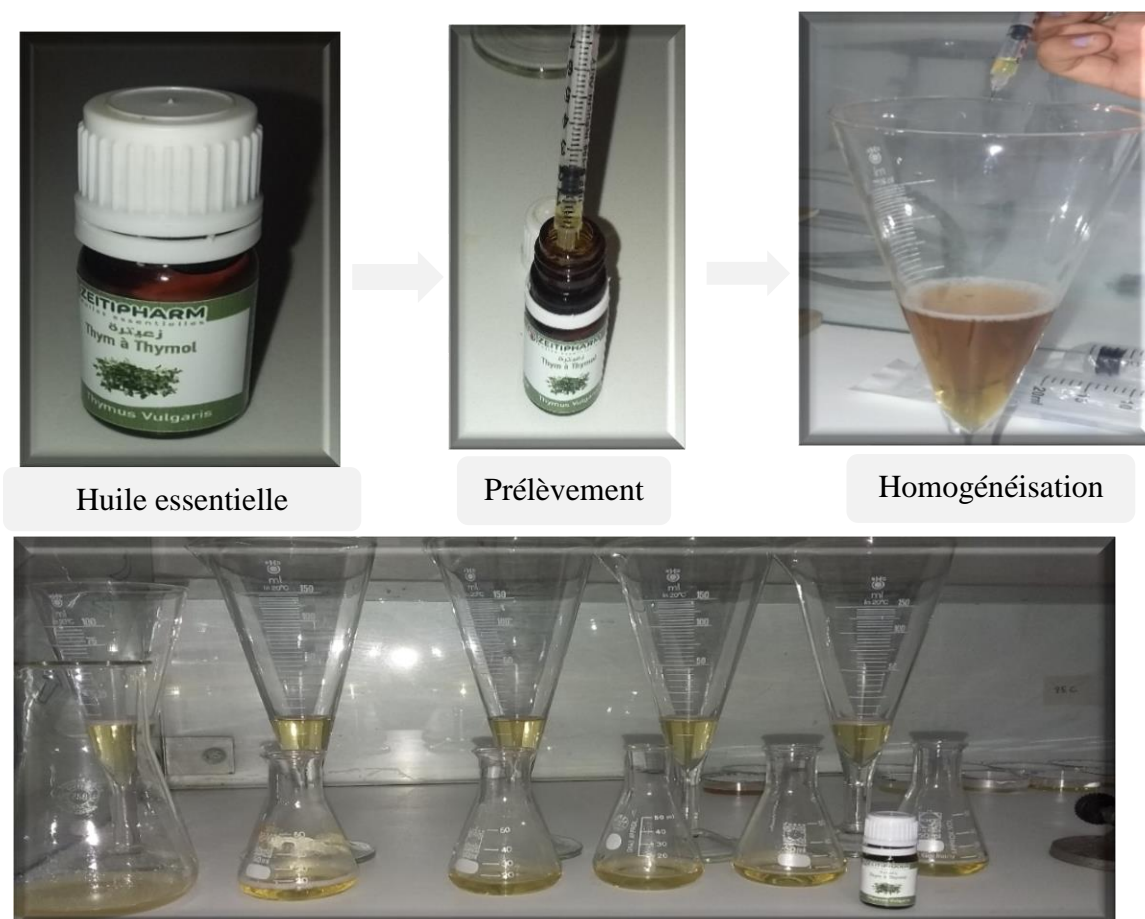
Après chaque dilution par un facteur de  $1/2$ , la concentration de fongicide et d'huile essentielle dans la solution est réduite de moitié (Figure 18). Donc, après chaque dilution, les nouvelles concentrations sont :

### a. Les concentrations de Fongicide

- La Solution mère : 0.05%
- La 1ère dilution : 0.025%
- La 2ème dilution : 0.0125%
- La 3ème dilution : 0,00625%
- La 4ème dilution :0.003125%
- La 5ème dilution :0.015625%
- La 6ème dilution :0.00078125%
- La 7ème dilution :0.000390625%
- La 8ème dilution :0.0001953125%
- La 9ème dilution :0.00009765625%

### b. Les concentrations d'huile essentielle

- La Solution mère : 0.5%
- La 1ère dilution : 0.25%
- La 2ème dilution : 0.125%
- La 3ème dilution : 0,0625%
- La 4ème dilution :0.03125%
- La 5ème dilution :0.015625%
- La 6ème dilution :0.0078125%
- La 7ème dilution :0.00390625%
- La 8ème dilution :0.001953125%
- La 9ème dilution : 0.0009765625%



**Figure 18** : La figure présente les étapes de préparation des milieux de culture contenant différentes concentrations de l'huile essentielle de *Thymus Vulgaris*. (Originale 2024).



**Figure 19** : La figure présente les étapes de préparation des milieux de culture contenant différentes concentrations de fongicide ECONAZYL (Nitrate d'Econazole 1%). (Originale 2024).

### 4.5.3. Ensemencement

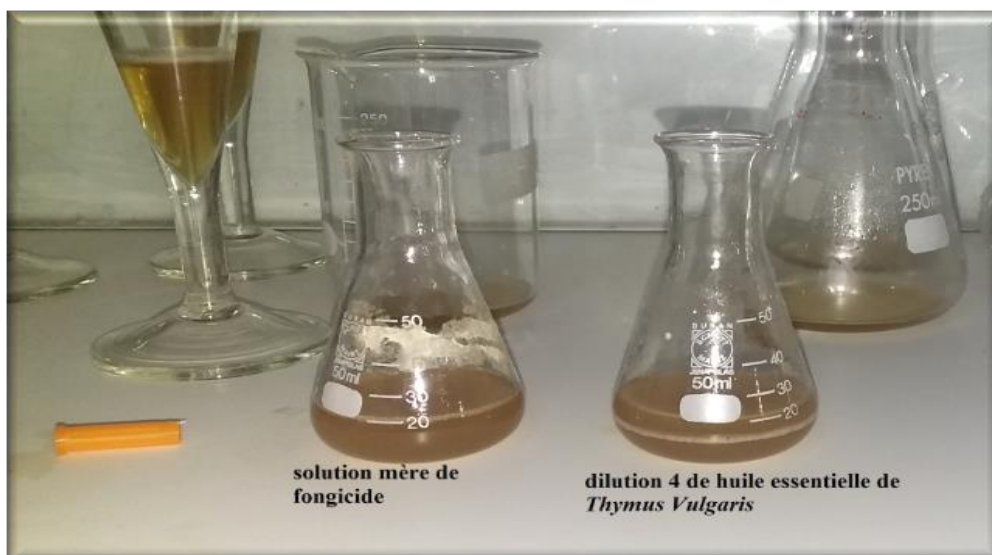
Après refroidissement du milieu, dans la boîte de Pétri contenant une souche de champignon déjà développée un prélèvement de *Verticillium* a été effectué et placé au centre de la boîte de Pétri, avec la surface mycélienne orientée vers le bas, avec trois répétitions pour chaque dose (voir Figure 20). Le même procédé est suivi pour chaque concentration d'huile essentielle et de fongicide. Les boîtes de Pétri sont ensuite hermétiquement fermées avec du parafilm et incubées à 25°C. L'observation est réalisée au bout de 7 jours.



**Figure 20** : Technique d'ensemencement et l'incubation des Boites de Pétri (Originale 2024).

### 4.5.4. La combinaison de la CMI d'huile essentielle et le fongicide

Suite aux résultats obtenus lors des deux dernières expériences concernant les effets du fongicide et de l'huile essentielle, nous allons entreprendre une nouvelle phase d'expérimentation. Cette phase consistera à combiner la concentration minimale efficace de l'huile essentielle (dilution D4 de 0.03125%) avec la solution mère du fongicide (figure 21). Par ailleurs, le milieu de culture sera préparé avec une concentration de fongicide de 1ml. Cette approche vise à évaluer les interactions potentielles entre ces deux agents et leur efficacité combinée contre les agents pathogènes. L'objectif est de déterminer si cette combinaison peut offrir une meilleure protection ou un effet synergique par rapport à l'utilisation de chaque composant séparément.

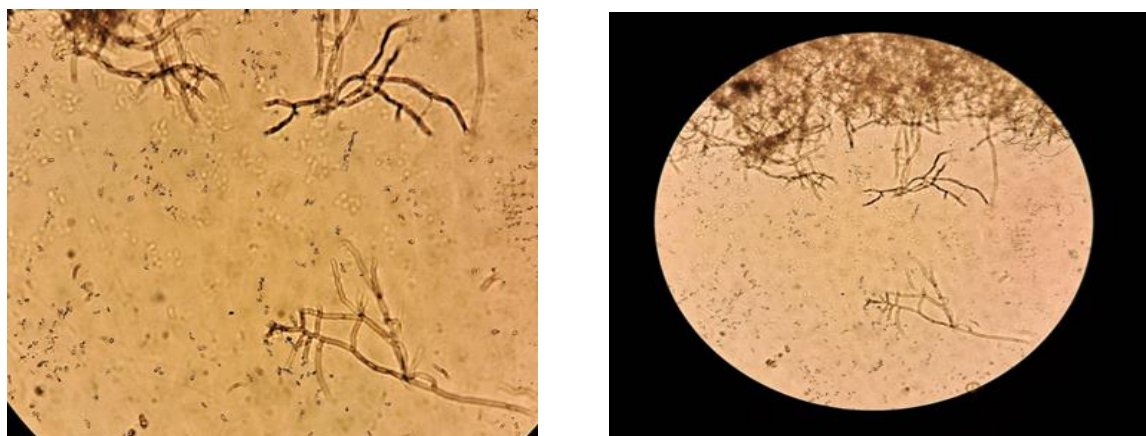


**Figure 21** : La combinaison entre la CMI d'huile essentielle et la solution mère de fongicide (Originales 2024)

# **Chapitre V**

## **Résultats et discussions**

### 5.1. Résultats de l'identification microscopique de *Verticillium dahliae*

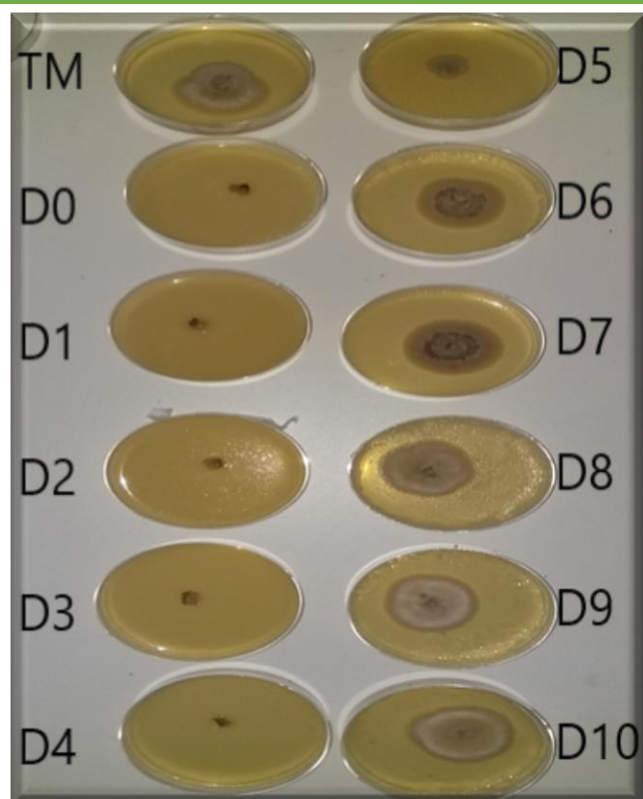


**Figure 22 :** Observation microscopique de *Verticillium dahliae* avec le grossissement  $\times 40$  (Originale 2024).

### 5.2. Activité antifongique : Tests de sensibilité.

#### 5.2.1. Test de sensibilité sur gélose avec l'huile essentielle du thym (*Thymus vulgaris*)

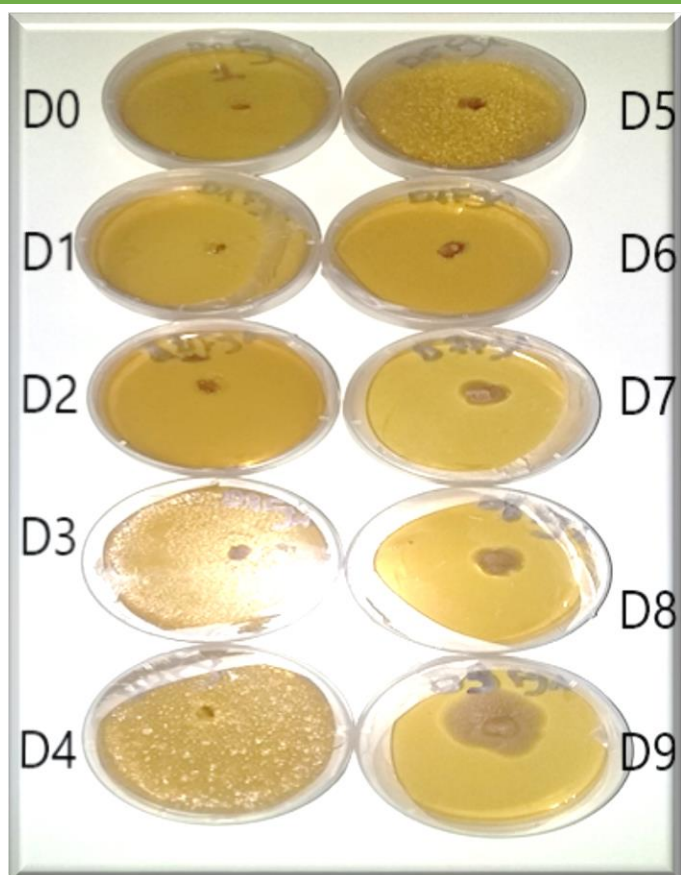
Dans le cadre de notre étude sur l'utilisation de l'huile essentielle de thym (*Thymus vulgaris*) contre le champignon *Verticillium Dahliae*, nous avons observé les effets de différentes dilutions de l'huile essentielle sur le développement fongique. Nos résultats montrent que pour les dilutions D0, D1, D2, D3 et D4, le champignon est complètement inhibé, sans aucun signe de développement. Cependant, à partir de la dilution D5, nous avons constaté une reprise de la croissance du champignon. Ces observations nous permettent de conclure que la concentration minimale inhibitrice (CMI) de l'huile essentielle de thym vis-à-vis de *Verticillium Dahliae* correspond à la dilution D4 (0.03125%). Cela indique que des concentrations plus élevées que D5 sont nécessaires pour empêcher efficacement le développement du champignon (Figure 22).



**Figure 23** : Résultats du test de sensibilité sur gélose contenant des concentrations décroissantes d'huile essentielle du thym (*Thymus Vulgaris*)

### 5.2.2. Test de sensibilité sur gélose avec le fongicide ECONAZYL (Nitrate d'Econazole 1%)

L'objectif de cette étude était de déterminer l'efficacité de différents niveaux de dilution d'un fongicide contre le champignon pathogène *Verticillium Dahliae*. Les observations ont révélé que jusqu'à la dilution D6, le développement du champignon était complètement inhibé. Ce n'est qu'à partir de la dilution D7 que le développement du champignon a commencé à être visible. Par conséquent, on peut conclure que la concentration minimale inhibitrice (CMI) du fongicide est atteinte à la dilution D6 d'une concentration de 0.00078125%. Cela signifie que les concentrations de fongicide supérieures ou égales à D6 sont nécessaires pour empêcher efficacement la croissance de *Verticillium Dahliae*. Ces résultats indiquent que l'utilisation du fongicide à une dilution correspondant à D6 est suffisante pour maîtriser l'infection par ce pathogène (Figure 23).

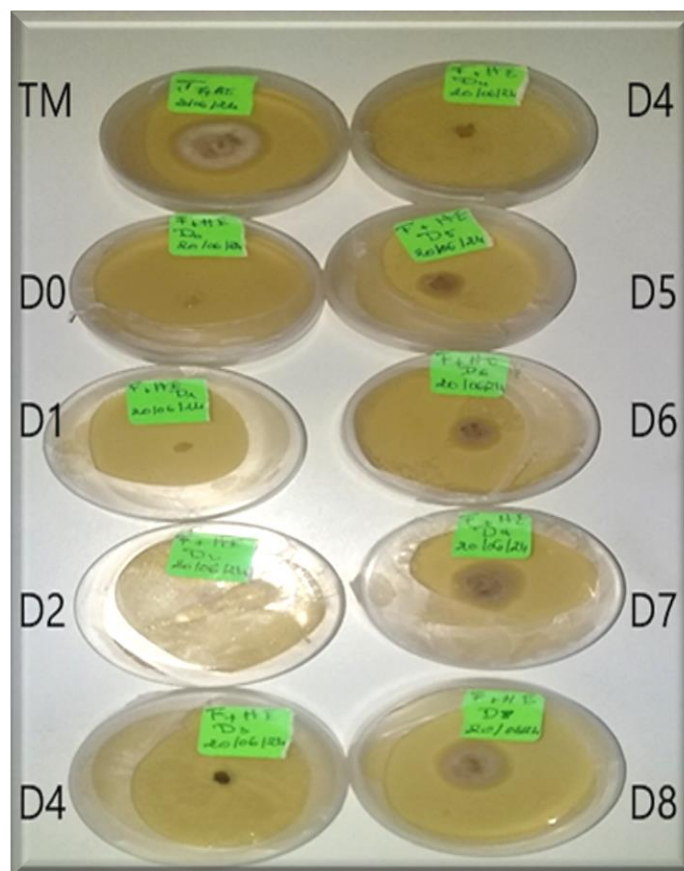


**Figure 24** : Résultats du test de sensibilité sur gélose contenant des concentrations décroissantes du fongicide ECONAZYL (Nitrate d'Econazole 1%)

### 5.3. Tests de synergie entre l'huile essentielle et le fongicide

L'objectif de l'étude de la synergie entre l'huile essentielle et le fongicide est de réduire la concentration d'utilisation du fongicide chimique afin de réduire leur impact sur la santé publique d'un côté et de réduire aussi la facture économique déboursée chaque année par les agriculteurs.

Dans la troisième expérience, nous avons combiné la D4 de l'huile essentielle de thym (CMI) avec la solution mère de fongicide et observé les effets sur le champignon *Verticillium Dahliae*. Les résultats ont montré que les dilutions D0, D1, D2, D3 et D4, de la combinaison, ont inhibé la croissance du champignon. Cependant, à partir de la dilution D5, le champignon a commencé à se développer. Ainsi, nous constatons que la CMI de cette combinaison, pour cette expérience, est la dilution D5 (Figure 24).



**Figure 25** : Résultats de l'activité synergique sur gélose contenant des concentrations décroissantes du fongicide plus la CMI d'huile essentielle.

### 6.1. Discussion des résultats sur l'huile essentielle

Les résultats obtenus sur la bioactivité de l'huile essentielle de thym contre *Verticillium Dahliae* révèlent des données intéressantes en les comparant avec les travaux d'autres chercheurs. Lors de notre étude, nous avons examiné l'effet de différentes dilutions de l'huile essentielle sur le développement fongique. Les observations ont montré que pour les dilutions D0, D1, D2, D3 et D4, le champignon était totalement inhibé, sans aucun signe de développement fongique, ce qui indique une efficacité remarquable de l'huile essentielle à ces concentrations. En revanche, à partir de la dilution D5, nous avons constaté une reprise notable de la croissance du champignon, suggérant que cette dilution est insuffisante pour maintenir l'inhibition. Ainsi, ces résultats nous permettent de conclure que la concentration minimale inhibitrice (CMI) de l'huile essentielle de thym vis-à-vis de *Verticillium dahliae* est équivalente à la dilution D4.

En comparant ces résultats avec ceux d'autres études, nous constatons une certaine cohérence avec les recherches antérieures qui ont montré une activité antifongique significative de l'huile essentielle de thym contre divers pathogènes fongiques. Par exemple, des études antérieures rapportées par (Rahimifard, Sabzevari et al. 2008) ont identifié que l'huile essentielle de thym présente une activité inhibitrice contre des espèces telles que *Aspergillus niger* et *Candida albicans*, avec une CMI généralement observée dans des plages de concentration similaires. Une autre étude menée par (Soković, Glamočlija et al. 2013) a également confirmé l'efficacité de l'huile essentielle de thym contre *Botrytis cinerea*, démontrant que l'huile essentielle de thym à une concentration de 0,1% pouvait inhiber complètement la croissance du champignon.

Cependant, d'autres recherches ont noté que l'efficacité peut varier en fonction des souches de champignons et des conditions expérimentales (Pinto, Bonifacio et al. 2020). En ce sens, notre étude contribue à la compréhension de l'activité antifongique de l'huile essentielle de thym, en confirmant son potentiel contre *Verticillium Dahliae* tout en soulignant la nécessité d'ajuster les concentrations selon les spécificités des pathogènes ciblés.

La composition chimique de l'huile essentielle de thym (*Thymus vulgaris*) joue un rôle crucial dans son activité antifongique. Les principaux composés actifs incluent le thymol, le carvacrol et le p-cymène, reconnus pour leurs propriétés antifongiques. Des études comme celles de (Soković, Vukojević et al. 2009) ont démontré que le thymol et le carvacrol, en particulier, possèdent des effets inhibiteurs puissants contre divers champignons pathogènes en perturbant leurs membranes cellulaires et en inhibant la synthèse des ergostérols, composants essentiels des membranes fongiques. Ainsi, l'efficacité de l'huile essentielle de thym contre *Verticillium dahliae* peut être attribuée à la présence de ces molécules bioactives.

Ces observations corroborent les données existantes tout en fournissant des informations précieuses pour le développement de stratégies de gestion des maladies fongiques dans les cultures agricoles, alternatives aux méthodes chimiques de plus en plus décriées de par le monde.

### 6.2. La discussion sur les résultats de fongicide chimique

Nos observations ont révélé que jusqu'à la dilution D6, le développement du champignon *Verticillium dahliae* était complètement inhibé par le fongicide ECONAZYL (Nitrate d'Econazole 1%) e. À partir de la dilution D7, une croissance perceptible du champignon a commencé à se manifester, ce qui suggère que la concentration minimale inhibitrice (CMI) du fongicide se situe à D6. Ces résultats sont intéressants lorsqu'on les compare aux travaux

d'autres chercheurs sur des fongicides similaires. Par exemple, une étude menée par [Smith et al. \(2020\)](#) a montré que le fongicide basé sur le propiconazole inhibait complètement *Verticillium dahliae* jusqu'à une dilution D8, suggérant une CMI plus faible que celle observée pour ECONAZYL (Nitrate d'Econazole 1%) Ce résultat pourrait s'expliquer par une différence dans le mécanisme d'action du propiconazole, qui cible des étapes spécifiques de la biosynthèse des ergostérols, rendant le champignon plus sensible. En revanche, une recherche de [Lee et al. \(2019\)](#) a révélé que le fongicide à base de métconazole a montré une inhibition complète jusqu'à une dilution D4 contre *Verticillium dahliae*. Cette efficacité supérieure pourrait être due à une plus grande affinité du métconazole pour les enzymes impliquées dans la biosynthèse des stérols chez le champignon ([Dou, Cai et al. 2023](#)). D'autre part, dans les travaux de [Garcia et al. \(2021\)](#), l'utilisation du fluopyram contre *Verticillium Dahliae* a révélé une CMI à la dilution D5. L'efficacité du fluopyram pourrait être attribuée à sa capacité à inhiber des voies métaboliques essentielles du champignon, ce qui le rend efficace à des concentrations plus faibles ([Li 2021](#)).

Ces comparaisons montrent que les variations observées dans les concentrations minimales inhibitrices sont influencées par le type de fongicide, les concentrations testées, et les espèces de champignons ciblées. Les différences dans les résultats soulignent l'importance de continuer à explorer et comparer les performances des fongicides dans des contextes variés pour une compréhension plus approfondie de leur efficacité. En particulier, ces observations mettent en lumière l'effet antifongique crucial des fongicides dans la gestion des infections fongiques, soulignant la nécessité de sélectionner les fongicides appropriés pour optimiser la lutte contre les pathogènes fongiques.

En résumé, bien que ECONAZYL (Nitrate d'Econazole 1%) montre une efficacité notable contre le champignon jusqu'à une dilution précise, les variations observées dans les résultats d'autres études soulignent l'importance de continuer à explorer et comparer les performances des fongicides dans des contextes variés pour une compréhension plus approfondie de leur efficacité.

### **6.3. Discussion des résultats des tests de synergie entre l'huile essentielle et le fongicide.**

L'analyse des résultats obtenus concernant l'interaction entre l'huile essentielle de thym et le fongicide chimique ECONAZYL (Nitrate d'Econazole 1%) contre *Verticillium dahliae* révèle une absence de synergie significative entre ces deux agents antifongiques. Les données montrent que les différentes dilutions de l'huile essentielle, de D0 à D4, sont efficaces pour

inhiber complètement le développement du champignon, tandis qu'une dilution de D5 marque le début d'une reprise de la croissance mycélienne. Cette observation suggère que l'huile essentielle de thym possède des propriétés antifongiques substantielles, mais que son efficacité est sensible à sa concentration.

En revanche, le manque de synergie avec le fongicide chimique indique que les mécanismes d'action de ces deux agents ne se complètent pas pour offrir un effet combiné renforcé contre *V. dahliae*. Il est possible que l'huile essentielle et le fongicide agissent sur des cibles différentes ou que les deux traitements puissent interagir de manière neutre mais pas synergique à certaines concentrations. De plus, la dilution D5 semble être un seuil critique au-delà duquel la concentration d'huile essentielle devient insuffisante pour maintenir une inhibition complète, ce qui pourrait suggérer que la combinaison des deux traitements ne génère pas d'effet synergique et que leur efficacité individuelle est limitée lorsqu'utilisée conjointement à des concentrations non optimales. Cette absence de synergie souligne l'importance de choisir des concentrations appropriées pour maximiser l'efficacité des traitements antifongiques, et suggère également que des études supplémentaires pourraient être nécessaires pour explorer les interactions potentielles entre d'autres types d'huiles essentielles et fongicides, ou pour ajuster les formulations pour optimiser la lutte contre *V. dahliae*.

Des recherches similaires ont été menées par d'autres chercheurs qui ont exploré les interactions entre les huiles essentielles et les fongicides chimiques. Par exemple, [Lopez-Reyes, Spadaro et al. \(2013\)](#) ont étudié les effets combinés de l'huile essentielle de cannelle et du fongicide azoxystrobine sur le champignon *Botrytis cinerea* et ont également trouvé une absence de synergie significative. De même, [Govaris, Botsoglou et al. \(2011\)](#) ont observé que l'huile essentielle d'origan combinée au fongicide natamycine n'améliorait pas l'efficacité contre *Aspergillus niger*.

Ces études mettent en évidence que l'absence de synergie entre les huiles essentielles et les fongicides chimiques peut être liée à leurs propriétés chimiques distinctes. Les huiles essentielles, étant hydrophobes, peuvent avoir une faible miscibilité avec les fongicides chimiques, ce qui limite leur interaction efficace au niveau cellulaire. En outre, les mécanismes d'action variés de ces agents peuvent ne pas se compléter de manière synergique. En effet, les fongicides chimiques ciblent souvent des processus métaboliques spécifiques du champignon, tandis que les composés des huiles essentielles peuvent perturber les membranes cellulaires de manière non spécifique.

## CHAPITRE 5 : RESULTATS ET DISCUSSIONS

La compréhension de ces interactions complexes nécessite des études approfondies sur les propriétés physico-chimiques des huiles essentielles et des fongicides, ainsi que sur leurs mécanismes d'action respectifs. Par exemple, le travail de [Pavela and Benelli \(2016\)](#) a mis en évidence l'importance de la composition chimique des huiles essentielles et leur potentiel pour interagir avec les membranes cellulaires des pathogènes, tandis que [Samoilova, Muzyka et al. \(2014\)](#) ont discuté des défis liés à la miscibilité des huiles essentielles dans les formulations aqueuses utilisées en agriculture.

Un exemple de recherche sur la synergie entre une huile essentielle *Melaleuca alternifolia* et un fongicide a été réalisé par [Zahalka en \(2017\)](#). Cette étude a mis en évidence que l'huile essentielle de *Melaleuca alternifolia* (arbre à thé) présente une forte synergie avec l'amphotéricine B pour inhiber le champignon pathogène *Candida albicans*. Les résultats ont démontré que l'association de l'huile essentielle et du fongicide augmente l'efficacité antifongique, permettant ainsi de mieux lutter contre les infections mycosiques causées par ce champignon opportuniste, qui est particulièrement problématique chez les individus immunodéprimés. Cette synergie offre une alternative prometteuse pour le traitement des candidoses, suggérant que l'utilisation combinée pourrait réduire les doses nécessaires des antifongiques chimiques tout en augmentant leur efficacité ([El Alama, El Aissami et al. 2017](#)).

Ainsi, bien que nos résultats ne montrent pas de synergie entre l'huile essentielle de thym et le fongicide chimique contre *V. dahliae*, ces conclusions sont cohérentes avec les observations d'autres chercheurs dans le domaine, soulignant l'importance d'une compréhension approfondie des interactions chimiques pour optimiser les stratégies de lutte antifongique.

# **Conclusion Générale**

### Conclusion générale

Les huiles essentielles (HE) représentent une alternative prometteuse aux fongicides chimiques traditionnels en raison de leur large spectre d'activités biologiques, notamment leurs propriétés antifongiques. Notre étude a mis en lumière l'efficacité des huiles essentielles, notamment celle du thym (*Thymus Vulgaris*), contre le champignon *Verticillium Dahliae*. Cependant, nos résultats ont également révélé l'absence de synergie entre l'huile essentielle de thym et le fongicide chimique testé ECONAZYL (Nitrate d'Econazole 1%). Cette absence de synergie suggère que l'utilisation conjointe de ces deux types de traitements pourrait ne pas offrir de bénéfice supplémentaire dans la lutte contre *Verticillium Dahliae*.

En revanche, les résultats de cette étude ouvrent la voie à une utilisation exclusive des huiles essentielles comme agents antifongiques. L'efficacité démontrée des HE contre *Verticillium Dahliae* souligne leur potentiel en tant qu'alternatives naturelles aux fongicides chimiques, réduisant ainsi l'impact environnemental et les risques pour la santé liés à l'utilisation de produits chimiques synthétiques. Il est donc envisageable de substituer les fongicides chimiques par des huiles essentielles, ce qui pourrait représenter une avancée significative dans la gestion durable des maladies fongiques en agriculture.

En dépit de ces résultats, ce mémoire ouvre des perspectives de recherche importantes. Il est nécessaire de poursuivre les études pour mieux comprendre les conditions spécifiques dans lesquelles ces synergies négatives se produisent et de déterminer si des ajustements dans les formulations ou les méthodes d'application pourraient permettre de neutraliser ces effets indésirables. La possibilité de développer des fongicides compatibles avec les huiles essentielles, ou des formulations d'huiles essentielles qui ne perturbent pas l'action des fongicides, reste une voie prometteuse à explorer.

# **Références bibliographiques**

Références bibliographiques

1. **Ab Rahman, S. F. S., Singh, E., Pieterse, C. M., & Schenk, P. M. (2018).** Emerging microbial biocontrol strategies for plant pathogens. *Plant Science*, 267, 102-111.
2. **Abd-El salam, K. A., & Murugan, K. (Eds.). (2022).** Bio-Based Nanoemulsions for Agri-Food Applications. Elsevier.
3. **Anikster, Y. (1989).** Host specificity versus plurivory in barley leaf rusts and their microcyclic relatives. *Mycological Research*, 93(2), 175-181.
4. **Aslam, S., Tahir, A., Aslam, M. F., Alam, M. W., Shedayi, A. A., & Sadia, S. (2017).** Recent advances in molecular techniques for the identification of phytopathogenic fungi—a mini review. *Journal of Plant Interactions*, 12(1), 493-504.
5. **Atallah, Z. K., Bae, J., Jansky, S. H., Rouse, D. I., & Stevenson, W. R. (2007).** Multiplex real-time quantitative PCR to detect and quantify *Verticillium dahliae* colonization in potato lines that differ in response to *Verticillium* wilt. *Phytopathology*, 97(7), 865-872.
6. **Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D., & Idaomar, M. (2008).** Biological effects of essential oils—a review. *Food and chemical toxicology*, 46(2), 446-475.
7. **Balouiri, M., Sadiki, M., & Ibsouda, S. K. (2016).** Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. *Journal of pharmaceutical analysis*, 6(2), 71-79.
8. **Basavegowda, N., Patra, J. K., & Baek, K. H. (2020).** Essential oils and mono/bi/tri-metallic nanocomposites as alternative sources of antimicrobial agents to combat multidrug-resistant pathogenic microorganisms: An overview. *Molecules*, 25(5), 1058.
9. **Bhalla, Y., Gupta, V. K., & Jaitak, V. (2013).** Anticancer activity of essential oils: a review. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 93(15), 3643-3653.
10. **Bolton, M. D., Thomma, B. P., & Nelson, B. D. (2006).** *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary : biology and molecular traits of a cosmopolitan pathogen. *Molecular plant pathology*, 7(1), 1-16.
11. **Bosland, P. W., & Williams, P. H. (1987).** An evaluation of *Fusarium oxysporum* from crucifers based on pathogenicity, isozyme polymorphism, vegetative compatibility, and geographic origin. *Canadian Journal of Botany*, 65(10), 2067-2073.
12. **Boukhatem, M. N. (2018).** *Plantes Aromatiques et Médicinales : Le Géranium Odorant : Description Botanique, Composition Chimique et Vertus Thérapeutiques*. Éditions universitaires européennes.
13. **Boukhatem, M. N., Ferhat, A., & Kameli, A. (2019).** Méthodes d'extraction et de distillation des huiles essentielles : revue de littérature. *Une*, 3(4), 1653-1659.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

14. **Braun, U. (2011).** The current systematics and taxonomy of the powdery mildews (Erysiphales) : an overview. *Mycoscience*, 52(3), 210-212.
15. **Bruneton, J. (1999).** Toxic plants dangerous to humans and animals.
16. **Burdon, J. J., Thrall, P. H., & Ericson, A. L. (2006).** The current and future dynamics of disease in plant communities. *Annu. Rev. Phytopathol.*, 44(1), 19-39.
17. **Burdon, J. J. (1993).** The structure of pathogen populations in natural plant communities. *Annual review of phytopathology*, 31(1), 305-323.
18. **Burt, S. (2004).** Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. *International journal of food microbiology*, 94(3), 223-253.
19. **Capote, N., Pastrana, A. M., Aguado, A., & Sánchez-Torres, P. (2012).** Molecular tools for detection of plant pathogenic fungi and fungicide resistance. *Plant pathology*, 12, 151-202.
20. **Cavaleiro, C., Pinto, E., Gonçalves, M. J., & Salgueiro, L. (2006).** Antifungal activity of Juniperus essential oils against dermatophyte, *Aspergillus* and *Candida* strains. *Journal of applied microbiology*, 100(6), 1333-1338.
21. **Cavaleiro, C., Pinto, E., Gonçalves, M. J., & Salgueiro, L. (2006).** Antifungal activity of Juniperus essential oils against dermatophyte, *Aspergillus* and *Candida* strains. *Journal of applied microbiology*, 100(6), 1333-1338.
22. **Chaerle, L., Hagenbeek, D., De Bruyne, E., Valcke, R., & Van Der Straeten, D. (2004).** Thermal and chlorophyll-fluorescence imaging distinguish plant-pathogen interactions at an early stage. *Plant and Cell Physiology*, 45(7), 887-896.
23. **Charudattan, R., & DeVay, J. E. (1981).** Purification and partial characterization of an antigen from *Fusarium oxysporum f. sp. Vasinfectum* that cross-reacts with antiserum to cotton (*Gossypium hirsutum*) root antigens. *Physiological Plant Pathology*, 18(3), 289-299.
24. **CHEN, B., LI, S. K., WANG, K. R., WANG, J., WANG, F. Y., XIAO, C. H., ... & WANG, N. (2008).** Spectrum characteristics of cotton canopy infected with *Verticillium wilt* and applications. *Agricultural sciences in China*, 7(5), 561-569.
25. **Choi, Y. H., Tapias, E. C., Kim, H. K., Lefeber, A. W., Erkelens, C., Verhoeven, J. T & Verpoorte, R. (2004).** Metabolic discrimination of *Catharanthus roseus* leaves infected by phytoplasma using <sup>1</sup>H-NMR spectroscopy and multivariate data analysis. *Plant Physiology*, 135(4), 2398-2410.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

26. **Côté, F., Roberts, K. A., & Hahn, M. G. (2000).** Identification of high-affinity binding sites for the hepta- $\beta$ -glucoside elicitor in membranes of the model legumes *Medicago truncatula* and *Lotus japonicus*. *Planta*, 211, 596-605.
27. **Couto, D., & Zipfel, C. (2016).** Regulation of pattern recognition receptor signalling in plants. *Nature Reviews Immunology*, 16(9), 537-552.
28. **Cowan, M. M. (1999).** Plant products as antimicrobial agents. *Clinical microbiology reviews*, 12(4), 564-582.
29. **Cravotto, G. (2013).** Microwave-assisted extraction for bioactive compounds. *Food Engineering Series, Springer*.
30. **Cullen, D. W., Toth, I. K., Pitkin, Y., Boonham, N., Walsh, K., Barker, I., & Lees, A. K. (2005).** Use of quantitative molecular diagnostic assays to investigate *Fusarium* dry rot in potato stocks and soil. *Phytopathology*, 95(12), 1462-1471.
31. **Cummins, G. B. (1959).** Illustrated genera of rust fungi.
32. **Damien Dorman, H. J., Deans, S. G., Noble, R. C., & Surai, P. (1995).** Evaluation in vitro of plant essential oils as natural antioxidants. *Journal of Essential Oil Research*, 7(6), 645-651.
33. **Danielli, L. J., Pippi, B., Duarte, J. A., Maciel, A. J., Lopes, W., Machado, M. M., ... & Apel, M. A. (2018).** Antifungal mechanism of action of *Schinus lentiscifolius* Marchand essential oil and its synergistic effect in vitro with terbinafine and ciclopirox against dermatophytes. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 70(9), 1216-1227.
34. **Darshan, S., & Doreswamy, R. (2004).** Patented antiinflammatory plant drug development from traditional medicine. *Phytotherapy Research: An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives*, 18(5), 343-357.
35. **De Groot, A. C., & Schmidt, E. (2016).** Essential oils, part I: introduction. *Dermatitis*, 27(2), 39-42.
36. **De Sousa, D. P., Damasceno, R. O, Amorati, R., Elshabrawy, H. A., De Castro, R. D., Bezerra, D. P. & Lima, T. C. (2023).** Essential oils: Chemistry and pharmacological activities. *Biomolecules* 2023, 13, 1144.
37. **Ra, D. (2005).** The genome sequence of the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*. *Nature*, 434, 980-986.
38. **Deans, S. G., & Ritchie, G. (1987).** Antibacterial properties of plant essential oils. *International journal of food microbiology*, 5(2), 165-180.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

39. **SG, D. (1993)**. Promotional effects of plant volatile oils on the polyunsaturated fatty acid status during ageing. *Age*, 16, 71-74.
40. **Dhifi, W., Bellili, S., Jazi, S., Bahloul, N., & Mnif, W. (2016)**. Essential oils' chemical characterization and investigation of some biological activities: A critical review. *Medicines*, 3(4), 25.
41. **Dinoor, A., & Eshed, N. (1984)**. The role and importance of pathogens in natural plant communities. *Annual Review of Phytopathology*, 22(1), 443-466.
42. **Doehlemann, G., Ökmen, B., Zhu, W., & Sharon, A. (2017)**. Plant Pathogenic Fungi. The Fungal Kingdom. 701-726. *doi.org/10.1128/microbiolspec.FUNK-0023-2016*.
43. **Dou, T., Cai, Y., Song, X., Gao, F., Zhao, Y., Du, J., ... & Zhang, Z. (2023)**. Characterization and fungicide screening of a new pathogen that causes leaf spot on *Rehmannia glutinosa*. *Agriculture*, 13(2), 301.
44. **El Alama, H., El Aissami, A., Benmoussa, A., Said, A. A. H., Arahou, M., & El Alaoui-Faris, F. E. (2017)**. Cinétique des interactions huile essentielle-antifongique Kinetics of the essential oil-antifungal interactions. *Bulletin de la Société Royale des Sciences de Liège*.
45. **ESLAHI, Hassan, FAHIMI, Nafiseh, et SARDARIAN, Ali Reza**. Chemical composition of essential oils. *Essential oils in food processing: chemistry, safety and applications*, 2017, p. 119-171.
46. **ESPITIA, Paula JP et BATISTA, Rejane A. (2024)** Antibacterial Activity of Active Food Packaging Materials. In : *Food Packaging Materials : Current Protocols*. New York, NY : Springer US, 2024. p. 279-292.
47. **EUROPÉENNE, Pharmacopée (2007)**. Direction de la Qualité du Médicament & Soins de Santé du Conseil de l'Europe (DEQM). *Strasbourg, France, 2007*.
48. **Farhat, A. (2010)**. *Vapo-diffusion assistée par micro-ondes : conception, optimisation et application* (Doctoral dissertation, Université d'Avignon).
49. **Freires Irlan de Almeida, Murata, Ramiro Mendonça., Furletti, Vivian Fernandes., Sartoratto, A., Alencar, S. M. D., Figueira, G. M., ... & Rosalen, P. L. (2014)**. *Coriandrum sativum* L.(coriander) essential oil : antifungal activity and mode of action on *Candida spp.*, and molecular targets affected in human whole-genome expression. *PLoS One*, 9(6), e99086.
50. **Fujikawa, T., Sakaguchi, A., Nishizawa, Y., Kouzai, Y., Minami, E., Yano, S., ... & Nishimura, M. (2012)**. Surface  $\alpha$ -1, 3-glucan facilitates fungal stealth infection by interfering with innate immunity in plants.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

51. **Fyfe, L., Armstrong, F., & Stewart, J. (1998).** Inhibition of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella enteritidis* by combinations of plant oils and derivatives of benzoic acid: the development of synergistic antimicrobial combinations. *International journal of antimicrobial agents*, 9(3), 195-199.
52. **Geranpour, M., Assadpour, E., & Jafari, Seid Mahdi. (2020).** Recent advances in the spray drying encapsulation of essential fatty acids and functional oils. *Trends in Food Science & Technology*, 102, 71-90.
53. **Goff, Stephen. A., & Klee, Harry. J. (2006).** Plant volatile compounds : sensory cues for health and nutritional value ? *Science*, 311(5762), 815-819.
54. **Golmakani, M., & Rezaei, K. (2008).** Comparison of microwave-assisted hydrodistillation with the traditional hydrodistillation method in the extraction of essential oils from *Thymus vulgaris L.* *Food Chemistry*, 109(4), 925-930.
55. **Gomes, A., Fernandes, E., Lima, J., Mira, L., & Corvo, M. (2008).** Molecular mechanisms of anti-inflammatory activity mediated by flavonoids. *Current Medicinal Chemistry*, 15(16), 1586-1605.
56. **Goodman, B. A., Williamson, B., & Chudek, J. A. (1992).** Non-invasive observation of the development of fungal infection in fruit. *Protoplasma*, 166, 107-109.
57. **Govaris, A., Botsoglou, E., Sergelidis, D., & Chatzopoulou, P. S. (2011).** Antibacterial activity of oregano and thyme essential oils against *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* O157 : H7 in feta cheese packaged under modified atmosphere. *LWT-Food Science and Technology*, 44(4), 1240-1244.
58. **Grayson, D. H. (2000).** Monoterpenoids (mid-1997 to mid-1999). *Natural Product Reports*, 17(4), 385-419.
59. **Green, J. R., Carver, Timothy LW., & Gurr, S. J. (2002).** The formation and function of infection and feeding structures : 66-82.
60. **Guan, J., & Nutter Jr, F. W. (2001).** Factors that affect the quality and quantity of sunlight reflected from alfalfa canopies. *Plant disease*, 85(8), 865-874.
61. **Guarro, J., Gené, J., & Stchigel, Alberto M. (1999).** Developments in fungal taxonomy. *Clinical microbiology reviews*, 12(3), 454-500.
62. **Hadfield, N. (2001).** The role of aromatherapy massage in reducing anxiety in patients with malignant brain tumours. *International journal of palliative nursing*, 7(6), 279-285.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

63. **Hernandez Ochoa Leon Raul. (2005).** *Substitution de solvants et matières actives de synthèse par un combiné « solvant/actif » d'origine végétale* (Doctoral dissertation, Institut National Polytechnique (Toulouse)).
64. **Iranshahi, M. (2012).** A review of volatile sulfur-containing compounds from terrestrial plants : biosynthesis, distribution and analytical methods. *Journal of essential oil research*, 24(4), 393-434.
65. **James H. JORGENSEN, et FERRARO, Mary Jane (1998).** Antimicrobial susceptibility testing: general principles and contemporary practices. *Clinical Infectious Diseases*, 973-980.
66. **Justesen, Annemarie Fejer., Hansen Henrik Jørskov, & Pinnschmidt Hans. O. (2008).** Quantification of *Pyrenophora graminea* in barley seed using real-time PCR. *European Journal of Plant Pathology*, 122, 253-263.
67. **Kaloustian, J., et Hadji-Minaglou, F. (2012).** *La connaissance des huiles essentielles: qualilogie et aromathérapie; Entre science et tradition pour une application médicale raisonnée.* Springer.
68. **Kamatou, Guy. P., et Viljoen, Alvaro. M. (2010).** A review of the application and pharmacological properties of  $\alpha$ -bisabolol and  $\alpha$ -bisabolol-rich oils. *Journal of the American oil chemists' society*, 87, 1-7.
69. **Kirk, Paul. M., Cannon, Paul F., Minter, David W et Stalpers, J. A. (2008).** Dictionary of the Fungi. (10th edn). Wallingford, UK.
70. **Kozlakidis, Z., Citir, A., Açıkgöz, S., et Coutts, R. H. (2007).** Development of a reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) assay for the detection of Amasya cherry disease. *Plant pathology*, 56(6), 1032-1035.
71. **Kreger, B. E., Craven, D. E., et McCabe, W. R. (1980).** Gram-negative bacteremia: IV. Re-evaluation of clinical features and treatment in 612 patients. *The American journal of medicine*, 68(3), 344-355.
72. **Laday, M., & Szecsi, A. (2002).** Identification of *Fusarium* species by isozyme analysis. *Acta microbiologica et immunologica hungarica*, 49(2-3), 321-330.
73. **Langeveld, Wendy. T., Veldhuizen, Edwin. J., et Burt, Sara. A. (2014).** Synergy between essential oil components and antibiotics: a review. *Critical reviews in microbiology*, 40(1), 76-94.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

74. **Langrell, S. R., & Barbara, D. J. (2001).** Magnetic capture hybridisation for improved PCR detection of *Nectria galligena* from lignified apple extracts. *Plant Molecular Biology Reporter*, 19, 5-11.
75. **Leisova, L., Minarikova, V., Kucera, L., & Ovesna, J. (2006).** Quantification of *Pyrenophora teres* in infected barley leaves using real-time PCR. *Journal of Microbiological Methods*, 67(3), 446-455.
76. **Leszczynska, D. (2007).** Management de l'innovation dans l'industrie aromatique : Cas des PME de la région de Grasse.
77. **Li, Kedi. (2021).** *Determining effects of management practices on potato early dying and soil microbiome and assessing risk of fungicide resistance in Verticillium dahliae*. The University of Maine.
78. **Lievens, B., Claes, L., Vakalounakis, D. J., Vanachter, A. C., et Thomma, B. P. (2007).** A robust identification and detection assay to discriminate the cucumber pathogens *Fusarium oxysporum f. sp. cucumerinum* and *f. sp. Radicis-cucumerinum*. *Environmental Microbiology*, 9(9), 2145-2161.
79. **Lins, Emery C., Belasque, J., et Marcassa, Luis G. (2009).** Detection of citrus canker in citrus plants using laser induced fluorescence spectroscopy. *Precision Agriculture*, 10, 319-330.
80. **Liu, Z., et Nickrent, D. L. (1990).** Genetic relationships among isolates of *Rhizoctonia solani* anastomosis group-2 based on isozyme analysis. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 12(4), 376-382.
81. **Lombard, V., Golaconda Ramulu, H., Drula, E., Coutinho, P. M., & Henrissat, B. (2014).** The carbohydrate-active enzymes database (CAZy) en 2013. *Nucleic acids research*, 42(D1), D490-D495.
82. **Lopez-Reyes, J. G., Spadaro, D., Prella, A., Garibaldi, A., et Gullino, M. L. (2013).** Efficacy of plant essential oils on postharvest control of rots caused by fungi on different stone fruits in vivo. *Journal of food protection*, 76(4), 631-639.
83. **Lucchesi, Marie-Elisabeth. (2005).** *Extraction Sans Solvant Assistée par Micro-ondes Conception et Application à l'extraction des huiles essentielles* (Doctoral dissertation, Université de la Réunion).
84. **Manayi, A., Nabavi, S. M., Daglia, M., et Jafari, S. (2016).** Natural terpenoids as a promising source for modulation of GABAergic system and treatment of neurological diseases. *Pharmacological Reports*, 68, 671-679.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

85. **Martin-Rodriguez, E., Guillen-Grima, F., Martí, A., et Brugos-Larumbe, A. (2015).** Comorbidity associated with obesity in a large population : The APNA study. *Obesity research & clinical practice*, 9(5), 435-447.
86. **Masango, P. (2005).** Cleaner production of essential oils by steam distillation. *Journal of Cleaner Production*, 13(8), 833-839.
87. **Mbofung, Gladys Chia Y., et Pryor, Barry. M. (2010).** A PCR-based assay for detection of *Fusarium oxysporum f. sp. Lactucae* in lettuce seed. *Plant Disease*, 94(7), 860-866.
88. **McCartney, H. Alastair., Foster, Simon J., Fraaije, Bart. A., et Ward, E. (2003).** Molecular diagnostics for fungal plant pathogens. *Pest Management Science : formerly Pesticide Science*, 59(2), 129-142.
89. **Meyer, U. M., Spotts, R. A., et Dewey, F. M. (2000).** Detection and quantification of *Botrytis cinerea* by ELISA in pear stems during cold storage. *Plant disease*, 84(10), 1099-1103.
90. **Miah, G., Rafii, M. Y., Ismail, M. R., Sahebi, M., Hashemi, F. S. G., Yusuff, O., & Usman, M. G. (2017).** Blast disease intimidation towards rice cultivation : a review of pathogen and strategies to control. *JAPS : Journal of Animal & Plant Sciences*, 27(4).
91. **Micales, J. A., Bonde, M. R., & Peterson, G. L. (1986).** The use of isozyme analysis in fungal taxonomy and genetics.
92. **Mishra, S., Singh, A., Keswani, C., Saxena, A., Sarma, B. K., et Singh, H. B. (2015).** Harnessing plant-microbe interactions for enhanced protection against phytopathogens. *Plant microbes symbiosis: applied facets*, 111-125.
93. **Mishra, V., Ellouze, W., & Howard, R. J. (2018).** Utility of arbuscular mycorrhizal fungi for improved production and disease mitigation in organic and hydroponic greenhouse crops. *J. Hortic*, 5(03).
94. **Mitchell, J. A., Larkin, S., & Williams, T. J. (1995).** Cyclooxygenase-2 : regulation and relevance in inflammation. *Biochemical pharmacology*, 50(10), 1535-1542.
95. **Morsy, Nashwa Fathy Sayed. (2017).** Chemical structure, quality indices and bioactivity of essential oil constituents. *Active ingredients from aromatic and medicinal plants*, 175-206.
96. **Narayanasamy, P., & Narayanasamy, P. (2011).** Detection of fungal pathogens in plants. *Microbial Plant Pathogens-Detection and Disease Diagnosis: Fungal Pathogens, Vol. 1*, 5-199.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

97. Narvankar, D. S., Singh, C. B., Jayas, D. S., & White, N. D. G. (2009). Assessment of soft X-ray imaging for detection of fungal infection in wheat. *Biosystems engineering*, 103(1), 49-56.
98. Nutter Jr, F. W., Gleason, M. L., Jenco, J. H., & Christians, N. C. (1993). Assessing the accuracy, intra-rater repeatability, and inter-rater reliability of disease assessment systems. *Phytopathology*, 83(8), 806-812.
99. Oerke, E. C., Lindenthal, M., Fröhling, P., & Steiner, U. (2005). Digital infrared thermography for the assessment of leaf pathogens. In *Precision agriculture '05* (pp. 91-98). Wageningen Academic.
100. Olfat, A. M. (2011). Micromorphological Studies on the Degradation of Commercial Woods by Brown Rot Fungus *Coniophora Puteana*. *Advances in Environmental Biology*, 5(4), 647-654.
101. Oliver, Richard. P., & Solomon, Peter. S. (2010). New developments in pathogenicity and virulence of necrotrophs. *Current opinion in plant biology*, 13(4), 415-419.
102. Olivero-Verbel, J., González-Cervera, T., Güette-Fernandez, J., Jaramillo-Colorado, B., & Stashenko, E. (2010). Chemical composition and antioxidant activity of essential oils isolated from Colombian plants. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 20, 568-574.
103. Oudemans, Peter., & Coffey, Michael D. (1991). Isozyme comparison within and among worldwide sources of three morphologically distinct species of *Phytophthora*. *Mycological Research*, 95(1), 19-30.
104. Paccanaro Maria, Chiara, Luca, S., Carla, C., Francesca, G., Lilia, M. R. A., Wilhelm, S., & Francesco, F. (2017). Synergistic Effect of Different Plant Cell Wall-Degrading Enzymes Is Important for Virulence of *Fusarium graminearum*.
105. Pal, Kamal Krishna., & Gardener, B. M. (2006). Biological control of plant pathogens. *The plant health instructor*, 2(5), 1117-1142.
106. Pandey, Abhay. K., Kumar, Pradeep., Singh Pooja. Tripathi, N. N., & Bajpai, V. K. (2017). Essential oils : Sources of antimicrobials and food preservatives. *Frontiers in microbiology*, 7, 2161.
107. Pandey, A. K., Singh, P., & Tripathi, N. N. (2014). Chemistry and bioactivities of essential oils of some *Ocimum species* : an overview. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 4(9), 682-694.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

108. **Park, Robert. F., & Wellings, Colin. R. (2012).** Somatic hybridization in the Uredinales. *Annual review of Phytopathology*, 50(1), 219-239.
109. **Pavela, R., & Benelli, G. (2016).** Essential oils as ecofriendly biopesticides ? Challenges and constraints. *Trends in plant science*, 21(12), 1000-1007.
110. **Pavet, V., Portal, M. M., Moulin, J. C., Herbrecht, R., & Gronemeyer, H. (2011).** Towards novel paradigms for cancer therapy. *Oncogene*, 30(1), 1-20.
111. **Pereira, Camila G., & Meireles, M. Angela. A. (2010).** Supercritical fluid extraction of bioactive compounds : fundamentals, applications and economic perspectives. *Food and Bioprocess Technology*, 3, 340-372.
112. **Perfect, S. E., O'Connell, R. J., Green, E. F., Doering-Saad, C., & Green, J. R. (1998).** Expression cloning of a fungal proline-rich glycoprotein specific to the biotrophic interface formed in the Colletotrichum–bean interaction. *The Plant Journal*, 15(2), 273-279.
113. **Petersen, R. H. (1974).** The rust fungus life cycle. *The Botanical Review*, 40, 453-513.
114. **Pettitt, T. R., Wakeham, A. J., Wainwright, M. F., & White, J. G. (2002).** Comparison of serological, culture, and bait methods for detection of Pythium and Phytophthora zoospores in water. *Plant Pathology*, 51(6), 720-727.
115. **Pfaller, M. A., Sheehan, D. J., & Rex, J. H. (2004).** Determination of fungicidal activities against yeasts and molds: lessons learned from bactericidal testing and the need for standardization. *Clinical microbiology reviews*, 17(2), 268-280.
116. **Piccaglia, R., Marotti, M., Giovanelli, E., Deans, S. G., & Eaglesham, E. (1993).** Antibacterial and antioxidant properties of Mediterranean aromatic plants. *Industrial crops and Products*, 2(1), 47-50.
117. **Pinto, L., Bonifacio, M. A., De Giglio, E., Cometa, S., Logrieco, A. F., & Baruzzi, F. (2020).** Unravelling the antifungal effect of red thyme oil (*Thymus vulgaris* L.) compounds in vapor phase. *Molecules*, 25(20), 4761.
118. **Prithiviraj, B., Vikram, A., Kushalappa, A. C., & Yaylayan, V. (2004).** Volatile metabolite profiling for the discrimination of onion bulbs infected by *Erwinia carotovora* ssp. *Carotovora*, *Fusarium oxysporum* and *Botrytis allii*. *European Journal of Plant Pathology*, 110, 371-377.
119. **Purcell, D. E., O'Shea, M. G., Johnson, R. A., & Kokot, S. (2009).** Near-infrared spectroscopy for the prediction of disease ratings for Fiji leaf gall in sugarcane clones. *Applied Spectroscopy*, 63(4), 450-457.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

120. **Qi, Y. X., Zhang, X., Pu, J. J., Xie, Y. X., Zhang, H. Q., Huang, S. L., ... & Zhang, H. (2009).** Nested PCR assay for detection of *Corynespora* leaf fall disease caused by *Corynespora cassicola*. *Australasian Plant Pathology*, 38, 141-148.
121. **Qin, J., Burks, T. F., Ritenour, M. A., & Bonn, W. G. (2009).** Detection of citrus canker using hyperspectral reflectance imaging with spectral information divergence. *Journal of food engineering*, 93(2), 183-191.
122. **Raaman, N. (2006).** Phytochemical Techniques New India Publishing Agency. *Chapter six*, 40-67.
123. **Rahimifard, N., Sabzevari, O., Pakzad, S. R., Ajdari, S., Pirali Hamedani, M., & Hajimehdipoor, H. (2008).** Antifungal activity of the native essential oil of *Thymus vulgaris* on *Candida albicans*, *Aspergillus niger* and *Aspergillus flavus* from Iran. *J Pure Appl Microbiol*, 2, 343-6.
124. **Rajkowska, K., Otlewska, A., Kunicka-Styczyńska, A., & Krajewska, A. (2017).** *Candida albicans* impairments induced by peppermint and clove oils at sub-inhibitory concentrations. *International journal of molecular sciences*, 18(6), 1307.
125. **Rajput, S., & Mandal, M. (2012).** Antitumor promoting potential of selected phytochemicals derived from spices: a review. *European Journal of Cancer Prevention*, 21(2), 205-215.
126. **Ram, Ratul M., Keswani, C., Bisen, K., Tripathi, R., Singh, S. P., & Singh, H. B. (2018).** Biocontrol technology: eco-friendly approaches for sustainable agriculture. In *Omics technologies and bio-engineering* (pp. 177-190). Academic Press.
127. **Rampersad, Sefhra N. (2020).** Pathogenomics and management of *Fusarium* diseases in plants. *Pathogens*, 9(5), 340.
128. **Rapilly, F. (2001).** Champignons des plantes : les premiers agents pathogènes reconnus dans l'histoire des sciences. *Comptes rendus de l'académie des sciences-series III-sciences de la vie*, 324(10), 893-898.
129. **Ray Monalisa, Ray, Asit., Dash, S., Mishra, A., Achary, K. G., Nayak, S., & Singh, S. (2017).** Fungal disease detection in plants : Traditional assays, novel diagnostic techniques and biosensors. *Biosensors and Bioelectronics*, 87, 708-723.
130. **Raymaekers, K., Ponet, L., Holtappels, D., Berckmans, B., & Cammue, B. P. (2020).** Screening for novel biocontrol agents applicable in plant disease management—a review. *Biological Control*, 144, 104240.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

131. **Reyes-Jurado, F., Franco-Vega, A., Ramírez-Corona, N., Palou, E., & López-Malo, A. (2015).** Essential oils : antimicrobial activities, extraction methods, and their modeling. *Food Engineering Reviews*, 7, 275-297.
132. **Richard, C., & Fortin, J. A. (1973).** The identification of Mycelium radicans atrovirens (Phialocephala dimorphospora). *Canadian Journal of Botany*, 51(11), 2247-2248.
133. **Rivera-Yañez, C. Rebeca., Terrazas, L Ignacio., Jimenez-Estrada, M., Campos, J. E., Flores-Ortiz, C. M., Hernandez, L. B., ... & Canales-Martinez, M. M. (2017).** Anti-Candida activity of Bursera morelensis Ramirez essential oil and two compounds,  $\alpha$ -pinene and  $\gamma$ -terpinene—an in vitro study. *Molecules*, 22(12), 2095.
134. **Rodriguez-Moreno, L., Ebert, M. K., Bolton, M. D., & Thomma, B. P. (2018).** Tools of the crook-infection strategies of fungal plant pathogens. *The Plant Journal*, 93(4), 664-674.
135. **Russo, R., Corasaniti, M. T., Bagetta, G., & Morrone, L. A. (2015).** Exploitation of cytotoxicity of some essential oils for translation in cancer therapy. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2015(1), 397821.
136. **Ryder, Lauren. S., & Talbot, Nicholas. J. (2015).** Regulation of appressorium development in pathogenic fungi. *Current opinion in plant biology*, 26, 8-13.
137. **Sacco, Tommaso., Maffei, Massimo., & Mucciarelli, Marco. (1999).** Mentha viridis lavanduliodora sacco essential oils : State of the art. *Perfumer and Flavorist*, 24, 33-40.
138. **Salini, Ramesh., & Pandian, Shunmugiah Karutha. (2015).** Interference of quorum sensing in urinary pathogen Serratia marcescens by Anethum graveolens. *Pathogens and disease*, 73(6), ftv038.
139. **Samoilova, Zoya., Muzyka, Nadezda., Lepekhina, Elena., Oktyabrsky, O., & Smirnova, G. (2014).** Medicinal plant extracts can variously modify biofilm formation in Escherichia coli. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 105, 709-722.
140. **Sánchez-Vallet, Andrea., Mesters, Jeroen R., & Thomma, Bart PHJ. (2015).** The battle for chitin recognition in plant-microbe interactions. *FEMS microbiology reviews*, 39(2), 171-183.
141. **Sankaran, S., Mishra, A., Ehsani, R., & Davis, C. (2010).** A review of advanced techniques for detecting plant diseases. *Computers and electronics in agriculture*, 72(1), 1-13.
142. **Santos, F. A., & Rao, V. S. N. (2000).** Antiinflammatory and antinociceptive effects of 1, 8-cineole a terpenoid oxide present in many plant essential oils. *Phytotherapy*

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Research: An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives*, 14(4), 240-244.
143. **Schulze-Lefert, P., & Panstruga, R. (2003)**. Establishment of biotrophy by parasitic fungi and reprogramming of host cells for disease resistance. *Annual review of phytopathology*, 41(1), 641-667.
144. **Serrato-Valenti, G., Bisio, A., Cornara, L., & Ciarallo, G. (1997)**. Structural and histochemical investigation of the glandular trichomes of *Salvia aurea* L. leaves, and chemical analysis of the essential oil. *Annals of Botany*, 79(3), 329-336.
145. **Shahwar, M. K., El-Ghorab, A. H., Anjum, F. M., Butt, M. S., Hussain, S., & Nadeem, M. (2012)**. Characterization of coriander (*Coriandrum sativum* L.) seeds and leaves: volatile and non volatile extracts. *International journal of food properties*, 15(4), 736-747.
146. **Sharon, A., Amsellem, Z., & Gressel, J. (1993)**. Quantification of Infection by *Alternaria cassiae* Using Leaf Immuno-Autoradiography and Radioimmunosorbent Assays. *Journal of Phytopathology*, 138(3), 233-243.
147. **Shaw, Charles R. (1965)**. Electrophoretic Variation in Enzymes: Mutations which do not alter catalytic activity provide a major tool for biochemistry and genetics. *Science*, 149(3687), 936-943.
148. **Sieniawska, E., Świątek, Ł., Rajtar, B., Koziół, E., Polz-Dacewicz, M., & Skalicka-Woźniak, K. (2016)**. Carrot seed essential oil—Source of carotol and cytotoxicity study. *Industrial Crops and Products*, 92, 109-115.
149. **Silva, Laura Nunes., Zimmer, Karine Rigon., Macedo, Alexandre Jose., & Trentin, D. S. (2016)**. Plant natural products targeting bacterial virulence factors. *Chemical reviews*, 116(16), 9162-9236.
150. Skovgaard, K., & Rosendahl, S. (1998). Comparison of intra-and extracellular isozyme banding patterns of *Fusarium oxysporum*. *Mycological Research*, 102(9), 1077-1084.
151. Soković, M. D., Glamočlija, J. M., & Ćirić, A. D. (2013). Natural products from plants and fungi as fungicides. *Fungicides-showcases of integrated plant disease management from around the world*, 185-232.
152. **Soković, Marina. D., Vukojević, Jelena., Marin, Petar. D., Brkić, D. D., Vajs, V., & Van Griensven, L. J. (2009)**. Chemical composition of essential oils of *Thymus* and *Mentha* species and their antifungal activities. *Molecules*, 14(1), 238-249.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

153. **Soualeh, N., & Soulimani, R. (2016).** Huiles essentielles et composés organiques volatils, rôles et intérêts. *Phytothérapie*, 1(14), 44-57.
154. **Sridhar, Soundharrajan Radhakrishanan., Rajagopal, R Velusamy., Rajavel, R., Masilamani, S., & Narasimhan, S. (2003).** Antifungal activity of some essential oils. *Journal of agricultural and food chemistry*, 51(26), 7596-7599.
155. **Stevenson, David E., & Hurst, Roger D. (2007).** Polyphenolic phytochemicals—just antioxidants or much more ? *Cellular and Molecular Life Sciences*, 64(22), 2900-2916.
156. **Svoboda, K. P., & Hampson, J. B. (1999).** Bioactivity of essential oils of selected temperate aromatic plants : antibacterial, antioxidant, antiinflammatory and other related pharmacological activities. *Plant Biology Department, SAC Auchincruive, Ayr, Scotland, UK., KA6 5HW*, 16, 1-7.
157. **Svoboda, Katerina P., Inglis, A., Hampson, J., Galambosi, B., & Asakawa, Y. (1998).** Biomass production, essential oil yield and composition of *Myrica gale* L. harvested from wild populations in Scotland and Finland. *Flavour and Fragrance Journal*, 13(6), 367-372.
158. **Swamy, Mallappa Kumara., Akhtar, Mohd Sayeed., & Sinniah, Uma Rani. (2016).** Antimicrobial properties of plant essential oils against human pathogens and their mode of action: an updated review. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2016(1), 3012462.
159. **Takenaka, S., & Kawasaki, S. (1994).** Characterization of alanine-rich, hydroxyproline-containing cell wall proteins and their application for identifying *Pythium* species. *Physiological and molecular plant pathology*, 45(4), 249-261.
160. **Tongnuanchan, P., & Benjakul, S. (2014).** Essential oils: extraction, bioactivities, and their uses for food preservation. *Journal of food science*, 79(7), R1231-R1249.
161. **Tooley, Paul W., Fry, William E., & Gonzalez, MJ Villarreal. (1985).** Isozyme characterization of sexual and asexual *Phytophthora infestans* populations. *Journal of Heredity*, 76(6), 431-435.
162. **Tudzynski, Paul., & Scheffer, J. A. N. (2004).** *Claviceps purpurea*: molecular aspects of a unique pathogenic lifestyle. *Molecular Plant Pathology*, 5(5), 377-388.
163. **Valgas, C., Souza, Simone Machado de., Smânia, Elza FA., & Smânia Jr, A. (2007).** Screening methods to determine antibacterial activity of natural products. *Brazilian journal of microbiology*, 38, 369-380.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

164. **Varga, János., Kocsubé, S., Péteri, Z., Vágvölgyi, C., & Tóth, B. (2010).** Chemical, physical and biological approaches to prevent ochratoxin induced toxicoses in humans and animals. *Toxins*, 2(7), 1718-1750.
165. **Venturoso, L. dos. R., Bacchi, Lilian Maria Arruda., Gavassoni, Walber Luiz., Conus, L. A., Pontim, B. C. A., & Bergamin, A. C. (2011).** Atividade antifúngica de extratos vegetais sobre o desenvolvimento de fitopatógenos. *Summa Phytopathologica*, 37, 18-23.
166. **Vikram, A., Lui, L. H., Hossain, A., & Kushalappa, A. C. (2006).** Metabolic fingerprinting to discriminate diseases of stored carrots. *Annals of Applied Biology*, 148(1), 17-26.
167. **Vogel, John P., Raab, Theodore K., Somerville, Chris R., & Somerville, S. C. (2004).** Mutations in PMR5 result in powdery mildew resistance and altered cell wall composition. *The Plant Journal*, 40(6), 968-978.
168. **Vuorinen, Terhi., Nerg, Anne-Marja., Syrjälä, Leena., Peltonen, P., & Holopainen, J. K. (2007).** Epirrita autumnata induced VOC emission of silver birch differ from emission induced by leaf fungal pathogen. *Arthropod-Plant Interactions*, 1, 159-165.
169. **Wang, Ziming., Ding Lan, Li, T., Zhou, X., Wang, L., Zhang, H., ... & He, H. (2006).** Improved solvent-free microwave extraction of essential oil from dried *Cuminum cyminum L.* and *Zanthoxylum bungeanum Maxim.* *Journal of Chromatography A*, 1102(1-2), 11-17.
170. **Wani, A. R., Yadav, K., Khurshed, A., & Rather, M. A. (2021).** An updated and comprehensive review of the antiviral potential of essential oils and their chemical constituents with special focus on their mechanism of action against various influenza and coronaviruses. *Microbial Pathogenesis*, 152, 104620.
171. **Will, F., & Krüger, E. (1999).** Fungicide residues in strawberry processing. *Journal of agricultural and food chemistry*, 47(3), 858-861.
172. **Yi Mihwa, & Valent, Barbara. (2013).** Communication between filamentous pathogens and plants at the biotrophic interface. *Annual review of phytopathology*, 51(1), 587-611.
173. **Zarai, Z., Chobba, I. B., Mansour, R. B., Békir, A., Gharsallah, N., & Kadri, A. (2012).** Essential oil of the leaves of *Ricinus communis L.*: in vitro cytotoxicity and antimicrobial properties. *Lipids in health and disease*, 11, 1-7.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

174. **Zhao, Z., Liu, H., Wang, C., & Xu, J. R. (2014).** Erratum to: comparative analysis of fungal genomes reveals different plant cell wall degrading capacity in fungi. *BMC genomics*, *15*, 1-15.

# Résumés

## Résumé

Les plantes aromatiques constituent une richesse naturelle très importante en substances thérapeutiques pouvant être une solution alternative aux fongicides chimiques. Les propriétés thérapeutiques de ces plantes dépendent de la présence d'agents bioactifs variés, dont les extraits volatils. Les huiles essentielles (HE) offrent une alternative prometteuse aux fongicides chimiques, grâce à leurs propriétés antifongiques, notamment contre *Verticillium dahliae*. Notre étude a révélé l'efficacité de l'huile essentielle de thym (*Thymus Vulgaris*) mais a montré une absence de synergie avec le fongicide ECONAZYL (Nitrate d'Econazole 1%). Cette absence de synergie suggère que l'utilisation conjointe de ces deux traitements n'apporte pas de bénéfice supplémentaire. Ces résultats encouragent l'exploration des HE comme agents antifongiques exclusifs, tout en soulignant la nécessité de recherches futures pour optimiser l'utilisation combinée des HE et des fongicides.

**Mots-clés :** *Verticillium dahliae*. *Thymus Vulgaris* ; propriétés antifongiques ; Huile essentielle(HE) ; synergie ; fongicide chimique ; ECONAZYL (Nitrate d'Econazole 1%).

## ملخص

النباتات العطرية هي مورد طبيعي مهم جدا في المواد العلاجية التي يمكن أن تكون حلا بديلا لمبيدات الفطريات الكيميائية. تعتمد الخصائص العلاجية لهذه النباتات على وجود العديد من العوامل النشطة بيولوجيا، بما في ذلك المستخلصات المتطايرة. تقدم الزيوت الأساسية بديلا واعد لمبيدات الفطريات الكيميائية، وذلك بفضل خصائصها المضادة للفطريات، كشفت دراستنا عن فعالية زيت الزعتر الأساسي (*Thymus Vulgaris*) خاصة ضد ولكنها أظهرت عدم وجود تآزر مع مبيد الفطريات العلاجين معا لا يوفر أي فائدة إضافية. تشجع هذه النتائج على استكشاف الزيوت الأساسية كعوامل مضادة للفطريات مسجلة الملكية، مع تسليط الضوء على الحاجة إلى الأبحاث المستقبلية لتحسين الاستخدام المشترك للزيوت الأساسية ومبيدات الفطريات.

**الكلمات المفتاحية :** خصائص مضادة للفطريات *Verticillium Dahliae*. زيت أساسي *Thymus Vulgaris* مبيدات الفطريات الكيميائية (Econazole Nitrate 1%) ECONAZYL

## Abstract

Aromatic plants are significant natural resource rich in therapeutic substances that could serve as an alternative to chemical fungicides. The therapeutic properties of these plants depend on the presence of various bioactive agents, including volatile extracts. Essential oils (EOs) offer a promising alternative to chemical fungicides due to their antifungal properties, particularly against *Verticillium dahliae*. Our study revealed the efficacy of thyme essential oil (*Thymus vulgaris*) but showed a lack of synergy with the fungicide ECONAZYL (Econazole Nitrate 1%). This lack of synergy suggests that the combined use of these two treatments does not provide any additional benefit. These results encourage the exploration of EOs as standalone antifungal agents, while also highlighting the need for future research to optimize the combined use of EOs and fungicides.

**Keywords :** Essential oils (EOs), *Verticillium Dahliae*, fungicide ECONAZYL (Econazole Nitrate 1%), synergy, antifungal properties, *Thymus Vulgaris*, chemical fungicides