REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

Université Kasdi Merbah Ouargla Faculté des sciences de la nature et de la vie Département des Sciences Biologiques



Thèse de Doctorat en Sciences

Présentée en vue de l'obtention du diplôme de

Doctorat en Biologie

Option: Biochimie

Thème

Valorisation des huiles essentielles de *Rhanterium* adpressum Goss. & Durieu par analyse chimique et étude de leurs bioactivités

Présentée et soutenue publiquement le 09 Mai 2018 par :

Mme ELHOUITI Fatiha

Devant le Jury composé de :

M.	OULD EL HADJ MOHAMED DIDI	Professeur (Université Kasdi Merbah, OUARGLA)	Président
M.	OUINTEN Mohamed	Professeur (Université Amar Télidji, LAGHOUAT)	Directeur de thèse
M.	YOUSFI Mohamed	Professeur (Université Amar Télidji, LAGHOUAT)	Co-Directeur de thèse
M.	SEGNI Lâadjal	Professeur (Université Kasdi Merbah, OUARGLA)	Examinateur
M.	BOUTAIBA Sâad	MCA (Université Ziane Achour, DJELFA)	Examinateur

മെ 🗢 വേ

Année universitaire 2018

Dédicaces

Avec l'aide de Dieu, j'ai pu réaliser ce modeste travail que je dédie À :

Mes parents, que Dieu les protège. Ils m'ont toujours poussée à aller plus loin ; je leur suis très reconnaissante.

La mémoire de mon très cher beau-père Hami. Il m'a toujours considérée comme sa propre fille (Allah Yarehmou).

Mon cher époux Ismail, pour ton soutien et ta compréhension, tout au long de ce travail qui te doit beaucoup...Qu'il soit le témoignage de mon infinie reconnaissance pour ces années de privations et d'efforts communs.

Mes adorables enfants Lyna, Aïssa et les jumeaux Mohamed & Khadîdja. Que ce travail soit pour eux un exemple à suivre.

A tous ceux qui ont cru en moi.

Remerciement

Avant toute chose, je remercie Dieu, le tout puissant, pour m'avoir donnée la force et la patience pour mener à terme ce travail.

Al'issue de la rédaction de cette recherche, je suis convaincue que cette thèse est loin d'être un travail solitaire. En effet, je n'aurais jamais pu réaliser ce travail sans le soutien d'un grand nombre de personnes. Alors que je m'attelle à la rédaction de ces dernières pages, de nombreuses personnes me viennent à l'esprit. Certains noms seront cités, mais pas tous. Je m'excuse d'avance pour les personnes que je n'aurais pas eues la délicatesse de citer.

En premier lieu, je tiens à remercier vivement mon directeur de Thèse, monsieur Pr. Mohamed OUINTEN, pour la confiance qu'il m'a accordée en acceptant d'encadrer ce travail. Je ne saurais dire à quel point j'ai eu le plaisir à discuter avec lui et combien j'ai apprécié ses multiples compétences et ses qualités humaines d'écoute et de compréhension tout au long de ce travail. Durant toutes ces années, j'ai beaucoup appris avec lui.

Je souhaiterais exprimer ma gratitude à mon Co-directeur de Thèse, monsieur le Pr. Mohamed YOUSFI, Directeur du laboratoire des sciences fondamentales, Université de Laghouat, pour m'avoir orientée conseillée et encouragée tout au long de ce travail. Je suis infiniment reconnaissante pour votre effort toutes ces années à récolter mes échantillons de plante sans se plaindre, mille mercis.

Je voudrais également remercier l'ensemble des membres du jury d'avoir bien voulu accepter de juger ce travail et m'avoir fait l'honneur de leurs présences. Merci donc à Monsieur Mohamed Didi OULD EL HADJ, à Monsieur Laadjal SEGNI et à Monsieur Saad BOUTAIBA.

Je tiens à remercier Mr Jean-Michel SAVOIE (Directeur de l'unité Mycsa, INRA Bordeaux) et Mme Florence RICHARD-FORGET (Directrice Adjointe et Responsable de l'Equipe des Mycotoxines de Fusarium, INRA Bordeaux), pour l'accueil, les conseils et les orientations inestimables.

J'adresse mes plus sincères remerciements à Mr Christian BARREAU et Mr Francis FLEURAT-LESSARD (INRA Bordeaux) qui m'ont accordé leur confiance et qui m'ont encadrée. Merci pour tous les conseils que vous m'avez prodigués, pour toutes les notions que j'ai eu la chance d'apprendre grâce à vous.

Ce travail de thèse n'aurait pu se faire sans une aide conséquente pour les expérimentations. Un grand merci à Marie-Noëlle VERDAL-BONNIN, Sylvain CHEREAU, Gisèle MARCHEGAY (Gisou), Christine DUCOS, Vessela ATANASSOVA-PENICHON et Laëtitia PINSON-GADAIS pour leur aide dans les différentes tâches quotidiennes. Merci également à l'ensemble du personnel de MycSA qui m'a permis d'effectuer cette thèse dans de très bonnes et très agréables conditions de travail.

Je remercie bien sûr Corinne et Marie-France pour m'avoir facilité les démarches administratives. Merci également à Thierry pour avoir pris soin de mon ordinateur.

*M*erci à tous les autres membres de l'équipe, Christophe, Marie, Philippe, Michèle, Nathalie, Magalie, Bernard et Cathy, pour leur sympathie indescriptible.

Mon séjour à MycSA était formidable et très agréable. Durant ces trois stages, grâce à vous tous, et je sais que j'ai eu beaucoup de chance de tomber sur une équipe aussi sympathique qui a beaucoup contribué au bon déroulement de mes stages.

J'aimerais également remercier vivement Mademoiselle Isabelle BOMBARDA, maître de conférences, Faculté des Sciences, Université d'Aix-Marseille, France pour son aide précieuse.

Mes remerciements les plus sincères à Mme Sihem TOUATI HATTAB pour nous avoir fourni des souches pour réaliser ce travail scientifique; merci pour tout. C'est un peu grâce à vous que je suis arrivée à Bordeaux, tu m'as soutenue quand c'était difficile. Également je remercie M. Nadir GOURINE pour m'avoir aidée durant la phase pratique de mon travail.

Mes profonds remerciements s'adressent à Mon adorable amie Djalila TAKHI, mon sérieux étudiant Djillali TAHRI, sans oublier Mohamed SEBAA pour leur aide précieuse, pour m'avoir consacré du temps et pour avoir participés activement à la rédaction de mes articles.

Une pensée particulière à ma chère amie Hadjer AOUISSI pour son soutien, ses questions et discussions durant le long chemin de pratique, nos longues journées avec le « Fusa » et les hauts et les bas qu'on a passé ensemble.

Une pensée amicale à mes chères et adorables amies Zahra TAKHI et Reguia MAHFOUDI pour leur aide, soutien et partage durant les moments les plus difficiles.

Mes profonds remerciements s'adressent à Mme Zohra FERMELLI- BENDAOUD, M. Youcef BOUBRIMA, M. Hamid GUENANE, pour leur soutien précieux et aide inestimable.

Mon entière gratitude à mes chère(s) amis(es) et collègues Khadîdja BENAROUS, Halima NEBEG, Zohra ZOUKHREF, Hadjer BESSOUSSA, Khachaba IHCENE et Ibrahim SIFI de m'avoir toujours soutenue.

Mes remerciements vont également à mes proches qui ont assuré le tri de la plante. Merci donc à mon oncle Omar et sa famille, mes tantes, Hana SONNE, la famille BOURENNANE et la famille ZDEK pour leur aide inestimable, pour toutes ces heures passer de travail acharné, je leur en suis infiniment reconnaissante.

J'exprime mes plus vifs remerciements au responsable des laboratoires du Département de Biologie : M. Mustapha HADJOUDJA, et aux ingénieures de laboratoires : M. Mohamed CHETITHA, M^{elle} Fatima Zohra AOUISSI et M^{elle} Sihem DANDEN d'avoir mis à mon entière disposition le matériel nécessaire à la réalisation de ce travail.

Pour terminer, je souhaite remercier ma famille. Plus particulièrement, merci à mes parents, sans qui je n'aurais pas pu en arriver là, sans oublier Khalti Fatima. Je remercie également, Mon cher frère Abdelkader, son épouse Iman et mes chères sœurs Iman, soumia, Fatima Zahra et Khadîdja.

Un grand merci à toutes les personnes qui m'ont soutenu de près ou de loin au cours de la réalisation de ce travail.

Merci à tous !!!!

Ce travail de thèse a été réalisé au sein du laboratoire des Sciences Fondamentales et aux laboratoires du département de biologie (Université Amar Telidji, Laghouat). De plus, plusieurs séjours scientifiques effectués au sein de l'Equipe des Mycotoxines de Fusarium, de l'Unité Mycologie et Sécurité des Aliments (INRA de Bordeaux-Aquitaine, France) nous ont permis d'entreprendre des travaux fructueux.

Résumé

Les extraits de plantes sont connus depuis longtemps comme agents antifongiques. Cependant, leur utilisation comme préservateurs des céréales a été rarement rapportée. Ce travail a pour objectif l'étude de la variabilité chimique, l'activité antifongique ainsi que l'activité antimycotoxinogène des huiles essentielles de *Rhanterium adpressum*, vis-à-vis de quatre champignons mycotoxinogènes du genre *Fusarium*. L'échantillonnage a été fait dans quatre localités différentes (échantillonnage dans l'espace) et chaque trois mois, pendant trois ans (échantillonnage dans le temps).

Les huiles essentielles des feuilles et des fleurs ont été obtenues, séparément, par hydrodistillation.

L'analyse (CG/SM) a révélé trente-six constituants chimiques, au total, répartis en quatre classes de composés chimiques; avec des pourcentages variables, selon le mois d'extraction. Dans ces huiles essentielles, les hydrocarbures monoterpéniques forment la principale classe et, dans les échantillons collectés le mois de mai, les composés oxygénés présentent les pourcentages les plus élevés. L'ACP et l'AHC ont mis en évidence trois classes chimiques dans l'ensemble des échantillons d'HE.

Le pouvoir antifongique des HE des feuilles et des fleurs a été évalué par la méthode de contact direct, en milieux solide et liquide. Cependant, L'effet de ces HE sur le la production de trichothécènes de type B (TCTB) a été évaluée, en milieu liquide, par UPLC. L'activité antifongique et antimycotoxinogène des composés antifongiques bioactifs volatils (α-Pinène, β-Myrcène, Limonène, Géraniol et Linalool) ont été également évaluées sur les deux types de milieux et comparés à l'activité de l'HE. Les résultats des activités ont montré que l'extrait des fleurs présente une activité antifongique forte ; avec des concentrations intéressantes de CI₅₀ et CMI, sur les deux milieux. Cette activité pourrait être attribuée à leur composition, relativement élevée, de monoterpènes oxygénés. De plus, d'un effet inhibiteur significatif, des deux extraits d'HE, sur la production de TCTB, l'inhibition était de 66 à 97 et 76 à 100 % de FX pour 3-ADON et 15-ADON, respectivement. Nous avons trouvé que le Géraniol et notre huile présentent des activités antifongiques similaire ; avec l'effet inhibiteur le plus élevé (croissance et productions de TCTB).

L'effet de ces HE, au niveau transcriptionnel, impliqué dans l'inhibition de l'expression de plusieurs gènes clés de la voie de la biosynthèse des TCTB a été également évalué. Nos résultats ont montré que l'HE de *R. adpressum* agit sur la modulation de l'expression génétique de quelques gènes Tri responsables de la biosynthèse des TCTB. Ce résultat suggère que la production et la biosynthèse des TCTB pourraient être perturbées par les huiles essentielles.

Mots clés : Huiles essentielles, *Rhanterium adpressum*, *Fusarium*, composition chimique, activité antifongique, pouvoir antimycotoxinogène, Trichothécènes de type B, expression des gènes.

Abstract

The plant extracts have long been known as antifungal agents. However, their use as cereal preservatives have been rarely reported. This work aims to study the chemical variability, antifungal activity as well as the antimycotoxinogenic activity of the essential oils of *Rhanterium adpressum* against four mycotoxinogenic *Fusarium* fungi. Sampling was done in space (from four different localities) and then over time (three months for 3 years in the same region). The essential oils (EOs) of leaves and flowers were obtained separately by hydrodistillation.

The analysis (GC / MS) revealed thirty-six chemical constituents, divided into four classes of chemical compounds, with varying percentages by month of extraction. Monoterpene are the main class in these EOs, oxygenates have the highest percentages in samples collected in May. The ACP and the AHC have shown the presence of three chemical classes throughout the sample EOs.

The antifungal activity of leaves and flowers EO's was evaluated by the direct contact method in solid and liquid medium. However, the effect of these EOs on the production of trichothecene type B (TCTB) was evaluated in liquid medium by UPLC. The antifungal and antimycotoxinogenic activity of volatile bioactive antifungal compounds (α -Pinene, β -Myrcene, Limonene, Geraniol and Linalool) were also evaluated on both mediums and compared to the activity of EOs. The results of the activities showed that the flower extract had a strong antifungal activity, with interesting concentrations of IC₅₀ and MIC on both mediums, the activity can be attributed to their relatively high composition of oxygenated monoterpenes. In addition, a significant inhibitory effect on TCTB production, for both EO's extracts, the inhibition was 66-97 and 76-100% of FX, 3-ADON and 15-ADON, respectively. Geraniol activity appears to be most similar to EO and both exhibit the highest inhibitory effects on fungal development and TCTB production. The effect of these EOs at the transcriptional level, involved in inhibiting the expression of several key genes in the TCTB biosynthetic pathway, was also evaluated. Our results have shown that EOs of R. adpressum has an effect on the modulation of gene expression of a few Tri genes responsible for the biosynthesis of TCTBs. This suggests that TCTB production and biosynthesis may be disrupted by essential oils.

Key words: Essential oils, *Rhanterium adpressum*, *Fusarium*, chemical composition, antifungal activity, antimycotoxinogenicity effect, Trichothecene type B, gene expression.

مُلِّخٌص

المستخلصات العشبية عرفت منذ فترة طويلة باسم العوامل كعوامل مضادة للفطريات. ومع ذلك، نادرا ما يتم استخدامها كمواد حافظة للحبوب. يهدف هذا العمل إلى دراسة التغير الكيميائي والنشاط المضاد للفطريات للزيوت العطرية المستخلصة من نبات Rhanterium adpressum ضد أربعة فطريات مفرزة للسموم. تم أخذ العينات من أربع مناطق مختلفة عبر مدة زمنية تمتد على ثلاثة أشهر طيلة 3 سنوات ثم استخلصت الزيوت الطيارة من الأوراق والزهور بشكل منفصل بطريقة التقطير المائي.

أظهرت نتائج التحليل الغازي المرتبط بتقنية قياس الطيف الكتلي (CG/SM) أن هذا الزيت يحتوي على 36 مركبا كيميائيا، تنقسم بدورها إلى أربع فئات من المركبات الكيميائية بنسب مئوية مختلفة حسب شهر الاستخلاص. الهيدروكربونات وحيدة التربين هي الفئة الرئيسية في هذه الزيوت غير أن فئة المركبات المؤكسجنة لديها أعلى النسب المئوية في العينات التي تم جمعها في شهر ماي كما أظهرت طريقتا ACP و AHC وجود ثلاثة أصناف كيميائية في جميع العينات.

تم تقييم النشاط المضاد الفطري لزيت الأوراق والزهور بواسطة طريقة الاتصال المباشر في الوسطين الصلب والسائل. وتم تقييم تأثير هذه الزيوت العطرية على إفراز السموم الفطرية من نوع ب في وسط سائل بواسطة طريقة UPLC. كما تم تقييم النشاط المضاد للفطريات والمضاد لإفراز سموم الفطريات للمركبات الطيارة (, Geraniol, Linalool) ومقارنتها مع نشاط الزيوت الطيارة . أظهرت نتائج الأنشطة أن مستخلصات الزهور لها نشاط مضاد فطري قوي مع تركيزات مثيرة للاهتمام من CI_{50} و CMI_{50} و CI_{50} و CI_{50}

كما تم تقييم تأثير الزيوت الطيارة على مستوى النسخ، ومشاركتها في تثبيط التعبير الجيني للعديد من الجينات الرئيسية في المسار الحيوي لإفراز السموم من نوع ب. وقد أظهرت نتائجنا أن زيت Rhanterium adpressum له تأثير على تشكيل التعبير الجيني. وهذا يشير إلى أن إفراز السموم والتركيب الحيوي قد يتعطلان بسبب الزيوت الطيارة.

الكلمات المفتاحية: الزيوت الطيارة، العرفج (Rhanterium adpressum)، التركيب الكيميائي، نشاط مضاد للفطريات والتعبير الجيني.

Publications et Communications Scientifiques

Publications avec comité de lecture

• ElHouiti, F., Tahri, D., Seba, M., Ouinten, M., Gaydou, E. M., & Yousfi, M. (2016). Inhibition of *Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis* by essential oils of flowers and stems of *Rhanterium adpressum. PhOL PharmacologyOnLine*, *3*(22), 141-150.

http://pharmacologyonline.silae.it/front/archives 2016 3

Elhouiti, F., Tahri, D., Takhi, D., Ouinten, M., Barreau, C., Verdal-Bonnin, M. N., ... & Yousfi, M. (2017). Variability of composition and effects of essential oils from *Rhanterium adpressum* Coss. & Durieu against mycotoxinogenic *Fusarium* strains. *Archives of microbiology*, 199(10), 1345-1356.

https://doi.org/10.1007/s00203-017-1404-z

• Elhouiti, F. (2017). Valorisation des huiles essentielles de Rhanterium adpressum Algérien : Composition chimique, activités antimicrobiennes et antioxydante. Éditions universitaires européennes.

https://www.editions-ue.com/catalog/details//store/fr/book/978-3-639-62030-6/valorisation-des-huiles-essentielles-de-rhanterium-adpressum-alg%C3%A9rien

Communication dans des congrès

- <u>F. ELHOUITI</u>, I. SIFI, M. OUINTEN, N. GOURINE, M. YOUSFI. Composition Chimique, Activités Antimicrobienne Et Antioxydante Des Huiles Essentielles De *Rhanterium adpressum* Algérien. Le 2^{ème} séminaire international sur les plantes médicinales SIPM'2, *Ouargla, Algerie (Avril 2011)*.
- <u>F. ELHOUITI</u>, I. SIFI, M. OUINTEN, M. YOUSFI. Composition chimique et activités antioxydante des huiles essentielles de *Rhanterium adpressum*. Le 4^{ème} Symposium International Plantes Aromatiques et Médicinales de la plante à la pratique thérapeutique, *FST- Mohammedia, Maroc (Mai 2011)*.
- <u>F. ELHOUITI,</u> I. SIFI, M. OUINTEN, N. GOURINE, M. YOUSFI. Composition chimique et L'activité antifongique des huiles essentielles De *Rhanterium adpressum* Algérien. Assises Euro-Méditerranéennes, Exploitation et Valorisation des Plantes Médicinales et Aromatiques *Fès, Maroc (Mai 2012)*.

- <u>F. ELHOUITI</u>, I. SIFI, M. OUINTEN, N. GOURINE, M. YOUSFI. Composition Chimique, Activités Antimicrobienne Et Antioxydante Des Huiles Essentielles De *Rhanterium adpressum* Algérien. Salon de l'Innovation Universitaire. La Direction Générale de la Recherche Scientifique et du Développement Technologique (DGRSDT). *Oran, Algérie (Juin 2012)*.
- I. SIFI, <u>F. ELHOUITI</u>, M. OUINTEN, N. GOURINE, M. YOUSFI. Essential oil of *Pistacia atlantica* Desf. Chemical composition by GC-SM. Mediterranean Conference Natural Products, *Tipaza*, *Algérie* (*Octobre 2011*).
- Ibrahim SIFI, <u>Fatiha ELHOUITI</u>, Nadir GOURINE, Mohamed YOUSFI, Mohamed OUINTEN. Activités antimicrobienne et antioxydante de l'huile essentielles des galles du Pistachier de l'Atlas de l'Algérie (*Pistacia atlantica* desf.). Le 2ème séminaire international sur les plantes médicinales SIPM'2, *Ouargla, Algerie (Avril 2011)*.
- Ibrahim SIFI, <u>Fatiha ELHOUITI</u>, Mohamed YOUSFI, Mohamed OUINTEN. Etude de la résistance des souches bactériennes à Gram ositif contre les huiles essentielles de pistachier de l'Atlas de trois régions de l'Algéries. Colloque International sur la Problématique Multirésistantes aux Antibiotiques et nouvelles Aproches Thérapeutiques, Meknès, Maroc (Octobre 2011).
- Ibrahim SIFI, <u>Fatiha ELHOUITI</u>, Mohamed YOUSFI, Mohamed OUINTEN. Activités antimicrobienne et antioxydante de l'huile essentielles des galles du Pistachier de l'Atlas de l'Algérie (*Pistacia atlantica* desf.). Le 4ème Symposium International Plantes Aromatiques et Médicinales de la plante à la pratique thérapeutique, FST- Mohammedia, Maroc (Mai 2011).

Table des matières

ABREVIATIONS	
LISTE DES TABLEAUX ET DES FIGURES	III
INTRODUCTION	2
I. CONTEXTE BIBLIOGRAPHE	7
I.1 LES HUILES ESSENTIELLES	
I.1.1 L'HISTOIRE ET ORIGINES DES HUILES ESSENTIELLES	8
I.1.2 LA DEFINITION DES HUILES ESSENTIELLES	8
I.1.3 LES CARACTERES PHYSICO-CHIMIQUES DES HUILES ESSENTIELLES	9
I.1.4 LA REPARATION, LA LOCALISATION ET LA FONCTION DES HUILES ESSENTIELLES	10
I.1.4.1 La répartition	10
I.1.4.2 La localisation	10
I.1.4.3 Le rôle	10
I.1.5 LES PROCEDES D'EXTRACTION DES HUILES ESSENTIELLES	11
I.1.5.1 La distillation	11
➤ L'hydrodistillation simple	11
➤ L'entrainement à la vapeur d'eau (distillation à la vapeur saturée)	11
> L'hydrodiffusion	12
➤ L'hydrodistillation par micro-ondes, sous vide	12
I.1.5.2 L'expression à froid	12
I.1.6 LA CONSERVATION DES HUILES ESSENTIELLES	13
I.1.7 LES CRITERES DE QUALITE DES HUILES ESSENTIELLES	13
I.1.7.1 La certification botanique	13
I.1.7.2 L'origine géographique	13
I.1.7.3 Le mode de culture	13
I.1.7.4 Le stade de développement botanique	13
I.1.7.5 L'organe distillé	14
I.1.7.6 La récolte du matériel végétal	14
I.1.7.7 Le mode d'extraction	14
I.1.7.8 Le chémotype ou chimiotype	14
I.1.7.9 L'influence des facteurs extrinsèques :	15
I.1.8 LA COMPOSITION CHIMIQUE DES HUILES ESSENTIELLES	15
I.1.8.1 Les terpénoïdes	16
I.1.8.2 Les composés aromatiques	18
I.1.8.3 Les composés d'origines diverses :	18
I.1.9 LES FACTEURS INFLUENÇANT LA COMPOSITION CHIMIQUE	19
I.1.9.1 Les facteurs intrinsèques	19
I.1.9.2 Les facteurs extrinsèques	19
I.1.10 LES ACTIVITES BIOLOGIQUES DES HUILES ESSENTIELLES	20

I.1.11 L'ACTIVITE ANTIFONGIQUE DES HUILES ESSENTIELLES	22
I.1.12 LE MODE D'ACTION DES HUILES ESSENTIELLES	24
I.1.13 L'effets synergiques des huiles essentielles et leurs composants	26
I.1.14 LA TOXICITE DES HUILES ESSENTIELLES	27
I.2 UNE DESCRIPTION DES ESPECES FONGIQUES	28
I.2.1 DES GENERALITES SUR LES CHAMPIGNONS PHYTOPATHOGENES	28
I.2.2 L'ETUDE DES ESPECES FONGIQUES SELECTIONNEES DU GENRE FUSARIUM	29
I.2.3 LES CARACTERES CULTURAUX GENERAUX	30
I.2.4 LA MORPHOLOGIE MICROSCOPIQUE	30
I.2.5 LES PRINCIPALES ESPECES DE FUSARIUM	31
I.2.5.1Le Fusarium culmorum	31
➤ Les caractères culturaux	31
> La morphologie microscopique	31
I.2.5.2 Le Fusarium graminearum (forme parfaite : Gibberella zeae)	32
➤ Les caractères culturaux	32
➤ La morphologie microscopique	32
I.2.6 L'IMPORTANCE DU GENRE FUSARIUM	33
I.2.6.1 Le potentiel toxinogène	33
I.2.6.2 Le pouvoir pathogène	34
I.3 LESMYCOTOXINES	34
I.3.1 LES CONDITIONS DE TOXINOGENESE	34
I.3.2 LA NATURE ET L'ORIGINE DES MYCOTOXINES	35
I.3.3 LA BIOGENESE DES MYCOTOXINES	35
I.3.4 LA STRUCTURE DES MYCOTOXINES	36
I.3.5 LES PRINCIPALES MYCOTOXINES	37
I.3.5.1 Les mycotoxines sélectionnées (les Trichothécènes)	37
> La contamination des aliments	39
I.3.6 L'effets toxiques des trichothècenes	41
I.3.6.1 Les Trichothécènes du groupe A	41
I.3.6.2 Les Trichothécènes du groupe B	42
II. MATERIELS ET METHODES	45
II.1 LES MATERIELS	45
II.1.1 LE MATERIEL VEGETAL (HUILES ESSENTIELLES TESTEES)	45
II.1.1.1 La description botanique	46
II.1.1.2 La reconstruction phylogénétique	46
II.1.1.3 La classification systmatique de la plante.	47
II.1.1.4 La répartition géographique	47
II.1.1.5 La collecte de la plante	48
II.1.1.6 La Description des localités de collecte	49

II.1.1.7 La conservation de la plante	49
II.1.2 LES COMPOSES CHIMIQUES BIOACTIFS TESTEES (COMPOSANTS D'HUILES ESSEN	TIELLES)50
II.1.2.1 L'α-Pinène et le β-Myrcène	50
II.1.2.2 Le Limonène	50
II.1.2.3 Le Linalool et Le geraniol	51
II.1.3 LES SOUCHES FONGIQUES MYCOTOXINOGENE	51
II.2 LES METHODES EXPERIMENTALES	53
II.2.1 L'EXTRACTION DES HUILES ESSENTIELLES	55
II.2.1.1 Le procédé d'extraction	55
II.2.2 L'ANALYSE CHROMATOGRAPHIQUE	55
II.2.2.1 Les conditions opératoires de la CPG	55
II.2.2.2 Les conditions opératoires de la CG/SM	56
II.2.2.3 L'identification des constituants	56
II.2.3 L'ANALYSE STATISTIQUE MULTIVARIEE	56
II.2.4 L'ETUDE DE L'ACTIVITE ANTIFONGIQUE	56
II.2.4.1 La préparation des souches fongiques	57
II.2.4.2 La préparation des composés bioactifs purs testés	57
II.2.4.3 La cinétique de la croissance fongique sur milieu solide	57
II.2.4.4 L'évaluation de l'activité antifongique sur milieu solide	57
➤ En présence des huiles essentielles pures	57
➤ En présence des composés bioactifs purs	58
En présence d'un mélange des composés purs (les composés en mélange) :	58
II.2.4.5 L'évaluation de l'activité antifongique sur milieu liquide	59
II.2.4.6 La détermination des CMI et CI ₅₀	60
II.2.4.7 L'analyse de la production des mycotoxines TCTB des souches traitées	60
➤ L'extraction des mycotoxines	60
➤ Le dosage des mycotoxines TCTB par UPLC	60
II.2.4.8 La détermination du taux de consommation d'oxygène des souches traitées	dans une culture
liquide (analyse dans un Oxymètre)	61
II.2.4.9 L'étude de l'expression des gènes	61
➤ L'extraction des ARN totaux	61
La Transcription inverse des ARN en ADNc (la RT-PCR)	63
➤ L'analyse par PCR classique	63
➤ L'analyse par PCR quantitative en temps réel	63
L'analyse des résultats après PCR quantitative	65
II.2.4.10 L'analyse statistique	66
III. RESULTATS ET DISCUSSION	68
III.1 LA CINETIQUE D'EXTRACTION ET LA TENEUR EN HUILE	68
III.2 LA RECONSTRUCTION PHYLOGENETIQUE	68
III.3 L'IDENTIFICATION DES CONSTITUANTS DES HUILES ESSENTIFILES	69

III.4	LA VARIABILITE DE LA COMPOSITION CHIMIQUE DES HUILES ESSENTIELLES	75
III.5	LES GROUPES CHIMIQUES DES HUILES ESSENTIELLES DE $\it R$. $\it Adpressum$ (feuilles et fleurs)	76
III.5	5.1 LES RESULTATS DE L'ANALYSE MULTIVARIEE DE LA COMPOSITION CHIMIQUE	77
III.6	LES RESULTATS DES TESTS PRELIMINAIRES DE L'ACTIVITE ANTIFONGIQUE	80
III.7	LA CINETIQUE DE LA CROISSANCE MYCELIENNE SUR MILIEU SOLIDE	82
III.8	LE POUVOIR ANTIFONGIQUE DES HUILES ESSENTIELLES PURES EN MILIEU SOLIDE ET LIQUIDE	84
III.8	$3.1~\mathrm{L'ACTIVITE}$ antifongique des huiles essentielles (feuilles et fleurs) en milieu solide	84
III.8	3.2 L'ACTIVITE ANTIFONGIQUE DES HUILES ESSENTIELLES EN MILIEU LIQUIDE	87
III.9	LE POUVOIR ANTIFONGIQUE COMPOSES BIOACTIFS PURS EN MILIEU SOLIDE ET LIQUIDE	89
III.10	LE POUVOIR ANTIFONGIQUE DES COMPOSES BIOACTIFS EN SYNERGIE SUR MILIEU SOLIDE ET	
	LIQUIDE	93
III.11	LA DETERMINATION DES CMI ET CI50 SUR MILIEU SOLIDE ET LIQUIDE	94
III.1	1.1 LES CMI ET LES CI ₅₀ DES EXTRAITS D'HUILES ESSENTIELLES FEUILLES ET FLEURS	94
III.1	1.2 LES CMI ET LES CI50 DES COMPOSES BIOACTIFS PURS ET DU MELANGE DES COMPOSES BIOACTIFS	95
III.12	2 L'ANALYSE DE LA PRODUCTION DES MYCOTOXINES	97
III.1	2.1 L'effet des huiles essentielles pures sur la production des Trichothecenes de type B	97
III.1	2.2 L'EFFET DES COMPOSES BIOACTIFS PURS SUR LA PRODUCTION DES TRICHOTHECENES TCTB	98
III.13	L'EFFET DES HUILES ESSENTIELLES SUR LA RESPIRATION DES SOUCHES FONGIQUES 1	.00
III.14	L'EXPRESSION DES GENES CLES DE LA BIOSYNTHESE DES TRICHOTHECENES TCTB 1	.03
CON	CLUSION1	08
	ERENCES BIBLIOGRAPHIQUES 1	
ANN	EXES1	32
	LICATIONS1	

Abréviations

Abs : Absorbance

ACP : Analyse Composantes Principales

ADN : Acide désoxyribonucléique

ADNc : ADN complémentaire

ADON : Acétyl-Deoxynivalenol

ARN : Acide ribonucléique

CAH : Classification Ascendante Hiérarchique

CI50 : Concentration Inhibitrice à 50%

CMC : Carboxy Methyl Cellulose

CMI : Concentrations Minimales Inhibitrices

Cp : Crossing point

CPG/SM : Chromatographie en Phase Gazeuse couplé à un Spectromètre de Masse

DAD : Diode Array Detector

DON : Déoxynivalénol

E : Efficacité

F : Feuilles

F. : Fusarium

Fc : Fusarium culmorum

Fg : Fusarium graminearum

FL : Fleurs

H.E.C.T : Huile Essentielle Chémotypée

HE : Huile Essentielle

I (%) : Pourcentage d'inhibition

INRA : Institut National de Recherche Agronomique

IRL : Indice de Rétention Linéaire

MSL : Milieu Synthétique Liquide

MycSA : Mycologie et Sécurité des Aliments

 $ndhF \hspace{1cm} : NADH \ deshydrogenase \ F$

NIV : Nivalenol

Pb : Paire de base

PCR : Polymerase Chain Reaction

PCRq : Polymerase Chain Reaction quantitative

PDA : Potato Dextrose Agar

ppm : Parties par million

Q.s.p. : Quantité Suffisante Pour

R. : Rhanterium

Rest : Relative Expression Software Tool

rpm : Rotation par minute

RT : Reverse Transcription

SD : Standard deviation (Ecart type)

SOD : SuperOxide Dismutase

TCT B : Trichothécènes de Type B

tr : trace (< 0,1 %)

UPLC : Ultra Performance Liquid Chromatography

Listes des tableaux et des figures

Liste des Tableaux

Tableau 1 : La bioactivité de quelques composés des huiles essentielles chez certaines espèces végétales. 21
Tableau 2 : Les Fusarium producteurs des mycotoxines. 33
Tableau 3 : Présence de trichothécènes dans les céréales. 40
Tableau 4 : Présence de trichothécènes dans des produits à base de céréales
Tableau 5 : La situation géographique et l'étage bioclimatique des localités de collecte, selon "Atlas Mondial Microsoft Encarta, 2015". 49
Tableau 6 : Les produits purs testés et leurs principales caractéristiques. 50
Tableau 7 : Codes, origines et Chémotypes des souches fongiques étudiées. 52
Tableau 8 : Gènes étudiés, Amorces utilisées pour amplifier l'ADNc par PCRq en temps réel64
Tableau 9 : La composition chimique des huiles essentielles des parties aériennes (feuilles et fleurs) de R. adpressum. 71
Tableau 10 : La variation des pourcentages des différentes classes chimiques, selon le mois d'extraction, pour les deux extraits (feuilles et fleurs). 75
Tableau 11 : Plantes de la famille des <i>Asteraceae</i> contenant une activité antifongique92
Tableau 12 : les valeurs des CI ₅₀ et des CMI pour différentes concentrations des deux extraits, pour les souches de <i>F. culmorum</i> et <i>F. graminearum</i>
Tableau 13 : Les valeurs des CI ₅₀ et des CMI pour les différents composants bioactifs volatils testés vis-à-vis des souches de <i>F. culmorum</i> (BD17 et T5) et de <i>F. graminearum</i> (INRA 349 et INRA 812), sur les deux milieux (liquide et solide)
Tableau 14 : Vitesses de consommations d'Oxygène en (nmole/seconde) des souches (<i>F. culmorum</i> et <i>F. graminearum</i>), en absence d'HE (Témoin) et en présence d'HE (traités) à différentes concentrations d'huiles essentielles
Tableau 15 : Valeurs des Cp des différents gènes étudiés pour les deux souches. 103

Liste des Figures

Figure 1: Structures de quelques composés terpéniques composant les huiles essentiell	es 17
Figure 2 : Structures de quelques composés aromatique composant les huiles essentielles.	
Figure 3 : Structures de quelques composés d'origines diverses composant les huiles	
Figure 4 : Caractères morphologiques des Fusarium.	30
Figure 5: Le Fusarium culmorum.	32
Figure 6: Le Fusarium graminearum.	32
Figure 7 : Voies de biosynthèse des mycotoxines.	36
Figure 8 : Structure chimique générale des principaux trichothécènes des groupes A et	B38
Figure 9: Photos illustrant Rhanterium adpressum.	46
Figure 10 : Répartition géographique du genre <i>Rhanterium</i> . Carte réalisée avec le log 2.10.1.	-
Figure 11 : Les sites de collectes des échantillons de <i>R. adpressum</i> , En orange (les éch fleurs) ; en vert (les échantillons de feuilles). Carte réalisée avec le logiciel Q	GIS 2.10.1
Figure 12 : Structure chimique des Trichothécènes de type B	53
Figure 13: Organigramme représentant les principales démarches expérimentales de n	
Figure 14: La migration de l'ARN sur gel d'agarose à 2 %	62
Figure 15: Etapes de transcription inverse.	63
Figure 16: Etapes des amplifications de PCR quantitative.	64
Figure 17: L'arbre phylogénétique des plantes sélectionnées, reconstruit par la méthod Joining avec 100 réplications de bootstrap (la longueur des branches est modes branches).	ntrée à côté
Figure 18 : Chromatogramme de l'huile essentielle de <i>Rhanterium adpressum</i> Coss. e utilisant une colonne capillaire HP-5 (a : Feuilles ; b : Fleurs)	
Figure 19 : Quelques facteurs exogènes influençant la variation de la composition chin réalisée avec logiciel Diva-GIS 7.4.01.	
Figure 20 : Diagramme des scores d'ACP représentant la variation de la composition entre les différents échantillons (F : Feuilles ; FL : Fleurs)	
Figure 21 : Dendrogramme des échantillons construit en utilisant la méthode de Ward e euclidienne pour calculer les indices de dissimilarité.	t la distance 78

Figure 22	Effet de l'huile essentielle de <i>Rhanterium adpressum</i> vis-à-vis de souches de <i>Fusarium culmorum</i> (Fc) isolées en Algérie
Figure 23	: La cinétique de la croissance mycélienne des souches de <i>Fusarium culmorum</i> (<i>Fc</i>) isolées en Algérie, en présence de différentes concentrations de l'extrait de feuille. 80
Figure 24	Effet de l'huile essentielle de <i>Rhanterium adpressum</i> vis-à-vis de dix souches INRA de <i>Fusarium culmorum</i> (Fc) et <i>Fusarium graminearum</i> (Fg)
Figure 25	: La cinétique de la croissance mycélienne des souches de <i>Fusarium culmorum</i> (Fc) et <i>Fusarium graminearum</i> (<i>Fg</i>) (collection INRA), en présence de l'extrait de feuille à une concentration de 2µl/ml
Figure 26	: Test préliminaire du pouvoir antifongique de l'huile essentielles de <i>R. adpressum</i> sur les 12 souches du genre <i>Fusarium</i> (deux souches isolées en Algérie BD17 et T5 ; et dix souches de la collection de l'INRA, France)
Figure 27	La cinétique de la croissance mycélienne des quatre souches fongiques, en présence de différentes concentrations des deux extraits (de feuilles : à gauche ; de fleurs : à droite).
Figure 28	L'activité antifongique, sur milieu solide, en présence de différentes concentrations des deux extraits (de feuilles : à gauche ; de fleurs : à droite)
Figure 29	: Exemples de l'effet des huiles essentielles de <i>Rhanterium adpressum</i> , provenant de différents échantillons, sur la croissance de <i>Fusarium culmorum</i> (la souche T5)86
Figure 30	Exemples de l'effet des huiles essentielles des feuilles de <i>Rhanterium adpressum</i> sur la croissance de <i>Fusarium culmorum</i> et <i>Fusarium graminearum</i> à différentes concentrations
Figure 31	: L'activité antifongique sur milieu liquide en présence de différentes concentrations d'huiles essentielles (de feuilles : à gauche ; de fleurs : à droite)
Figure 32	Exemples de l'effet des huiles essentielles des feuilles de <i>Rhanterium adpressum</i> sur la croissance de <i>Fusarium culmorum</i> et <i>Fusarium graminearum</i> , en présence de l'huile essentielle pure, des composés chimiques bioactifs et le mélange de ces composés. 90
Figure 33	Les taux d'inhibition de la croissance fongique des quatre souches, en présence de différentes concentrations des produits volatils bioactifs testés sur les deux milieux (liquide : à gauche ; solide : à la droite)
Figure 34	L'activité des composés chimiques volatils en mélange sur la croissance fongique des souches de <i>F. culmorum</i> (BD17 et T5) et <i>F. graminearum</i> (INRA 349 et INRA 812) sur les deux milieux (liquide, à gauche, et solide, sur la droite)
Figure 35	La production des TCTB en μg/mg de mycélium par les souches de <i>F. culmorum</i> et de <i>F. graminearum</i> , en absence d'HE (témoin) et dans le traitement avec 0,25 μl/ml d'huiles essentielles des feuilles (à gauche) et de fleurs (à la droite)98
Figure 36	La production des mycotoxines TCTB en μg/mg de mycélium par les souches de <i>F. culmorum</i> et de <i>F. graminearum</i> en présence des composants bioactifs volatils et de l'HE à une concentration de 0,25 μl/ml99

Figure 37:	Evolution de la concentration en dioxygène (nmol/ml), en présence de l'huile essentielle de <i>R. adpressum</i> , dans 2 ml de milieu de culture, des champignons INRA 812 et INRA 349
Figure 38	Evolution de la concentration en dioxygène (nmol/ml), en présence de l'huile essentielle de <i>R. adpressum</i> , dans 2 ml de milieu de culture, des champignons T5 et BD17 101
Figure 39	: Modulation de l'expression génétique de quelque gènes Tri et Mnsod chez <i>Fusarium culmorum</i> et <i>Fusarium graminearum</i> en présence de l'huile essentielle de <i>R. adpressum</i> .
Figure 40	Expression des gènes en culture additionnées d'huile essentielle, en comparaison avec une culture témoin. (A) Expression des gènes (rapport d'expression traité/non traité à l'échelle Log 2) chez F . $culmorum$ (BD17). (B) Expression des gènes (rapport d'expression traité/non traité à l'échelle Log 2) chez F . $graminearum$ (INRA 349). L'étoile (*) indique une différence significative pour la culture traitée par rapport au témoin ($p < 0.05$)
Figures A	nnesxes
Figure 41	: Quantification des ARN (vérification de leur qualité)
Figure 42	: Quantification des ADN (vérification de leur qualité)
Figure 43	: Profils chromatographiques de l'inhibition des TCTB (DON/3ADON) chez <i>F. culmorum</i> (BD17 et T5) respectivement par les huiles essentielles des Feuilles du <i>R. adpressum</i> obtenus par UPLC (Spectre noire : Témoin, Spectre Rose : Traité) 141
Figure 44	Profils chromatographiques de l'inhibition des TCTB (DON/3ADON et NIV/FX) chez F. culmorum (BD17 et T5) respectivement par les huiles essentielles des Fleurs du R. adpressum obtenus par UPLC (Spectre noire : Témoin, Spectre Rose : Traité)142
Figure 45	: Profils chromatographiques de l'inhibition des TCTB (DON/15ADON) chez <i>F. graminearum</i> (349 et 812) respectivement par les huiles essentielles des Feuilles du <i>R. adpressum</i> obtenus par UPLC (Spectre noire : Témoin, Spectre Rose : Traité)143
Figure 46	: Profils chromatographiques de l'inhibition des TCTB (DON/15ADON) chez <i>F. graminearum</i> (349 et 812) respectivement par les huiles essentielles des Fleurs du <i>R. adpressum</i> obtenus par UPLC (Spectre noire : Témoin, Spectre Rose : Traité) 144

Introduction

Introduction

Les plantes produisent des substances naturelles très diversifiées. En effet, parallèlement aux métabolites primaires, elles accumulent des métabolites dits secondaires parmi lesquels, les huiles essentielles, très utilisées par l'homme dans différents domaines, en particulier à intérêt pharmaceutique, cosmétique, agroalimentaire et nutritionnel.

Les pertes agricoles dues aux agents phytopathogènes sont enregistrées dans le monde entier ; principalement sur les champs de cultures et durant le stockage des graines ; ce qui représente un sérieux problèmes socio-économiques. Un nombre important de maladies affectant les plantes sont d'origine fongique. Parmi celles-ci, et une maladie la plus dommageable, on note "la Fusariose des Céréales". Certaines de ces maladies sont répandues dans les céréales à petits grains comme le blé, l'orge, l'avoine et le maïs. Elles provoquent des nécroses sur les différentes parties végétatives de la plante affectée ; ce qui engendre des pertes importantes, de qualité et de rendement, et peut conduire à la perte de toute la culture (Pirgozliev *et al.*, 2003 ; Boutigny, 2007).

Partout dans le monde, le blé et le maïs constituent des céréales d'importance primordiale, comme source de revenus et comme ressource dans l'alimentation humaine. Cependant, la délicatesse de leur conservation après la récolte nécessite la mise en place d'un système de contrôle des populations d'agents déprédateurs tels que le *Fusarium graminearum* le *Fusarium culmorum*, des champignons producteurs de mycotoxines (Goswami et Kistler, 2004; Boutigny, 2007). Une telle action est obtenue par l'application de biopesticides, tout en favorisant des conditions environnementales inadéquates à la croissance et au développement de ces agents déprédateurs.

En effet, le maintien de la qualité des grains concerne un double enjeu, économique et sanitaire (augmenter les rendements, améliorer l'aspect des grains, empêcher la contamination des semences, éviter la production de mycotoxines et conserver la qualité nutritionnelle) (Bhat *et al.*, 2010; Anses, 2009).

Les fongicides synthétiques sont très répandus, du fait de leur coût, peu élevé, de la facilité de leur mise en œuvre et de leur rémanence. Néanmoins, pour diverses raisons, certains pesticides synthétiques sont interdits : (i) l'utilisation répétée et systématique laisse des résidus dans les graines et développent la résistance des agents pathogènes (Heimbach *et al.*, 2002) ; (ii) leur toxicité pour l'applicateur et le consommateur ainsi que les contaminations de l'environnement (Leroux, 2003).

Ainsi, de nouvelles lois, adoptées, ont réduit le nombre de pesticides synthétiques utilisables dans l'agriculture (Dayan *et al.*, 2009). Une des raisons majeures ayant conduit à l'adoption de lois strictes, est leurs retombées sur la santé humaine ; on leur attribue les degrés élevés de toxicité et des effets cancérogènes (Aoudou *et al.*, 2010 ; Ash, 2010).

Ces prohibitions ont ouvert la voie à la recherche et à la future adoption de méthodes de lutte, alternatives, basées sur l'utilisation de composés naturels d'origine végétale (huiles essentielles et dérivées) (Cowan *et al.*, 1999 ; EFSA, 2013 ; Gil et Sinfort, 2005 ; Magro *et al.*, 2006).

De nouveaux pesticides sont, régulièrement, découverts et/ou développés (Tripathi et Dubey, 2004). L'intérêt pour ces pesticides, d'origines végétale, grandit ; en particulier pour ceux qui préservent un environnement sain, sont biodégradables, non toxiques et spécifiques (Tripathi et Dubey, 2004). Ils sont également nécessaires pour contourner le phénomène du développement de la résistance aux pesticides (Isman ,2000 ; Ishii, 2006 ; Laplace, 2006).

De nombreuse recherches ont appuyé la possibilité de l'emploi de nouveaux composés naturels pouvant agir comme biofongicides (Field *et al.*, 2006 ; Lee, 2007 ; Regnault-Roger, 2012 ; Kassi *et al.*, 2014 ; Xue *et al.*, 2014).

Au cours de ces dernières années, il y a eu un intérêt croissant pour l'utilisation de substances naturelles en raison de leur disponibilité, moins d'effets secondaires ou de toxicité ainsi qu'une meilleure biodégradabilité, comparées aux produits chimiques utilisés dans la lutter contre les agents responsables de la fusariose.

Des questions, incriminant l'insécurité sanitaire et environnementale, résultant de l'utilisation des composés synthétiques, ont dicté la nécessité d'entamer des études plus détaillées pour mettre en évidence et évaluer l'action des huiles essentielles, produits odorants et volatils du métabolisme secondaire d'origine naturelle. Ces biomolécules sont présentes dans les différentes parties végétatives des plantes (fleurs, feuilles, tiges et racines). La disponibilité et l'innocuité de ces substances naturelles, présentant de larges spectres d'action vis-à-vis d'un grand nombre d'espèces fongiques (Broydé et Doré, 2013), justifient les recherches, actuellement, menées dans ce domaine et qui tendent à mettre au point de nouvelles méthodes de lutte moins nuisibles.

L'exploitation des huiles essentielles dans la protection des végétaux est encore dans ses débuts, mais ces produits ont un potentiel fongicide prometteur pour le remplacement des fongicides de synthèse. Des biofongicides à base d'huiles essentielles sont mis sur le marché pour les agriculteurs pratiquant l'agriculture biologique. Il s'agit du SporanTM (*Rosemarinus officianalis*), PromaxTM (*Thymus vulgaris*), TrilogyTM (*Acalypha indica*) et E-RaseTM (*Simmondsia californica*) (Isman *et al.*, 2011).

Le besoin d'une méthode pour la détection rapidement, *in vitro*, des molécules naturelles antifongiques a été développée et mise au point dans les laboratoire MYCSA (INRA Farance), en s'inspirant d'études réalisées sur des levures (Liu *et al.*, 2007). Par la suite, des molécules ont été choisies pour l'évaluation de leur efficacité.

L'Algérie offre un potentiel naturel, important, peu exploré. Dans les études de ressources naturelles, plusieurs substances végétales intéressantes ont été mises en évidence. Elles se sont révélées adéquates pour notre recherche. C'est pour cela que nous nous sommes intéressés à étudier une plante de la famille des *Asteraceae*, communément appelée *Aarfedj*, poussant à l'état spontané dans différentes régions du sud Algérien (Chehma, 2006).

Cette étude est une contribution à la valorisation et à la caractérisation des huiles essentielles du *Rhanterium adpressum*. Elle a été consacrée à l'étude les constituants chimiques des huiles essentielle de la plante (fleurs et feuilles), d'une part, et à la mise en évidence de l'activité antifongique et de l'activité antimycotoxinogène des huiles essentielles, d'autre part. De plus, nous nous avons testé certains composants bioactifs que nous avons utilisé comme référence d'évaluation de nos huiles essentielles.

D'après nos investigations, dans la littérature scientifique, peu d'études consacrées aux métabolites secondaires ont été mentionnées sur *Rhanterium* (Bouheroum *et al.*, 2007, Hamia *et al.*, 2013, Kala *et al.* 2009). Le *Rhanterium adpressum*, collecté en Algérie, a déjà fait l'objet d'études de la composition chimique (Kala *et al.*, 2009) et quelques composés ont été isolés (Bouheroum *et al.*, 2007). Par ailleurs, Hamia *et al.*, (2013) ont étudié l'effet antioxydant de l'huile essentielle et des extraits d'acides gras des feuilles de la plante. En 2014, Boussoussa et *al.*, ont étudié le potentiel antimicrobien et antioxydant des extraits organiques des fleurs de *R. adpressum*. Dans d'autres travaux, les huiles essentielles de *R. adpressum*, extraites par hydrodistillation, ont montré une activité antifongique contre *Fusarium oxysporum* (Elhouiti, 2010; Elhouiti *et al.*, 2016).

Sur la base de travaux antérieurs (Cowan *et al.*, 1999 ; EFSA, 2013 ; Magro *et al.*, 2006), consacrés à l'utilisation des substances naturelles dans la lutte contre les moisissures des céréales stockées, nous avons développé notre thème de recherche qui se structure comme suit :

La première partie de cette thèse est consacrée aux concepts généraux regroupant les informations essentielles pour cette étude.

La partie pratique, la deuxième, révèle la démarche expérimentale. Elle est constituée de quatre volets :

- ✓ Dans un premier temps, nous avons procédé aux extractions des huiles essentielles et une analyse CG/SM a été réalisée pour l'étude de la variabilité chimique ;
- ✓ Dans le second volet, nous avons évalué la cinétique de la croissance fongique et le pouvoir antifongique vis-à-vis de souches mycotoxinogènes du genre *Fusarium*, en utilisant la méthode de contact direct en milieux solide et liquide ;
- ✓ Dans le troisième volet, le pouvoir antimycotoxinogène a été évalué, en milieu liquide, par UPLC. L'inhibition des mycotoxines a été testée sur des souches fongiques productrices de Trichothécènes de type B;
- ✓ Dans le dernier volet, nous nous sommes intéressés à l'effet des HE de *R. adpressum* sur la transcription et la modulation de l'expression génétique des gènes clés de la biosynthèse des Trichothécènes de type B.

La troisième partie de cette thèse est consacrée à la présentation de l'ensemble des résultats obtenus et aux discussions qui en découlent.

Nous terminerons ce manuscrit par une conclusion et des perspectives de recherche.

Contexte Bibliographique

I. Contexte bibliographe

Tous les êtres vivants ont un métabolisme primaire qui fournit les molécules de base (acides nucléiques, lipides, protéines, acides aminés et glucides). Les plantes produisent, en plus, un grand nombre de composés qui ne sont pas issus directement de la photosynthèse, mais résultent des réactions chimiques ultérieures. Ces composés sont appelés métabolites secondaires. Ce sont des molécules ayant une répartition limitée dans l'organisme de la plante. Ils y jouent différents rôles, dont celui de la défense contre les agressions externes. Ces métabolites ne sont pas toujours nécessaires à la survie de la plante.

Les produits du métabolisme secondaire sont en très grand nombre. Plus de 200.000 structures ont été définies (Hartmann, 2007). Ils sont d'une variété structurale extraordinaire mais sont produits en faible quantité. Ces molécules marquent, de manière originale, une espèce, un genre ou une famille de plantes et permettent, parfois, d'établir une taxonomie chimique. Les composés phénoliques, les terpénoïdes, les stéroïdes et les alcaloïdes sont des exemples de métabolites secondaires ; ils ont de nombreuses applications pharmaceutiques.

De nos jours, un grand nombre de ces composés sont utilisés en médecine moderne et, une majorité, en médecine traditionnelle. Les huiles essentielles possèdent de nombreuses activités biologiques. Dans les domaines phytosanitaires et agro-alimentaires. Les huiles essentielles ou leurs composés actifs pourraient, également, être utilisés comme agents de protection contre les champignons phytopathogènes et les microorganismes déprédateurs, envahissant les denrées alimentaires.

I.1 Les huiles essentielles

Les huiles essentielles végétales constituent une source potentielle de molécules antimicrobiennes d'origine naturelle. Les huiles essentielles et les extraits obtenus à partir de nombreuses plantes ont récemment acquis une grande popularité et un intérêt scientifique grandissant. La demande de conservateurs naturels a augmenté, pendant que sécurité des additifs chimiques a été, de plus en plus, remise en question. L'huile végétale aurait des propriétés antibactériennes, antifongiques, antivirales, antiparasitaires et antidermatophytiques. Elles sont, maintenant, considérées comme une source précieuse de produits naturels pour le développement de médicaments contre diverses maladies et, également, pour le développement de produits industriels (Tabassum et Vidyasagar, 2013).

I.1.1 L'histoire et origines des huiles essentielles

Les premières traces de la fabrication et de l'utilisation des huiles essentielles datent de l'an 3000 avant J.C. (Baser et Buchbauer, 2010). Les huiles essentielles semblent donc avoir accompagné la civilisation humaine, depuis ses premières genèses.

Reconnues pour leurs puissantes propriétés thérapeutiques et utilisées depuis plusieurs millénaires en Chine (cannelle, anis, gingembre), en Inde, au Moyen Orient (khella, pin, fenouil), en Egypte, en Grèce, en Amérique (Aztèques, Mayas, Incas : bois de Hô, sassafras) et en Afrique (Encens, Myrrhe et Ravensare), les huiles essentielles tombent dans l'oubli au Moyen-Age. A ce moment-là, l'Europe connaît un retour à la barbarie, avec un déclin général du savoir. Il faudra attendre l'arrivée des musulmans, pour assister à un nouvel essor de la médecine par les plantes qui retrouve alors une place de choix dans l'arsenal thérapeutique de l'époque.

Au début du XXème siècle, des chercheurs (Chamberland, Cadéac, Martindale) démontrent, par leurs expérimentations, le pouvoir antiseptique des huiles essentielles. Cependant, les véritables "pères" de l'aromathérapie sont Gattefossé puis Valnet. Ils ont mené de nombreux travaux concernant les huiles essentielles, notamment leurs propriétés ; ces résultats seront à l'origine de nombreuses autres recherches (Besombes, 2008).

Aujourd'hui, plusieurs chercheurs, médecins et pharmaciens (P. Franchomme, Valnet, Duraffourd, Lapraz, d'Hervincourt, Belaiche, D. Baudoux) ont définitivement établi la réputation, l'efficacité et l'extraordinaire richesse des huiles essentielles (Zhiri et Baudoux, 2005).

À l'heure actuelle, plus de 3000 huiles essentielles sont connues. Près de trois cents d'entreelles sont commercialisées dans les industries pharmaceutique, agronomique, alimentaire, sanitaire, et cosmétiques (Bakkali *et al.*, 2008).

I.1.2 La définition des huiles essentielles

Les huiles essentielles sont des liquides huileux hydrophobes constitués de concentrés aromatiques volatils obtenus à partir de diverses parties de plantes telles que les fleurs, les bourgeons, les graines, les feuilles, les brindilles, les écorces, le bois, les fruits et les racines. (Sumonrat, 2008). Elles possèdent une valeur olfactive et gustative fortement aromatique. Elles sont obtenues par distillation ou par extraction chimique, par des solvants (eau, alcool ou autre).

Pour la Pharmacopée européenne (6^e édition), l'huile essentielle est un produit odorant, généralement de composition complexe, obtenu à partir d'une matière première végétale botaniquement définie. Le plus souvent, elle est séparée de la phase aqueuse par un procédé physique n'entraînant pas de changement significatif dans sa composition.

La norme AFNOR NF T 75-006 définit l'huile essentielle comme : "un produit obtenu à partir d'une matière première végétale, soit par entraînement à la vapeur d'eau, soit par hydrodistillation. L'huile essentielle est séparée de la phase aqueuse par des procédés physiques". Les huiles essentielles sont responsables de l'odeur caractéristique de la plante (Afnor,1989 ; Bruneton, 2009).

Une certaine ambigüité existe sur la dénomination "huile essentielle". Le terme utilisé, selon AFNOR, est "essence" alors que celui utilisé par la Pharmacopée française et la Pharmacopée européenne est "huile essentielle"; le même retenu par les spécialistes en pharmacognosie (Bruneton, 2009). La quantité d'HE contenue dans les plantes est souvent faible, parfois très faible, voire infime; ce qui explique leur coût élevé. Notons qu'il faut parfois plusieurs tonnes de plantes pour obtenir un litre d'huile essentielle.

Les constituants principaux des huiles essentielles sont les monoterpènes et les sesquiterpènes, notamment les glucides, les phénols, les alcools, les éthers, les aldéhydes et les cétones, responsables de l'activité biologique ainsi que de leur parfum. Les composés phénoliques présents dans les huiles essentielles ont également été reconnus comme composants bioactifs antimicrobiens (Sumonrat, 2008).

I.1.3 Les caractères physico-chimiques des Huiles essentielles

Les huiles essentielles forment un groupe très homogène (Bruneton, 2009; Bernard, 1988). Les principales caractéristiques sont :

- ✓ Liquides, à température ambiante ;
- ✓ N'ont pas le toucher gras et onctueux des huiles fixes ;
- ✓ Volatiles et très rarement colorées ;
- ✓ De densité faible, pour les huiles essentielles à forte teneur en monoterpènes ;
- ✓ L'indice de réfraction varie essentiellement avec la teneur en monoterpènes et en dérivés oxygénés. Une forte teneur en monoterpènes donnera un indice élevé, alors qu'une teneur élevée en dérivés oxygénés produira l'effet inverse ;
- ✓ Solubles dans les alcools, à titre alcoométrique élevé, et dans la plupart des solvants organiques mais peu solubles dans l'eau;
- ✓ Dotées d'un pouvoir rotatoire car elles sont formées principalement de composés asymétriques;
- ✓ Très altérables, sensibles à l'oxydation et ont tendance à se polymériser donnant lieu à la formation de produits résineux. C'est pour cela qu'il convient de les conserver à l'abri de la lumière et de l'air.

I.1.4 La réparation, la localisation et la fonction des huiles essentielles

I.1.4.1 La répartition

Les huiles essentielles n'existent quasiment que chez les végétaux supérieurs : il y aurait 17500 espèces aromatiques. Les genres capables d'élaborer les constituants qui composent les huiles essentielles sont répartis dans cartaines de familles (Apiaceae, Asteraceae, Lamiaceae, Lauraceae, Myrtaceae, Rutaceae, Poaceae, par exemple). Les huiles essentielles peuvent être stockées dans tous les organes végétaux. On en trouve dans les fleurs (bergamotier, tubéreuse), les feuilles (citronnelle, eucalyptus, laurier noble) et, plus rarement, dans l'écorce (cannelier), le bois (bois de rose, santal), les racines (vétiver), les rhizomes (curcuma, gingembre), les fruits (toute-épice, anis, badiane) et les graines (muscade) (Bruneton, 2009).

Si tous les organes d'une même espèce peuvent renfermer une huile essentielle, la composition de cette dernière peut varier selon sa localisation. Ainsi, dans le cas de l'oranger amer (Citrus aurantium L ssp. Aurantium; Rutaceae), le "zeste", c'est-à-dire le péricarpe frais du fruit, fournit l'huile essentielle d'orange amère ou "essence de Curaçao"; la fleur, quant à elle, fournit "l'essence de Néroli"; l'hydrodistillation de la feuille, des ramilles et des petits fruits produit "l'essence des petites graines du Bigaradier".

La composition de ces trois huiles essentielles est différente. Quantitativement, les teneurs en huile essentielle sont plutôt faibles. Assez souvent, inférieures à 10 ml/kg. Des teneurs fortes, comme celle du bouton floral du giroflier (150 ml/kg et plus, dans le produit sec), sont exceptionnelles.

I.1.4.2 La localisation

La synthèse et l'accumulation des huiles essentielles sont généralement associées à la présence de structures histologiques spécialisées, souvent, localisées sur ou à proximité de la surface de la plante : cellules à huiles essentielles, des Lauraceae ou des Zingiberaceae, poils sécréteurs, des Lamiaceae, poches sécrétrices, des Myrtaceae ou des Rutaceae, et canaux sécréteurs, des Asteraceae ou des Apiaceae (Bruneton, 2009). Dans certaines plantes, l'essence est produite par des tissus sécréteurs. Dans d'autres, elle se trouve en liaison glucosidique à l'intérieur des tissus et ne se manifeste que lorsqu'on froisse, écrase, sèche ou distille la plante (Schauemberg et Paris, 2010).

I.1.4.3 Le rôle

La fonction biologique des terpénoïdes des huiles essentielles demeure, le plus souvent, obscure.

Quant aux huiles essentielles, leurs fonctions possibles sont multiples :

- ✓ La protection contre les déprédateurs et les parasites (insectes, champignons, bactéries ...etc.);
- ✓ L'attraction des insectes pollinisateurs ;
- ✓ L'inhibition de la germination et de la croissance ;
- ✓ L'inhibition de la multiplication des bactéries et des champignons dont les mécanismes sont souvent difficles à cerner (Richter, 1993). Pour quelques auteurs, les composants terpéniques pourraient constituer des supports à une "communication", d'autant plus que leur variété structurale permet le transfert de "messages biologiques" sélectifs (Bruneton, 2009).

I.1.5 Les procédés d'extraction des huiles essentielles

L'extraction des composés aromatiques est réalisée en utilisant divers procédés. Ces derniers ont un impact, certain, sur leurs qualités et leurs applications thérapeutiques. En effet, la localisation histologique des composés aromatiques, dans le végétal, ainsi que la destination finale du produit extrait peuvent orienter le choix technologique. Les méthodes d'extraction sont adaptées aux propriétés les plus importantes des huiles essentielles (leur volatilité dans l'air, dans la vapeur d'eau ainsi que leur solubilité dans les solvants organiques).

I.1.5.1 La distillation

La distillation est la méthode la plus employée pour extraire les huiles essentielles. Ce procédé se base sur le fait que les composants odorants volatils, contenus dans le végétal, sont entrainés par des aérosols de vapeur, à cause de leur point d'ébullition, relativement bas, et de leur caractère hydrophobe (ils ne sont ni retenus, ni solubilisés dans l'eau).

L'hydrodistillation simple

Le matériel végétal (intact ou éventuellement broyé) est immergé directement, dans un alambic rempli d'eau et porté à ébullition. Les vapeurs hétérogènes sont condensées, refroidies, sur une surface froide, puis décantées. Par la suite, l'huile essentielle est séparée par différence de densité (Bruneton, 2009 ; Verdan, 2002).

L'entrainement à la vapeur d'eau (distillation à la vapeur saturée)

Le matériel végétal n'est pas en contact avec l'eau. La vapeur d'eau est pulsée à travers la masse végétale, disposée sur des plaques perforées. Les cellules se relâchent et les particules d'huile se libèrent. Ces dernières sont alors vaporisées et condensées dans un serpentin réfrigéré. La récupération de l'huile essentielle se fait par la même procédure que dans l'hydrodistillation.

Ce procédé a été mis au point de façon à éviter l'hydrolyse des composants de l'huile essentielle ainsi que certaines altérations chimiques pouvant altérer le résultat (Bruneton, 2009; Lahlou, 2004; Verdan, 2002).

> L'hydrodiffusion

Elle consiste à pulser de la vapeur d'eau, à très faible pression (entre 0,02-0,15 Bar), du haut vers le bas, à travers la masse végétale. Les composés obtenus par cette méthode sont qualitativement différents de ceux obtenus par la méthode classique. Ce procédé permet un gain de temps et d'énergie (Bruneton, 2009; Buchbauer, 2000 *in* Lahlou, 2004).

➤ L'hydrodistillation par micro-ondes, sous vide

Une nouvelle technique, récemment développée, est rapportées par plusieurs auteurs. Elle permet d'extraire les huiles essentielles en un temps court et avec un rendement, relativement, élevé (Paré et al., 1989 ; Collin et al., 1991 ; Bouzid et al., 1997 ; Brosseau, 1997 ; Chiasson et al., 2001 ; Ghoulami et al., 2001 in Lahlou, 2004). Ce Procédé, très rapide et consommant peu d'énergie et d'eau, consiste à chauffer sélectivement la plante par un rayonnement micro-ondes, dans une enceinte dont la pression est réduite, de façon séquentielle ; le produit obtenu est de qualité supérieure à celle du produit de l'hydrodistillation traditionnelle (Bruneton, 2009).

Microwave assisted process ou *MAP* utilise des micro-ondes pour exciter les molécules d'eau présentes dans les tissus de la plante, en causant la rupture des cellules et la libération des huiles essentielles piégées (Bélanger *et al.*, 1991 *in* Lahlou, 2004).

I.1.5.2 L'expression à froid

L'extraction par expression est un procédé très simple. Il est souvent utilisé pour extraire les huiles essentielles à partir de fruits très riches en ces substances (le citron, l'orange et la mandarine). Son principe consiste à rompre, mécaniquement, les poches à essences. L'huile essentielle est séparée par décantation ou centrifugation. Certaines machines brisent les poches, par dépression, et recueillent directement l'huile essentielle ; ce qui évite les dégradations liées à l'action de l'eau. Dans ce cas, le terme "essence" est utilisé, plutôt que "huile essentielle" (Buronzo, 2008).

I.1.6 La conservation des huiles essentielles

Les molécules constituant les huiles essentielles sont instables. Leur conservation est difficile et les possibilités de dégradation sont nombreuses. Ainsi, les propriétés du produit sont, aisément, modifiées. Pour éviter l'altération, on utilise des flacons, propres et secs, en aluminium, en acier inoxydables ou en verre teinté antiactinique, et pour éviter le l'évaporation, ces tubes sont presque entièrement remplis et scellés.

La conservation des flacons se fait à une température comprise entre 5°C à 35°C. Les huiles essentielles pures et naturelles se conserveront, ainsi, pendant plusieurs années ; au moins 5 ans. Il est à noter que certaines huiles, telles que les essences de *Citrus*, se conservent moins (Bruneton, 2009 ; Zhiri et Baudoux, 2005).

I.1.7 Les critères de qualité des huiles essentielles

Les huiles essentielles sont des produits naturels qui permettent une revitalisation intense de l'organisme. L'obtention d'une huile essentielle de qualité thérapeutique se révèle être un processus particulièrement délicat ; elle doit impérativement répondre à de nombreux critères de qualité :

I.1.7.1 La certification botanique

L'appellation de la plante doit préciser le genre, l'espèce, la sous-espèce et le cultivar ou écotype afin d'éviter toute erreur liée à l'utilisation des noms vernaculaires. Par exemple, *Aniba rosaeodora* var. *amazonica* et *Helichrysum italicum* ssp. *Serotinum* (Zhiri et Baudoux, 2005).

I.1.7.2 L'origine géographique

Le nom du pays ou d'une région apporte des précisions intéressantes sur le biotope (climat, sol ...etc.) de la plante aromatique et caractérisera sa composition biochimique pouvant être particulière (Zhiri et Baudoux, 2005).

I.1.7.3 Le mode de culture

Cette précision nous informe si la plante est sauvage ou cultivée, issue d'une culture biologique ou non (Zhiri et Baudoux, 2005). Les plantes ne doivent pas avoir été cultivées avec des engrais chimiques, des pesticides ou des herbicides.

I.1.7.4 Le stade de développement botanique

Les caractéristiques des chémotypes proviennent d'un certain nombre de facteurs tels que le stade de développement de la plante échantillonée (avant, pendant ou après la floraison) du moment de la collecte dans la journée (jour ou nuit), l'emlacement de la plante dans les shamps (en plein soleil ou à l'ombre).

Des variations pouvant se produire au cours du cycle végétal affecteraient la qualité et la quantité des huile essentielle (Garnéro, 1991; Zhiri et Baudoux, 2005).

I.1.7.5 L'organe distillé

La composition biochimique des huiles essentielles chémotypées varie en fonction de la partie ou organe de la plante distillée (Zhiri et Baudoux, 2005). Ainsi, l'organe à cueillir, racine, feuille ou tige, dépend de la molécule recherchée.

I.1.7.6 La récolte du matériel végétal

Le ramassage du matériel végétal pose, très souvent, le problème de la contamination par d'autres espèces végétales. Notamment par des plantes à croissance rapide ou partageant les même biotopes (Garnéro, 1976; Garnéro, 1991).

I.1.7.7 Le mode d'extraction

La composition des huiles essentielles peut varier, selon le mode d'extraction utilisé (distillation, hydrodistillation ou expression). La fragilité des constituants des huiles essentielles explique la différence entre la composition du produit obtenu, par hydrodistillation, et celle du mélange initialement présent dans les organes sécréteurs du végétal.

Au cours de l'hydrodistillation, l'eau, l'acidité et la température peuvent provoquer l'hydrolyse des esters mais, aussi, des réarrangements, des isomérisations, des racémisations et des oxydations.

Il est à noter que, l'état de la matière première compte, aussi, parmi les facteurs agissant sur la composition. Ainsi, chez certaines Lamiaceae, un stockage de 24 heures suffit pour obtenir des changements remarquables de la composition. Il faudrait, enfin, signaler que la cinétique de la distillation n'est pas la même pour tous les constituants d'une HE (carbures, alcools, cétones, ...etc.) et que la composition du distillat varie en fonction du temps (Bruneton, 2009).

I.1.7.8 Le chémotype ou chimiotype

Les techniques d'analyse chimique très performantes, actuellement mises à la disposition des chercheurs (chromatographies CCM, CCC, CPG, spectroscopie de masse SM, résonance magnétique RMN), permettent d'avoir une connaissance plus approfondie des structures moléculaires présentes dans les huiles essentielles.

Ainsi, il a été établi qu'une huile essentielle contient des corps chimiques très complexes. Il s'agit de divers assemblages moléculaires, ayant chacun ses propriétés. La nécessité d'une connaissance approfondie de ces constituants chimiques est fondamentale.

Dans certaines situations, au sein d'une même espèce botanique, cette variation chimique permet de définir des sous-espèces, des variétés, des cultivars et des taxons de plantes aromatiques. Cette variation chimique génère la notion de : chemotype ou race chimique, une notion capitale en aromathérapie. C'est une forme de classification chimique, biologique et botanique, désignant la molécule majoritairement présente dans une huile essentielle.

Cette classification dépend des facteurs liés directement aux conditions de vie spécifiques de la plante (le pays, le climat, le sol, l'exposition des végétaux, les facteurs phytosociologiques et la période de récolte) pouvant influencer la composition de l'huile essentielle. On parle, dans ce cas, d'une Huile Essentielle Chémotypée "H.E.C.T" (Zhiri et Baudoux, 2005).

I.1.7.9 L'influence des facteurs extrinsèques :

Il s'agit ici de l'incidence des pratiques culturales (l'apport d'engrais et l'influence des variations N, P, K, régime hydrique) et des facteurs de l'environnement (la température, l'humidité relative, la photopériode et le régime de vents). Ceci est plus marquant chez les espèces ayant des structures histologiques de stockage superficielles (Les poils sécréteurs des Lamiaceae, par exemple). Lorsque la localisation de ces structures est plus profonde, la qualité est beaucoup plus stable (Bruneton, 2009). Ainsi les facteurs géographiques et édaphiques exercent une influence capitale (Garnéro, 1991).

I.1.8 La composition chimique des huiles essentielles

L'étude de la composition chimique des huiles essentielles a révélé qu'il s'agit de mélanges complexes et variables de constituants. Ces derniers, de façon quasi exclusive, appartiennent à deux groupes caractérisés par des origines biogénétiques distinctes : le groupe des terpénoïdes, d'une part, et le groupe, beaucoup moins fréquents, des composés aromatiques dérivés du phénylpropane, d'autre part. Les huiles essentielles peuvent également renfermer divers produits issus de processus de dégradation mettant en jeu des constituants non volatils (Bruneton, 2009).

En général, une HE est un mélange d'hydrocarbures terpéniques et de leurs dérivées oxygénées. Parmi ces composés oxygénés, on peut noter la présence d'alcools (Linalol, Géraniol...), d'esters (Salicylate de méthyl, acétate de géranyle...), d'aldéhydes (Citronellal, Néral...), de cétones (Jasmone, Damascénone...), de Phénols (Thymol, Carvacrol...) et d'étheroxydes (Linalolyl-oxyde...). D'autres constituants, tels que les composés azotés, soufrés et halogénés peuvent avoir un rôle important au niveau de l'odeur ou la flaveur.

I.1.8.1 Les terpénoïdes

Dans le cas des huiles essentielles, seuls seront rencontrés les terpènes les plus volatils, c'est- à- dire ceux dont la masse moléculaire n'est pas trop élevée : mono- et sesquiterpènes (Bruneton, 2009). Les diterpènes ont, aussi, un point d'ébullition peu élevé, déterminant leur caractère volatil (Richter, 1993). Les terpènes sont des hydrocarbures de structures cycliques, très diverses (monocyclique, bicycliques ...etc.), formées d'unités isopréniques (C₅H₈)_{n.} Suivant les valeurs de n, on distingue les hémiterpènes (n = 1), les monoterpènes (n=2), les sesquiterpènes (n=3), les diterpène (n=4), les triterpènes (n=6), les tétraterpènes (n=8) et les polyterpènes (n>8) (Figure 1)

\triangleright Les monoterpènes (C₁₀H₁₆)

Ils sont, presque toujours, présents dans les plantes. Ils sont issus du couplage de deux unités « isopréniques ». Ils peuvent être acyclique (Myrcène) monocyclique (Limonène) ou bicycliques (Pinènes, Camphène). Ils constituent, parfois, plus de 90 % de l'huile essentielle, notamment chez les citrus. La réactivité des cations intermédiaires justifie l'existence de nombreuses molécules fonctionnelles : alcool, aldéhydes, ester, cétones, etc.

➤ Les sesquiterpènes (C₁₅H₂₄)

Ils comprennent trois motifs isoprène. Tels que les monoterpènes, ils présentent une très grande variété de structures (plus d'une centaine de squelettes différents ont été décrits). Avec une fréquence, relativement, élevée pour les, carbures, alcools et cétones.

➤ Les diterpènes (C₂₀H₃₂)

Ces composés, à point d'ébullition élevé, se rencontrent surtout dans les résines.

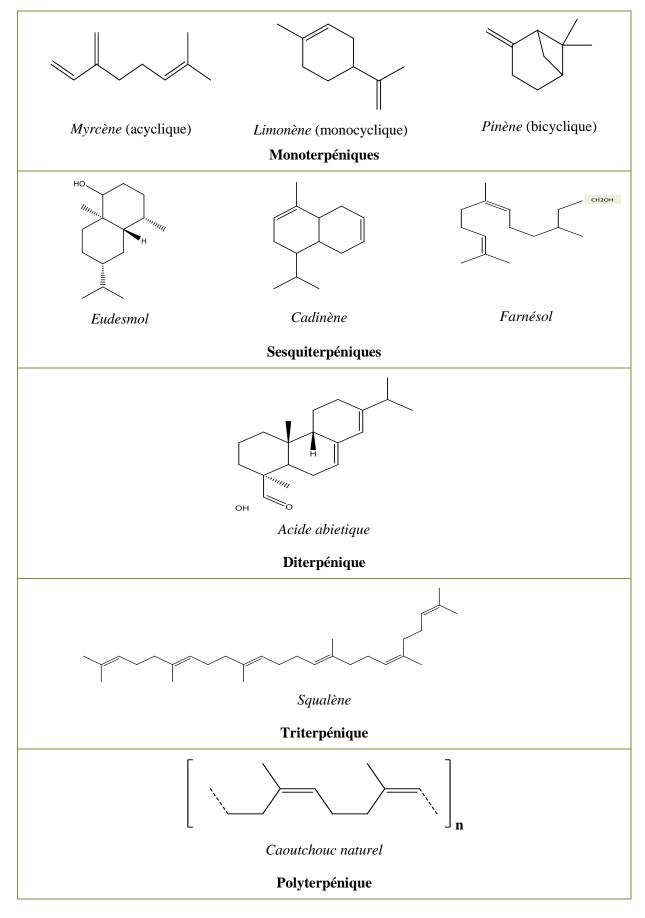


Figure 1 : Structures de quelques composés terpéniques composant les huiles essentielles.

I.1.8.2 Les composés aromatiques

Ce sont des dérivées du phénylpropane (C₆-C₃). Il s'agit de noyaux aromatiques couplés de chaines de 3 carbones. Ils sont beaucoup moins fréquents que les précédents (Figure 2). Ce sont, très souvent, des allyl- et propénylphénols ; parfois des aldéhydes. On peut également rencontrer dans les huiles essentielles des composés C₆-C₁ comme la vanilline (assez fréquente) ou l'anthranilate de méthyle.

Les lactones dérivées des acides cinnamiques (les coumarines) sont, au moins pour les plus simples d'entre elles, entraînables par la vapeur d'eau. Elles sont également présentes dans certaines huiles essentielles (Bruneton, 2009).

$$E$$
-anéthol (C_6 - C_3)

 E ugénol (C_6 - C_3)

 E ugénol (C_6 - C_3)

 E -aniellor (C_6 - C_3)

Figure 2 : Structures de quelques composés aromatique composant les huiles essentielles essentielles.

I.1.8.3 Les composés d'origines diverses :

Il s'agit précisement de produits résultant de la transformation de molécules non volatiles (Figure 3) :

- ✓ Composés issus de la dégradation d'acides gras ;
- ✓ Composés issus de la dégradation de terpènes ;
- ✓ Composés azotés et soufrés.

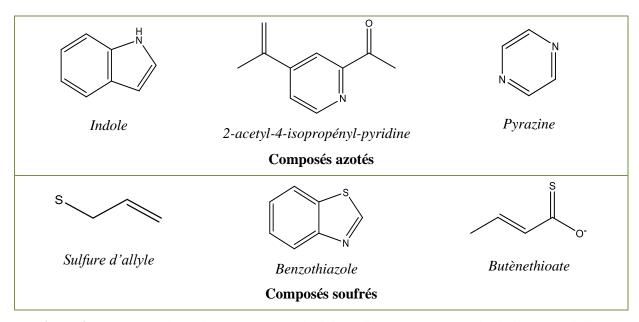


Figure 3 : Structures de quelques composés d'origines diverses composant les huiles essentielles.

Ces composés contribuent, souvent, aux arômes des fruits. Compte tenu de leur mode de préparation, les concrètes et les absolues peuvent en contenir. Il en est de même pour les huiles essentielles lorsqu'elles peuvent être entraînées par la vapeur d'eau (Bruneton, 2009).

I.1.9 Les facteurs influençant la composition chimique

Etant formées de mélanges, généralement complexes, les huiles essentielles présentent une très grande variabilité, tant au niveau de leur composition, que sur le plan rendement dans la plante d'origine. Cette variabilité peut s'expliquer par différents facteurs, que nous pouvons regrouper en deux catégories :

- ✓ Facteurs intrinsèques, liés à l'espèce, au type de clone, à l'organe concerné, à l'interaction avec l'environnement et au degré de maturité du végétal concerné, voire au moment de la récolte au cours de la journée ;
- ✓ Facteurs extrinsèques, en lien avec la méthode d'extraction (Besombes, 2008).

I.1.9.1 Les facteurs intrinsèques

Les cellules productrices d'huile essentielle peuvent se situer dans différents organes. Il est possible d'obtenir différentes huiles selon la partie sélectionnée d'une même plante. Des travaux de recherche ont montré des différences de composition des huiles essentielles en raison d'organes différents (feuilles et fleurs) et de sous-espèces différentes (Maffei et Sacco, 1997).

Le stade végétatif, au moment de la récolte, est un facteur déterminant pour le rendement et la composition de l'huile essentielle des plantes de Lavandula obtenus par clonage (Segur-Fantino, 1990).

I.1.9.2 Les facteurs extrinsèques

Huang et al. (1995) ont montrés l'influence des méthodes d'extraction sur la composition des huiles essentielles. Selon Segur-Fantino (1990), le stockage des matières premières avant distillation peut également influencer la composition et le rendement des huiles essentielles. Ce dernier a noté des pertes considérables d'huile essentielle lors d'un stockage prolongé au congélateur, mais peu d'évolution de la composition. Par ailleurs, le temps de stockage des huiles essentielles, après extraction, tend aussi à modifier leur composition ; elles se conservent entre 12 et 18 mois après leur obtention, car, avec le temps, leurs propriétés tendent à décroître (Carette, 2000).

D'autres travaux ont mis en évidence l'influence de l'origine géographique de la matière première (Verzele et al., 1988).

I.1.10 Les activités biologiques des huiles essentielles

L'activité antimicrobienne des huiles essentielles est connue de façon empirique, depuis l'Antiquité. Des études expérimentales ont été entreprises, en France, dès 1885. En 1888, Cadeac et Meunier publient leurs recherches dans les *Annales de l'Institut Pasteur*. De nombreuses études *in vitro* ont été réalisées par des médecins et des pharmaciens avec des résultats concluants. Dans son livre "*Antiseptiques essentiels*", publié en 1938, René-Maurice Gattefossé, le père de l'aromathérapie, décrit, déjà, la considérable avancée de la recherche dans ce domaine. Depuis, de nombreux travaux, essentiellement de recherche, sont venus renforcer ces résultats, expliquer l'efficacité des HE sur les germes résistants aux antibiotiques, les modes d'actions de certains de leurs composants ainsi que leurs spectres d'action, assez large (bactéries, levures, moisissures et virus) (Zhiri, 2006).

Les huiles essentielles et leurs composants chimiques possèdent un large spectre d'activités biologiques incluant les activités antimicrobiennes (Hanana *et al.*,2014 ; Hamrouni *et al.*, 2014 ; Parveen *et al.*,2014), antioxydante (Arab *et al.*, 2014), anticancéreuse (Millet, 2014), anti-inflammatoire (Kim *et al.*,2014), insecticide (Vera *et al.*, 2014), analgésique (Hajjaj *et al.*, 2014), sédatif, antispasmodique, anesthésiant local (Bakkali *et al.*, 2008), antiasthmatique (Shirole *et al.*, 2014) et cytotoxique (Gazim *et al.*, 2014).

L'activité biologique d'une huile essentielle est à mettre en relation avec sa composition chimique et, en particulier, les groupes fonctionnels des composés majoritaires (alcools, phénols, composés terpéniques et cétoniques) et les possibles effets synergiques entre ses composants. Sa valeur tient à son « totum » ; c'est-à-dire, dépend de l'intégralité de ses constituants et pas seulement à ses composés majoritaires (Lahlou, 2004).

Cette activité est liée à sa composition chimique, la nature des structures chimiques qui la constituent et à leurs proportions, l'élément déterminant (Zhiri, 2006).

Les activités de quelques substances rencontrées dans les huiles essentielles sont récapitulées dans le tableau ci-aprés :

Tableau 1 : La bioactivité de quelques composés des huiles essentielles chez certaines espèces végétales.

Composés	Bioactivité	Plantes
Phénols : Thymol, Carvacrol, Eugénol	 ✓ Utiles dans les infections bactériennes, fongiques, virales et parasitaires (actions puissantes); ✓ Stimulants du système immunitaire. 	Thym Origan Clou de girofle Sariette
Esters : Salicylate de méthyl, Acétate de géranyle, Acétate de bornyl	 ✓ Agissent sur le système nerveux central; ✓ Propriété anti-inflammatoire et de régénération des cellules; ✓ Action équilibrante et apaisante. 	Lavande Sauge Petit grain de Camomille
Alcools (C ₁₀): Géraniol, Linalool, Thujanol, Myrcénol, Terpinéol, Menthol, Pipéritol	 ✓ Propriétés antiseptique, antivirale, analgésique et immunostimulante; ✓ Utiles dans de nombreuses infections bactériennes; ✓ Insecticide, larvicide, pesticide. 	Menthe Lavande Arbre de thé
Aldéhydes : Néral, Géranial (Citrals), Citronnellal, Cuminal	 ✓ Peu bactéricide (une action antibactérienne sur les organismes Gram + et Gram -); ✓ Anti-inflamatoire calmant le système nerveux. 	Orange Mélisse Citronnelle Cannelle Clou de girofle
Cétones : Jasmone, Damascénone, Carvone	✓ Action relaxante et sédative et propriétés cicatrisantes.	Eucalyptus Sauge Niaouli
Lactones sesquiterpéniques	✓ Activité antifungique	Girofle Genièvre
Acides	✓ Action puissante, anti-inflammatoires et sédatifs.	Ylang-ylang Géranium Néroli
Monoterpénols et les monoterpénals	✓ Activité antivirale	Pin Romarin Citron
Références Buronzo (2008)	; Zhiri (2006) ; Teixeira Silva (2004) ; Svoboo	da et Hampson, (1999)

I.1.11 L'activité antifongique des huiles essentielles

L'activité antifongique des huiles essentielles a fait l'objet de plusieurs études scientifiques *in vitro*, depuis plusieurs années. Les méthodes utilisées pour évaluer cette activité sont nombreuses. Dans le domaine phytosanitaire et agroalimentaire, les huiles essentielles ou leurs composés actifs pourraient également être utilisés comme agents de protection contre les champignons phytopathogènes et les microorganismes envahissant la denrée alimentaire (Lis-Balchin, 2002).

Les huiles essentielles agissent contre le développement des champignons et des moisissures. On pense alors, que les extraits de divers végétaux ont une activité antifongique et que de nombreuses HE sont sans effets secondaires sur les humains et les animaux (Sokmen *et al.*, 1999). Des études *in vitro* et *in vivo* ont suggéré que les huiles essentielles pourraient être utilisées comme agents antifongiques efficaces (Adam *et al.*, 1998).

En général, les huiles essentielles et les extraits d'origine végétale sont considérés comme des composés non phytotoxiques et potentiellement efficaces contre plusieurs microorganismes, y compris de nombreux pathogènes fongiques (Pandey *et al.*, 1982 ; Chuang *et al.*, 2007). Par conséquent, ils peuvent être utilisés comme une thérapie naturelle pour inhiber les agents pathogènes fongiques provoquant des infections superficielles. Pour lutter contre les maladies fongiques, des efforts ont été investis dans le développement d'agents antifongiques, plus sûrs, à partir de produits végétaux naturels tels que les huiles essentielles et leurs extraits (Pandey *et al.*, 1982 ; Prasad *et al.*, 2004).

Au cours de ces dernières années, plusieurs chercheurs ont signalé que les hydrocarbures mono- et sesquiterpéniques constituaient les principaux composants des huiles essentielles végétales ayant un énorme potentiel d'inhibition des pathogènes microbiens (Cakir *et al.*, 2004). Les composés antimicrobiens actifs des huiles essentielles sont généralement des terpènes, de nature phénolique, agissant sur les agents pathogènes à travers la paroi cellulaire et la membrane cellulaire. Ainsi, les composés phénoliques actifs pourraient avoir plusieurs cibles invasives pouvant conduire à l'inhibition des pathogènes fongiques infectieux humains.

L'activité antifongique peut être attribuée à la présence de certains composants tels que le Carvacrol, l'α-Terpinly acétate, le Cymène, le Thymol, le Pinène, le Linalol, déjà connus pour leurs activités antimicrobiennes (Knobloch *et al.*, 1986 ; Cimanga *et al.*, 2002).

Un certain nombre d'études scientifiques ont souligné l'importance de la contribution de nombreuses familles de plantes, telles que les *Asteraceae*, *Liliaceae*, *Apocynaceae*, *Solanaceae*, *Caesalpinaceae*, *Rutaceae*, *Piperaceae* et *Sapotaceae*, utilisées comme plantes médicinales (Verma et Singh 2008).

Les huiles essentielles les plus étudiées dans la littérature pour leurs propriétés antifongiques appartiennent à la famille des *Labiaceae*: thym, origan, lavande, menthe, romarin, sauge, etc... Étant donnée la grande complexité de la composition chémotypique des huiles essentielles, malgré de possibles synergies, certains auteurs préfèrent étudier l'effet d'un composé isolé pour pouvoir ensuite le comparer à l'activité globale de l'huile. Ainsi l'activité fongistatique des composés aromatiques semble être liée à la présence de certaines fonctions chimiques (Voukou *et al.*, 1988). Des recherches concluent que les phénols (Eugénol, Chavicol 4-Allyl-2-6-Diméthoxyphénol) ont une activité antifongiques meilleure que les aldéhydes (Cinnamique et Hydrocinnamique) et présentent, également, des propriétés fongistatiques très marquées. A l'opposé, les groupements méthoxy ne semblent pas apporter une fongitoxicité significative.

Parmi les Aaldéhydes Aliphatiques, le Cinnamaldéhyde s'est révélé le plus actif. En ce qui concerne les composés phénoliques, l'activité antifongique augmente avec l'encombrement stérique de la molécule (p-n-Propylphénol > Thymol > Isoeugénol > Eugénol) (Ultree, 2000). L'addition de groupements alkyls au noyau benzène du phénol augmente le caractère antifongique. Par conséquent, un certain degré d'hydrophobicité des composés phénoliques ou aldéhydes aromatiques parait donc être nécessaire pour exprimer une caractéristique antifongique optimale. L'activité des terpènes des huiles essentielles est en corrélation avec leur fonction chimique. Des travaux de recherche ont montré l'importance de la spécification du genre et de l'espèce, ainsi que de la variété de la plante d'où provient l'extrait (Chao *et al.*, 2000).

Cette activité est estimée selon la durée d'inhibition de la croissance déterminée par une simple observation macroscopique. L'activité antifongique décroît considérablement selon le type de la fonction chimique : Phénols > Alcools > Aldéhydes > Cétones > Ethers > Hydrocarbures.

Plusieurs études *in vitro* ont été publiées confirmant l'effet de l'huile essentielle et de ses composés majeurs sur les champignons pathogènes d'humains, d'animaux et de végétaux.

L'activité antifongique de l'huile essentielle de capitules de chrysanthème *Chrysanthemum coronarium* L. a été évaluée contre douze agents phytopathogènes. Les principaux composés de l'huile étaient le Camphre, l'α-Pinène, le β-Pinène et l'Acétate de Lyratyle (Alvarez Castellanos *et al.*, 2001).

La contribution de deux composés principaux, Pipéritone et Pipériténone, à l'efficacité antifongique a été évaluée et des modifications structurales dans les mycéliums ont été observées par microscopie électronique, montrant des modifications considérables dans la morphologie des hyphes et mécanisme d'action.

La composition chimique et l'activité antifongique des huiles essentielles de trois espèces d'Artemisia (Artemisia absinthium L., Artemisia santonicum L. et Artemisia spicigera C. Koch.) a été testée. Toutes les huiles ont eu un effet inhibiteur puissant sur tous les champignons testés (Kordali et al., 2005).

L'activité antifongique dans les huiles essentielles des parties aériennes d'Arnica longifolia D.C. Eaton., Aster hesperius A. Gray., Chrysothamnus nauseosus, contre des phytopathogènes fongiques du genre Colletotrichum (Tabanca et al., 2007). Il a été rapporté que le carvacrol possède une activité antifongique contre les espèces Colletotrichum (Demirci et al., 2006; Altintas et al., 2006)

I.1.12 Le mode d'action des huiles essentielles

Il y a très peu d'études décrivant clairement le mode d'action des huiles essentielles, vis-à-vis des microorganismes. Du fait de la variabilité des quantités et des profils des composants des huiles essentielles, il est probable que leur activité antimicrobienne ne soit pas attribuable à un mécanisme unique, mais à plusieurs sites d'action au niveau cellulaire (Carson *et al.*, 2002). Et, tout laisse à penser que ce mode d'action est assez complexe et difficile à cerner, du point de vue moléculaire.

La complexité de ces modes d'actions semble dépendre, en prmier lieu, du type et des caractéristiques des composants actifs, en particulier de leurs propriétés lipophile et hydrophile qui leur permettent de pénétrer dans la double couche phospholipidique de la membrane cytoplasmique (Kalemba et Kunicka, 2003) ; ce qui induit un changement de conformation de la membrane. Les terpénoïdes peuvent servir d'exemple d'agents liposolubles affectant les activités des enzymes catalyseurs de la membrane, telles que leurs actions sur les voies respiratoires.

Le mode d'action des huiles essentielles dépend, aussi, du type de microorganismes. Plusieurs études ont abouti à la conclusion que les huiles essentielles semblent avoir plusieurs modes d'actions sur les différents microorganismes et qu'il est très probable que chacun des constituants ait son propre mécanisme d'action :

- ✓ Une interférence avec la bicouche lipidique de la membrane plasmique, provoquant une perméabilité et une perte des constituants cellulaires ;
- ✓ Une altération des différents systèmes enzymatiques, dont ceux impliqués dans la production de l'énergie cellulaire et la synthèse des composants de structure ;
- ✓ Une destruction ou inactivation du matériel génétique (Hullin et al., 1998).
 Des investigations sur le mécanisme d'action antimicrobienne des HE ou de leurs constituants ont été menées par différents auteurs :

Cowan et Svoboda (1999) ont montré que l'interruption de la membrane, par les substances terpéniques, est due à leur caractère lipophile. Ce résultat a été confirmé par les travaux de Mendoza et ses collaborateurs qui ont montré que l'augmentation de l'hydrophilie du diterpénoides (kaurene), par l'addition du groupe méthyle, réduisait son activité antimicrobienne (Mendoza *et al.*, 1997 *in* Cowan, 1999)

Certains composants d'huiles essentielles peuvent agir comme découpleurs, qui interfèrent avec la translocation de protons dans la membrane et ensuite interrompre la phosphorylation de l'ADP (métabolisme énergétique primaire). Spécifiquement les terpénoïdes, avec des groupes fonctionnels tels que les alcools phénoliques ou les aldéhydes, interfèrent également avec les protéines intégrées à la membrane des micro-organismes ou les protéines enzymatiques associées, comme l'enzyme ATPase, en arrêtant leur synthèse ou activité (Knobloch *et al.*, 1989 ; Sikkema *et al.*, 1995).

Cependant, les macromolécules hydrophobes, telles que les constituants des huiles essentielles, sont incapables de pénétrer la membrane cytoplasmique (Nikaido, 1994). Il a été prouvé que l'efficacité de l'agent antibactérien augmente généralement avec ses propriétés lipophiles à la suite de l'action sur la membrane cytoplasmique. D'autre part, les HE habituellement expriment une solubilité aqueuse faible, ce qui les empêche d'atteindre un niveau toxique dans les membranes cytoplasmiques, même si les huiles essentielles ont une très bonne affinité avec les membranes (Mann *et al.*, 2000). Certains composants d'HE de nature phénolique, par ex. Carvacrol et Thymol, provoquent une perturbation du lipopolysaccharide de la couche externe, suivie d'une désintégration partielle de la membrane externe (Helander *et al.*, 1998).

Certains composants d'huiles essentielles détruisent la paroi cellulaire bactérienne et fongique ; ce qui entraîne une fuite de cytoplasme et sa coagulation (Claeson, 1992 ; Knobloch *et al.*, 1989 ; Adams *et al.*, 1996 ; De Billerbeck *et al.*, 2001).

Les signes visibles de l'action des HE contre les champignons peuvent être observés, comme leurs changements morphologiques sous microscope et comme les macro-caractéristiques des colonies (Adams et al., 1996; Bourrel et al., 1995). L'Eugénol et le Carvacrol, par exemple, provoquent des changements morphologiques de la moisissure Cladosporium herbarum qui cause la détérioration des aliments. Un mycélium souple et élastique traité avec ces composants durcis et devient fragile, avec des protubérances vésiculaires. Une augmentation de la ramification des hyphes et des variations de son diamètre ont été observées. Le nombre de conidies a diminué, mais leurs déformations n'ont pas été remarquées.

Les déformations morphologiques sont vraisemblablement liées à l'action de l'Eugénol et du Carvacrol sur certaines enzymes de la paroi cellulaire, telles que les chitinases et les glucanases (Adams et al., 1996). Pour certains champignons, sensibles à l'imidazole, le réarrangement des constituants de la membrane entraîne la perte de la viabilité cellulaire et, finalement, la lyse (Claeson, 1992).

Franchomme (1981) suggère que les HE hydroxylées créent des perturbations enzymatiques et prennent pour cible les enveloppes protectrices (le mésosome et le cytoplasme). Boochird et Flegel (1982) suggèrent que la structure ciblée par l'HE, la paroi cellulaire, la membrane cytoplasmique ou le cytoplasme, dépend de la concentration de celle-ci.

Les huiles essentielles inhibent, également, la synthèse de l'ADN, de l'ARN, de protéines et de polysaccharides dans les cellules fongiques et bactériennes (Himejima et Kubo, 1993 ; Zani et al., 1991). Chez les champignons, on évoque des changements similaires aux effets de l'action d'antibiotique (Takaisi-Kikuni et al., 1996).

L'effets synergiques des huiles essentielles et leurs composants

Les effets antimicrobiens des associations d'huiles essentielles, comme pour les associations d'antibiotiques, sont définies selon quatre interactions possibles :

- ✓ Indifférence : l'activité d'une huile essentielle n'est pas affectée par l'autre ;
- ✓ Addition : l'effet de l'association est égal à la somme des effets de chaque huile essentielle étudiée, isolément, à la même concentration que dans l'association ;
- ✓ Synergie : l'effet est significativement supérieur à la somme des effets des huiles essentielles étudiées, isolément, à la même concentration ;
- ✓ Antagonisme : l'association diminue l'activité de l'une ou de autres huiles essentielles. Elle est inférieure à la somme des effets de chaque huile essentielle prise séparément (Hermal, 1993).

L'activité antimicrobienne des huiles essentielles est conditionnée par l'activité de leurs composants. Un effet synergique des constituants d'huile essentielle a, souvent, été observé (Aboul *et al.*, 1996 ; Pattnaik *et al.*, 1995).

I.1.14 La toxicité des huiles essentielles

Alors que de nombreux ouvrages font référence à la toxicité de nombreux produits sur le marché, la toxicité des huiles essentielles est moins investiguée. Dans la plupart du temps, sous le terme de toxicité, sont décrites des données expérimentales accumulées en vue d'évaluer le risque que représente leurs utilisations. Les interactions de ces produits avec les médicaments sont, aussi, peu mentionnées (Pibiri, 2006). Cependant, quelques informations, sur certaines toxicités, sont décrites dans la littérature : Chez l'homme, des intoxications aiguës sont possibles. Les accidents graves, le plus souvent observés chez les petits enfants, sont provoqués par l'ingestion en quantités importantes d'huiles essentielles.

Certains auteurs se basent sur la composition des huiles essentielles et les toxicités relatives des familles biochimiques auxquelles elles appartiennent (Franchomme *et al.*, 1990 ; Maihebiau, 1994). Certaines huiles essentielles se révèlent cytotoxiques, selon la phase dans laquelle elles sont mises en contact (la toxicité du thym est augmentée par contact, en phase liquide, et réduite, en phase gazeuse ; et c'est l'inverse pour la lavande) (Inouye, 2003).

Les huiles essentielles sont des médicaments et une dose peut entrainer des troubles très graves. Par contre, les baumes, les huiles de corps, les huiles de bains, vendus dans le commerce, sont sans danger ; si bien sûr on respecte la posologie (Sallé et Pelletier, 1987).

I.2 Une description des espèces fongiques

I.2.1 Des Généralités sur les champignons phytopathogènes

Les champignons (mycètes) constituent un groupe d'organismes hétérotrophes ubiquistes, riches de quelques 100.000 espèces (Meulemans, 1989). Les champignons parasites des végétaux sont des microorganismes dont les dimensions des spores se situent entre 10 à 100 micromètres (Corbaz, 1990).

Ils sont caractérisés par un mycélium, formé de filaments nommés hyphes. Chez les moins évolués, les hyphes ne sont pas cloisonnés. Ce sont des organismes, sans chlorophylle. Ils tirent leurs nourritures soit de matières organiques mortes, pour les champignons saprophytes, soit de tissus vivants, pour les parasites (Lepoivre, 2003).

Les champignons se reproduisent essentiellement par des spores uni- ou pluricellulaires. On différencie, selon leur origine, des spores sexuées et asexuées. La forme sexuée, ou téléomorphe, a pour fonction de maintenir l'espèce et apparait souvent en fin de saison alors que la forme asexuée, dite, aussi, forme imparfaite ou anamorphe, assure la propagation (Lanier *et al.*, 1998).

La plupart des champignons utilisent toutes les voies (asexuée, sexuée et parasexuée) afin de produire un nombre très important d'unités de propagation telles que les spores ou le mycélium pour la survie et la propagation (Prabhu *et al.*, 1992). La classification des champignons est essentiellement basée sur des caractères purement morphologiques (Meyer *et al.*, 2004). On distingue cinq groupes de champignons : Archimycètes (Champignons inférieurs), Phycomycètes, Ascomycètes, Basidiomycètes et Adélomycète ou deutéromycète (Simon,1994).

Les champignons phytopathogènes sont connus pour être à l'origine de plusieurs maladies de plantes et des pertes de rendement pour de nombreuses récoltes économiquement importantes (Fletcher *et al.*, 2006 ; AbdelKader *et al.*, 2012). En agriculture, chaque année, on enregistre des pertes en rendement de l'ordre de 20 % dûes essentiellement aux maladies fongiques (Bajwa *et al.*, 2004).

Les champignons nécessitent trois facteurs pour s'exprimer : l'agent pathogène, l'hôte et l'environnement. Au cas où ces trois facteurs sont favorables, la maladie se déclare (Prabhu *et al.*, 1992). Les champignons phytopathogènes sont susceptibles d'attaquer les fruits frais et légumes dans une haute teneur en humidité et un environnement à haute température (Boyraz et Ozcan, 2006). En raison de leur puissant arsenal d'enzymes hydrolytiques, ces micro-organismes peuvent causer un degré élevé de détérioration lorsqu'ils sont présents dans / sur les aliments et peuvent être responsables de pertes économiques considérables.

En outre, ils peuvent agir comme producteurs potentiels de métabolites toxiques, nommées mycotoxines, qui sont potentiellement dangereuses pour la santé. Ils sont à l'origine de plusieurs maladies végétales dont les conséquences sont la réduction du rendement dans plusieurs pays. Les *Fusarium*, les *Aspergillus*, les *Penicillium* et les *Alternaria*, sont la cause des maladies pour beaucoup de culture. Ils affectent les feuilles, les tiges, les fleurs, les fruits et les graines (Li *et al.*, 2008 ; Mašková *et al.*, 2012 ; Broydé *et* Doré, 2013). Ils représentent les contaminants les plus fréquents des aliments. On les retrouve principalement dans les céréales, mais, aussi, dans de nombreux autres produits d'origines végétale et animale.

I.2.2 L'étude des espèces fongiques sélectionnées du genre Fusarium

Le genre *Fusarium* comprend un nombre important d'espèces pouvant être phytopathogènes en provoquant des maladies sur plusieurs cultures d'importance agronomique, y compris les céréales. Elles peuent, aussi, être nocifs pour les êtres humains et les animaux (Weiland et Sundsbak, 2000; O'Donnell *et al.*, 2013).

Ce genre inclue des champignons imparfaits appartenant à la classe des *Deutéromycètes*, embranchement des *Ascomycota*, classe des *Ascomycètes*, ordre des *Hypocreales*. Les formes parfaites ou téléomorphes de quelques espèces de *Fusarium* sont connues. Elles sont, principalement, classées dans le genre *Gibberella*, et, pour un petit nombre d'espèces, dans les genres *Hemanectria* et *Albonectria* ((Nelson *et al.*, 1983; Leslie et Summerell, 2006). Pour plusieurs espèces de *Fusarium*, le stade parfait na jamais été observé. Le genre *Fusarium* comprend près de 40 espèces, souvent cosmopolites.

Les espèces du genre *Fusarium* produisent trois types de spores : macroconidies, microconidies et chlamydospores. Les macroconidies cloisonnées peuvent être produites sur les monophialides et polyphialides ou dans le mycélium aérien, mais aussi sur monophialides courtes, dans des structures spécialisées appelées sporodochie (Moretti, 2009).

Sur le plan économique, le genre *Fusarium* est très important parce qu'il regroupe beaucoup d'espèces phytopathogènes, susceptibles d'induire des maladies (fusarioses) chez de nombreuses plantes. De plus, beaucoup d'espèces saprophytes sont capables de se développer en tant que pathogènes secondaires sur des tissus végétaux sénescents. Les espèces du genre *Fusarium* peuvent, ainsi, attaquer les céréales (maïs, blé, orge et avoine), des légumes, des plantes ornementales et beaucoup d'arbres fruitiers.

La majorité des espèces de *Fusarium* produisent une large gamme de métabolites secondaires, biologiquement actifs (mycotoxines), avec la diversité chimique extraordinaire. L'activité biologique de mycotoxines de *Fusarium* peut être nuisible pour les plantes. Elle est associée au cancer et à d'autres maladies chez l'être humain et les animaux d'élevage (Desjardins et Proctor, 2007).

I.2.3 Les caractères culturaux généraux

Les *Fusarium* poussent sur le milieu Sabouraud, mais se développent mieux sur gélose à l'etrait de malt ou sur milieu PDA (potato-dextrose-agar). Leur température optimale de croissance est comprise entre 22 et 28°C.

Sur les milieux de culture, les *Fusarium* forment des colonies duveteuses ou cotonneuses de couleurs variables (blanche, crème, jaune, rose, rouge, violette ou lilas), selon l'espèce. Le revers peut être crème, rouge à pourpre, lilas ou violet. Les pigments diffusent souvent dans la gélose (Chermette et Bussieras, 1993).

I.2.4 La morphologie microscopique

Le principal caractère morphologique des *Fusarium* est la présence de macroconidies fusiformes et cloisonnées (le nom de *Fusarium* vient du latin « *fusus* » car les spores de ces moisissures sont en forme de fuseau). Les principaux caractères morphologiques du genre *Fusarium* sont représentés dans la Figure 4.

Les conidiophores, parfois très ramifiés, forment sur le thalle des coussinets (sporodochies) et portent des masses de spores.

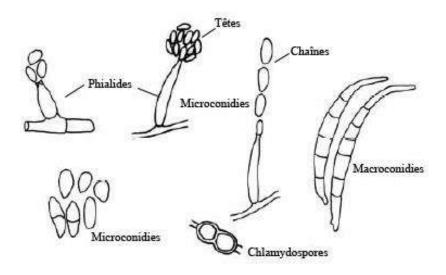


Figure 4 : Caractères morphologiques des Fusarium.

Les phialides, plus ou moins allongées, présentent, le plus souvent, un site de bourgeonnement unique (monophialide) situé à l'extremité d'un col allongé (*F. solani*) ou court et trapu (*F. oxysporum*). Chez d'autres espèces comme *F. proliferatum*, les phialides présentent plusieurs sites de bourgeonnement (polyphialides).

Les phialides produisent deux types de conidies :

- ✓ Microconidies, uni- ou bicellulaires, piriformes, fusiformes, cylindriques ou ovoïdes, isolées, solitaires, ou groupées, disposées en verticille ou plus rarement en chaînettes (*F. verticilloides*);
- ✓ Macroconidies, conidies pluricellulaires à cloisons seulement transversales, souvent groupées en paquets. Les macroconidies sont fusiformes, souvent courbées, avec une cellule basale pédicellée, formant une sorte de talon plus ou moins visible. Les chlamydospores sont parfois présentes, en position terminale ou intercalaire (Roquebert, 1998).

I.2.5 Les principales espèces de Fusarium

Compte tenu de leur fréquence dans les différents substrats, notamment les céréales, de leur potentiel toxinogène et de leur pouvoir pathogène, les principales espèces de *Fusarium* sont : *F. culmorum*, *F. graminearum*, *F. oxysporum et F. verticilloides* (*F. moniliforme*).

I.2.5.1 Le Fusarium culmorum

Les caractères culturaux

Cette moisissure pousse rapidement sur géloses, PDA et au malt. Les colonies sont duveteuses, d'abord blanches à jaunâtres ou roses puis ocracées à rouges brunâtre. Le revers est rouge à pourpre.

> La morphologie microscopique

Les phialides, courtes et larges, formées sur le mycélium aérien, sont groupées en sporodochies. Les microconidies sont absentes. Les macroconidies sont fusiformes, courbées et septées (5 cloisons en moyenne, 3 à 8). La cellule apicale est courte et pointue (26-50 x 4-7 μm). Les chlamydospores, intercalaires ou terminales, formées par le mycélium ou par les conidies, sont sub-globuleuses, brunâtres, lisses ou verruqueuses (9 à 14 μm de diamètre). Dans la figure 13 sont représentés les principaux caractères morphologiques de *F. culmorum*.

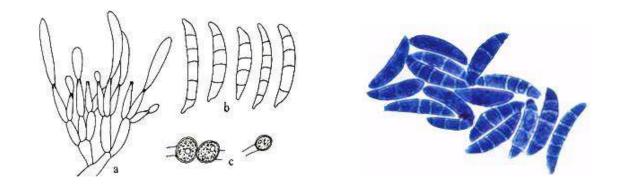


Figure 5 : Le *Fusarium culmorum*.

a) macrophialides et macroconidies ; b) macroconidies ; c) chlamydospores.

I.2.5.2 Le Fusarium graminearum (forme parfaite : Gibberella zeae)

> Les caractères culturaux

Ce champignon se développe vite sur les géloses PDA et au malt. Les colonies, floconeuses, sont au début roses grisâtres ou rouges à pourpres, puis deviennent brun vineux. Le revers est rouge à pourpre. Le pigment diffuse dans la gélose.

> La morphologie microscopique

Les phialides (10-14 x 3,5-5 μm) peuvent s'agréger en sporodochies. Les microconidies sont absentes. Les macroconidies sont fusiformes, courbées, et présentent 3 à 7 septum. La cellule terminale est longue et pointue (25-62 x 2,5-5 μm). Les chlamydospores, intercalaires, formées par le mycélium rarement dans les conidies, sont globuleuses, hyalines à brun pâle (8-12 μm en diamètre) (Figure 6).

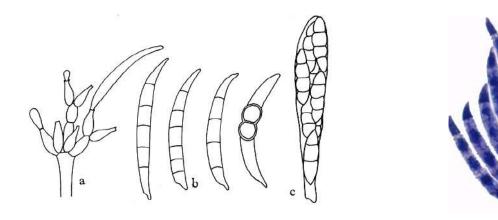


Figure 6 : Le *Fusarium graminearum*.

a) macrophialides et macroconidies ; b) macroconidies ; c) asque octosporé

Dans la nature, *F. graminearum* est capable de former des périthèces, superficiels, ovoïdes, garnis de tubercules (140 à 250 µm) sur un grand nombre de graminées. Les asques, clavés, contiennent 8 ascospores, hyalines ou brun très clair, fusiformes et triseptées.

I.2.6 L'importance du genre Fusarium

I.2.6.1 Le potentiel toxinogène

Le genre *Fusarium* comprend des espèces capables de produire de nombreuses mycotoxines telles que les trichothécènes, la zéaralénone et les fumonisines (Tableau 3) :

- ✓ Fusarium poae, F. sporotrichioides, F. crookwellense, F. culmorum et F. graminearum produisent des trichothécènes de types A et B;
- ✓ Fusarium verticillioides (F. moniliforme) et F. proliferatum synthétisent des fumonisines ;
- ✓ Fusarium culmorum, F. graminearum F. oxysporum et F. sporotrichioides produisent la zéaralénone (Pitt, 2000).

Tableau 2 : Les *Fusarium* producteurs des mycotoxines.

Espèces de Fusarium	Mycotoxines produites
Fusarium acuminatum	moniliformine, trichotécènes type A
Fusarium anthophilum	moniliformine
Fusarium avenaceum	fusarine C, moniliformine
Fusarium chlamydosporum	moniliformine
Fusarium cerealis (sin. crookwellense)	culmorine, fusarine C, trichotécènes type B
Fusarium culmorum	culmorine, fusarine C, trichotécènes type B, zéaralénone
Fusarium graminearum	trichotécènes type B, zéaralénone
Fusarium oxysporum	acide fusarique, moniliformine, oxysporine
Fusarium pallidoroseum (sin. semitectum)	moniliformine, zéaralénone
Fusarium poae (sin. tricinctum)	fusarine C, trichotécènes type A
Fusarium proliferatum	moniliformine
Fusarium sacchari	moniliformine
Fusarium sambucinum	fusarine C, trichotécènes type A
Fusarium solani	acide fusarique, naftoquinone
Fusarium sporotrichoides	fusarine C, trichotécènes type A, zéaralénone
Fusarium verticillioides (sin. moniliforme)	fumonisines, fusarine C, gibberelines, moniliformine, naftoquinone

I.2.6.2 Le pouvoir pathogène

Les *Fusarium* sont, principalement, des agents phytopathogènes. Ces champignons contaminent les céréales, les légumes, les arbres fruitiers et provoquent des maladies nommées fusarioses. Les *Fusarium* sont généralement impliqués dans la pourriture des racines, des tiges et des fruits. Ils contribuent, aussi, dans la dégradation du système vasculaire (Trenholm *et al.*, 1988).

Leur pouvoir pathogène chez l'homme et les animaux est varié. Certaines espèces sont à l'origine des kératites et endophtalmies. D'autres espèces (*F. solani*, *F. moniliforme*) sont impliquées dans des infections systémiques (Guarro et Gene, 1992).

I.3 Les mycotoxines

Les mycotoxines sont des métabolites secondaires toxiques produites par certaines souches de moisissures dans les milieux où elles se développent, principalement dans les matières premières d'origine végétales (céréales, légumes, fruits). Plusieurs centaines de mycotoxines ont pu être identifiées et environ une trentaine de ces molécules ont une véritable importance en termes de santés animale et humaine (Castegnaro et Pfohl-Leszkowicz, 2002).

I.3.1 Les conditions de toxinogènese

La production de mycotoxines est directement liée à la croissance fongique. Par conséquent, les facteurs capables d'influencer la croissance fongique vont aussi assurer un rôle sur la toxinogénèse. De manière générale, les conditions environnementales nécessaires à la production de mycotoxines sont plus étroites que celles permettant la croissance fongique et sont, le plus souvent, proches des conditions optimales de développement de l'espèce considérée.

- ✓ Activité en eau (Aw) ;
- ✓ pH:
- ✓ Présence d'oxygène ;
- ✓ Température ;
- ✓ Composition du substrat ;
- ✓ Intéractions microbiennes.

I.3.2 La nature et l'origine des mycotoxines

La formation de métabolites toxiques dans un substrat à la suite de leur attaque par des moisissures peut être le résultat de trois mécanismes différents :

- 1. Le champignon, en parasitant un végétal vivant, peut entraîner, soit une exacerbation de certaines réactions métaboliques de la plante, conduisant à des concentrations anormalement élevées d'un constituant habituel, soit à la formation par le végétal de produits toxiques n'existant pas dans la plante saine.
- 2. Le champignon peut transformer un composé peu ou pas toxique en un produit toxique, par la bioconversion. Ainsi, l'acide coumarique, présent en faible concentration peut être transformé par différentes moisissures en 4-hydroxycoumarine, puis en dicoumarol, un anticoagulant puissant.
- **3.** La toxine est un métabolite propre au champignon : aflatoxines, zéaralénone (Le Bars, 1988).

I.3.3 La Biogénèse des mycotoxines

Les mycotoxines font partie des métabolites secondaires, n'ayant pas de rôle évident dans les pertes économiques causées par les microorganismes. Contrairement au métabolisme primaire, qui est fondamentalement le même pour tous les êtres vivants, le métabolisme secondaire dépend de l'espèce considérée, et très souvent de la souche. Le métabolisme secondaire, très important chez les moisissures, aboutit à une grande diversité de molécules, dont les mycotoxines.

Les métabolites secondaires sont très souvent élaborés par familles de produits, chimiquement voisins (les aflatoxines, les trichothécènes ...etc.). La nature de ces produits, très hétérogènes, dépend des caractères individuels de la souche et des conditions environnementales.

Les voies de biosynthèse sont longues et complexes et les réactions sont catalysées par des enzymes de spécificité différente de celles du métabolisme primaire. La détermination des schémas métaboliques de biosynthèse de certaines mycotoxines a été rendue possible grâce à l'utilisation d'inhibiteurs enzymatiques et de précurseurs métaboliques (Luchese et Harrigan, 1993; Steyn, 2012).

Les mycotoxines ont trois origines biosynthétiques principales : la voie des polyacétates, celle des terpènes et celle des acides aminés. Les principales voies de biosynthèse des mycotoxines connues sont présentées dans la Figure 7.

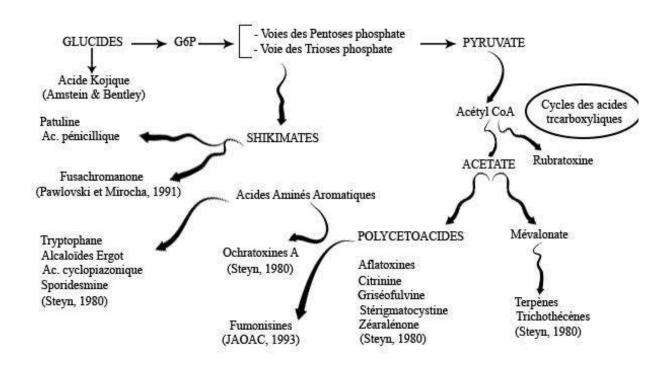


Figure 7 : Voies de biosynthèse des mycotoxines.

I.3.4 La Structure des mycotoxines

La diversité des voies de synthèse et des espèces productrices fait qu'il existe de très nombreuses molécules et de structure relativement différente les unes des autres. Le plus souvent, les mycotoxines sont des molécules de faible poids moléculaire (154 Da, pour la patuline qui est l'une des plus petites, à 466 Da pour la toxine T2 qui est l'une des plus grosses).

Les mycotoxines sont, pour la plupart, des composés hétérocycliques insaturés. La présence de doubles liaisons C=C assure, souvent, un rôle dans la toxicité et les propriétés cancérigènes. C'est notamment le cas pour les aflatoxines dont la double liaison à l'extrémité des groupements furanes permet l'addition d'O₂ et la formation d'un cycle triangulaire époxyde, extrêmement toxique (Bennett et Klich, 2003). Pour le DON et la toxine T2, des 12- et 13 époxytrichothécènes, le cycle époxyde est constitutif.

Un certain nombre de ces molécules sont fluorescentes sous la lumière U.V. (Aflatoxines B1, B2 et G1, G2, Ochratoxine A, Zéaralénone, ...). Cette caractéristique est importante dans l'élaboration des méthodes de détection et de dosage.

I.3.5 Les principales mycotoxines

Les principales mycotoxines peuvent être produites par, seulement, 5 genres de champignons : *Aspergillus, Penicillium, Fusarium, Claviceps et Alternaria*. Compte tenu de leurs propriétés toxiques chez l'homme et l'animal et de leur fréquence de contamination des matières premières et des aliments, les importantes mycotoxines produites sont : les Aflatoxines, l'Ochratoxine A, les Fumonisines, les Trichothécènes et la Zéaralénone.

I.3.5.1 Les mycotoxines sélectionnées (les Trichothécènes)

Le groupe des trichothécènes compte, approximativement, 60 molécules biologiquement actives. Les trichothécènes sont produites, principalement, par des espèces de genre *Fusarium* qui contaminent les céréales ; particulièrement, le maïs. Des trichothécènes peuvent, aussi, être produites par des espèces appartenant aux genres *Myrothecium*, *Trichoderma*, *Trichothecium*, *Stachybotrys*.

Les trichothécènes appartiennent au groupe des sesquiterpènoïdes. Ils possèdent un squelette tricyclique formé par un cyclopentane, un cyclohexane, un cycle à six chaînons oxygénés et quatre groupements méthyles. Ce squelette est appelé trichothécane. Tous les trichothécènes naturels possèdent une double liaison (ou pont oléfinique) en C9,10 ainsi qu'un groupement époxy en C12,13 caractéristique des 12,13 époxy-trichothécènes.

On classe les trichothécènes en 4 groupes ; les groupes A et B (figure 8) étant les plus importants en termes de prévalence naturelle :

- ✓ **Le groupe A :** constitué par les trichothécènes qui n'ont pas de fonction cétone en C8. Les plus importants sont la toxine T-2, la toxine HT-2 et le diacétoxyscirpénol (DAS);
- ✓ Le groupe B : constitué par les trichothécènes ayant une fonction cétone en C8. Les plus importants sont le déoxynivalénol (DON) et ses formes acétylées, le nivalénol (NIV), et la fusarénone-X (FX);
- ✓ Le groupe C : constitué par les trichothécènes ayant un époxyde supplémentaire en C7, telle que la crotocine ;
- ✓ Le groupe D : constitué par les trichothécènes ayant un macrocycle entre C4 et C15. Les plus importants sont les verrucarines, les roridines et les satratoxines.

La structure des principales trichothécènes des groupes A et B est représentée dans la Figure 8.

Dénomination	R1	R2	R3	R4	R5	Formule brute	Masse moléculaire (g/mole)
Toxine T2	ОН	OAc	OAc	Н	OCOCH ₂ CH(CH ₃) ₂	C ₂₄ H ₃₄ O ₉	466,50
Toxine HT2	ОН	OAc	OAc	Н	OCOCH ₂ CH(CH ₃) ₂	$C_{22}H_{32}O_{8}$	424,5
Diacétoxyscirpénol DAS	ОН	OAc	OAc	Н	Н	C ₁₉ H ₂₆ O ₇	366,41
Nivalénol NIV	ОН	ОН	ОН	ОН	=O	$C_{15}H_{20}O_7$	312,32
Déoxynivalénol DON	ОН	Н	ОН	ОН	=O	$C_{15}H_{20}O_{6}$	296,36

Figure 8 : Structure chimique générale des principaux trichothécènes des groupes A et B.

Les Fusarium sporotrichioides, F. poae (tricinctum) et F. equiseti sont les principales espèces qui produisent les trichothécènes du groupe A. Les principaux représentants de ce groupe sont la toxine T-2 (T-2) et la toxine HT-2 (HT-2); la toxine T-2 est considérée comme étant la molécule la plus toxique (Pfohl-Leszkowicz, 2001).

Les trichothécènes du groupe B sont produites, principalement, par *Fusarium* graminearum, F. nivale et F. culmorum. Les principales mycotoxines du groupe B sont le nivalénol (NIV) et le déoxynivalénol (DON). Le déoxynivalénol (encore appelé) vomitoxine est reconnu comme la mycotoxine la plus répandue (DiMello *et al.*, 1997).

Les trichothécènes de groupes A et B peuvent être produites, aussi, par d'autres espèces de *Fusarium* : les *F. acuminatum* et *F. sambuccinum* produisent des trichothécènes du groupe A et *F. croockwellense* des trichothécènes du groupe B. Le groupe C réuni des trichothécènes produites par les espèces des genres *Trichoderma* et *Trichothecium*.

Les trichothécènes du groupe D sont produites par les espèces des genres *Myrothecium* et *Stachybotrys*; les trichothécènes de ce groupe, les plus connues, sont la roridine, la verrucarine et les satratoxines (DiMello *et al.*, 1997; Placinta *et al.*, 1999).

> La contamination des aliments

Les trichothécènes sont largement répandues dans les régions tempérés et humides.

La toxine T-2 (T-2) est produite sur les céréales dans de nombreuses parties du globe et sa présence est, habituellement, associée à une période prolongée d'humidité, pendant la moisson. La toxine T-2 et la toxine HT-2 se retrouvent souvent dans l'avoine.

Le déoxynivalénol (DON) contamine diverses céréales, en particulier le maïs et le blé, mais il a également été détecté, en teneur plus faible, dans d'autres céréales comme l'orge, l'avoine, le seigle et le riz. (Tableau 3)

Les trichothécènes sont essentiellement présentes dans les aliments à base de maïs, destinés à l'alimentation humaine et animale. Le DON est la mycotoxine la plus répandue dans les céréales et elle est, souvent, retrouvée dans les farines, les pâtes et les céréales (Tableau 4).

Tableau 3 : Présence de trichothécènes dans les céréales.

Pays	Céréale	Trichothécènes	Niveau de contamination (µg/kg)	Références	
	Seigle	DON	0,5-64,6	Gang (1998)	
		NIV	17,6-30,4	Guing (1990)	
Allemagne		DON	167-735		
Anemagne	Blé	3-ADON	948	Müller (2001)	
	DIC	NIV	2-73	Withier (2001)	
		DAS	17		
		DON	18-25	C -1111	
	Avoine	T-2	6-11	Schollenberger	
		HT-2	5-23	(2005)	
D 1 .	D17	DON	180	V 1 1 (100c)	
Bulgarie	Blé	T-2	55	Vrabcheva (1996)	
		DON	2850		
Chine	Blé	NIV	578	Li (2002)	
		15-ADON	59-1800		
Corée	Maïs	DON	0-1500	Abbas (2002)	
Etats Unis	Blé, Orge et Avoine	DON	100-600	MacDonald (2004)	
Ethiopie	Orge, Sorgho et Blé	DON	40-2340	Ayalew (2006)	
France	Maïs	DON	100-213	Garon (2006)	
Trance	IVIAIS	T-2	12-30	Garon (2000)	
Inde	Maïs	DON	17-21	Jabnardhana (1999)	
		DON	21		
Indonésie	Maïs	NIV	49	Norhayati (1998)	
Maniana	Maïa	T-2	7	Dahlada (2001)	
Mexique	Maïs			Robledo (2001)	
NT: Cot.	M.e.	DON	226,2	A deinos (2007)	
Nigérie	Maïs	3-ADON	17,3	Adejumo (2007)	
		DAS	16		
		HT-2	115		
	Avoine	T-2	60		
		DON	104		
		NIV	56		
N	Orge Blé	HT-2	73	1 (1000)	
Norvège		T-2	85	Langseth (1999)	
		DON	155		
		NIV	30	_	
		HT-2	20		
		T-2	20		
		DON	53		
	Blé	DON	0-950	Kryszinska-Traczyc	
Pologne		NIV	0-1280	(2001)	
	Orge	DON	0,1-156,6	Perkowski (1998)	
		DON	880		
Roumanie	Blé	3-ADON	66		
		15-ADON	150		
		T2	13		
		DON	890	Curtui (1998)	
	Maïs	3-ADON	180		
		15-ADON	620		
		T-2	63		
		DAS	2,6		
			0-860	m . 1	
Russie	Blé, Orge et Seigle	DON	0-910	Tutelyan (2004)	
			0-1110		
Uruguay	Orge	DON	1900-10000	Pan (2007)	

Tableau 4 : Présence de trichothécènes dans des produits à base de céréales.

Pays	Echantillon	Trichothécènes	Niveau de contamination (µg/kg)	Références			
Danemark	Farine de blé Farine de Seigle	DON	191 99	Rasmunssen (2003)			
Etats Unis	Farine d'avoine Blé Orge	DON	1 180 65	Ngundi (2006)			
Italie	Pain pâtes biscuits Céréales petit déjeuner	DON	7-930	Cirillo (2003)			
Portugal	Céréales petit déjeuner	DON	103-6400	Martins (2001)			
	Aliments composés pour les animaux						
Slovaquie	AC volailles	DON 3-ADON 15-ADON DAS T-2 HT-2	0-1230 0-1497 0-229 0-5 0-130 0-173	Labuda (2006)			

Les *Fusarium* sont des espèces endophytes. Elles peuvent se développer sur des plantes vivantes où elles produisent des mycotoxines. Le trichothécènes, tout comme les fumonisines, ne sont transférées que de manière très limitée à la viande, au lait et aux œufs ; la contribution de la nourriture d'origine animale à l'exposition totale de l'homme à ces toxines est donc insignifiante (Tobias *et al.*, 1992).

I.3.6 L'effets toxiques des trichothécènes

I.3.6.1 Les Trichothécènes du groupe A

De nombreuses études menées en toxicologie ont été réalisées avec la toxine T-2. On estime que la toxicité de la HT-2 est équivalente à celle de la T-2.

Les effets observés lors d'étude de la toxicité aiguë chez l'animal sont principalement des symptômes non spécifiques tels que la perte de poids, la perte d'appétit, des dermatites, des vomissements, des diarrhées, des hémorragies et des nécroses de l'épithélium gastrique et intestinal et de la moelle osseuse, de la rate, des testicules et des ovaires (Coppock *et al.*, 1985). L'organe cible de la toxine T-2, après exposition à une ou plusieurs doses, est le tissu hématopoïétique, dans la moelle osseuse (Diaz et Boermans, 1994, Harvey *et al.*, 1994).

Les études de toxicité subchronique, chez le rat, la souris, le porc et le singe, rapportent des modifications hématologiques et immunologiques (Vidal, 1990). Les effets hématotoxiques se manifestent par des leucopénies qui apparaissent après exposition à ces trichothécènes, chez de nombreuses espèces.

L'apparition d'hémorragies est un des symptômes caractéristiques des intoxications par les trichothécènes chez le rat, la souris, le porc, les bovins, les ovins et l'Homme. Ces hémorragies sont dues à une diminution du nombre de plaquettes dans le sang circulant et à des dysfonctionnements de celles-ci (Coppock et al., 1989; Gentry et al., 1984).

La myélotoxicité concerne des troubles, induits sur la formation des cellules sanguines, lors de l'hématopoïèse. Les atteintes de la moelle osseuse, par ces trichothécènes, ont été rapportées chez plusieurs espèces (mouton, souris, poulet et cobaye). Elles sont caractérisées par des hypoplasies, résultant de la nécrose des cellules médullaires. Dans tous les cas, la toxine T-2 présente l'effet le plus myélotoxique des trichothécènes (Wang et al., 1998).

Concernant les effets immunotoxiques, l'exposition aux trichothécènes du groupe A induit une diminution du nombre de splénocytes, de thymocytes, de lymphocytes circulants et une déplétion des lymphocytes B, dans le foie foetal de souris. Les effets immunotoxiques de la toxine T-2 sont attribués à la déplétion du nombre de lymphocytes T due au dysfonctionnement des macrophages liés aux lymphocytes T (Pestka et Bondy, 1994; Oswald et Comera, 1998; Islam et al., 1998)

Dans les études de toxicité chronique et de cancérogenèse, des lésions de l'oesophage ont été rapportées, chez la souris et le rat. Une augmentation de l'incidence d'adénomes pulmonaires et hépatocellulaires et une hyperplasie de l'épithélium gastrique dosedépendante ont également été décrites aux plus fortes doses testées (Coulombe, 1993).

Les études visant à rechercher des effets génotoxiques de ces trichothécènes présentent des résultats contradictoires et ne permettent pas de conclure quant à leur génotoxicité.

I.3.6.2 Les Trichothécènes du groupe B

Les effets toxiques observés dans les études de toxicité aiguë et subaiguë sont des vomissements, des refus de s'alimenter, des pertes de poids et des diarrhées. Après intoxication aiguë, une nécrose tissulaire est observée, au niveau du tractus intestinal, de la moelle osseuse et des tissus lymphoïdes (Marpegan et al., 1988).

Lors des études de toxicité subchronique, par voie orale, les effets indésirables sont observés : une réduction de la consommation alimentaire, une diminution du gain de poids et des perturbations de certains paramètres sanguins dont le taux d'immunoglobulines sériques (Zhou *et al.*, 1998 ; Yamamura *et al.*, 1989 ; Li *et al.*, 1997 ; Li *et al.*, 2000).

Les effets immunotoxiques de l'exposition aux trichothécènes du groupe B se traduisent par une réduction du nombre des cellules des différentes lignées cellulaires immunitaires ainsi qu'une baisse de la résistance à l'infection (Hinoshita *et al.*, 1997 ; Oswald et Comera, 1998 ; Pestka et Bondy, 1994 ; Ouyang *et al.*, 1996).

Une diminution de la mobilité des cellules sanguines, due à une myélotoxicité, est également décrite avec les trichothécènes du groupe B. Cependant, ces troubles hématologiques semblent avoir une amplitude plus faible que ceux induits par les trichothécènes du groupe A (Bennett et Klich, 2003).

Matériels et Méthodes

II. Matériels et méthodes

Notre étude s'inscrit dans la continuité d'un travail précèdent réalisé dans le cadre d'un Magister, en 2010.

Dans ce travail, en vue d'une valorisation des huiles essentielles, nous avons contribué à une meilleure connaissance et caractérisation de leur composition chimique, de la partie aérienne de *Rhanterium adpressum*, ainsi qu'à une évaluation de leur pouvoir antifongique et antimycotoxinogène. En résumé, nous avons exposé des champignons toxinogènes à un stress, en utilisant des huiles essentielles, afin de limiter leur développement et inhiber la production de mycotoxines Trichothécènes de type B. Egalement, cinq biomolécules antifongiques volatiles actives (l'α-Pinène, le β-Myrcène, le Limonène, le Géraniol et le Linalool) ont été évaluées. Quatre espèces fongiques du genre *Fusarium* ont été choisies du fait de leur prévalence sur les cultures, les graines stockées, de leur toxicité envers l'Homme et les animaux ; donc des pertes économiques qu'elles causent.

II.1 Les Matériels

II.1.1 Le matériel végétal (huiles essentielles testées)

Le Rhanterium adpressum est une espèce appartenant à la famille des Astéracées (composées) (Bouheroum et al., 2007). Cette famille d'Astéracées est la plus grande du monde végétal, avec environ 25000 espèces réparties dans 1300 genres, distribuées sur toute la planète (Bremer, 1994). La plupart des membres d'Asteraceae sont herbacés, mais un nombre important sont également des arbustes et des arbres. La famille, cosmopolite, est la plus commune dans les régions arides et semi-arides des latitudes subtropicales et basses tempérées (Barkley et al., 1993).

En Algérie, cette espèce est généralement propagée au Sahara (Ain-Sefra, Ghardaïa, Laghouat, Elgoléa, Bousaada et Biskra) (Battandier et Trabut, 1988; Ozenda,1958). C'est une plante spontanée qui pousse sous les climats aride et semi-aride; elle est commune dans tout le Sahara (Bouheroum et al., 2007). Elle est généralement connue sous l'appellation "ârfedj" ou "aarfedj". Elle est très appréciée par les dromadaires. La partie aérienne de Rhanterium adpressum est utilisée par la population locale pour le tannage, en médecine populaire comme un antidiurétique et traditionnellement utilisé avec une autre plante appelée Haplophyllum tuberculatum pour traiter les douleurs d'estomac (Bouheroum et al., 2007). Selon Yaghmai et Kolbadipour (1987), les indigènes du nord-est de l'Iran emploient localement cette plante pour son effet refroidissant de la peau.

II.1.1.1 La description botanique

Le Rhanterium adpressum, illustré dans la Figure 9, est un arbuste très ramifié, pouvant atteindre 20 à 60 cm de hauteur. Les feuilles sont de couleur vert pale, sessiles, alternes, petites, épineuses, dentées avec des branches monocéphalique. Les jeunes feuilles sont d'abord appliquées, comme des écailles contre la tige, puis, en grandissant, elles s'en écartent. Les fleurs jaunes, disloquées ; ligules femelles tri-dentées, fleurons hermaphrodites à 5 dents, échelles qui se chevauchent et canaux cylindriques, étroits, avec 4-5 épines (Battandier et Trabut, 1902). Ces fleurs jaunes lumineuses sont en capitule et les bractées de l'involucre sont recourbées vers l'extérieur. Les capitules comportent une rangée de fleurs ligulées. L'odeur des fleurs est aromatique. Elle est intense et caractéristique (Yaghmai et Kolbadipour, 1987).



Figure 9 : Photos illustrant *Rhanterium adpressum*.

a. Le pied de Rhanterium; b. Les fleurs

II.1.1.2 La reconstruction phylogénétique

Afin de mettre l'accent sur l'histoire phylogénétique du *Rhanterium adpressum* avec d'autres espèces de la tribu *Inuleae*, une reconstruction de l'arbre phylogénétique a été réalisée.

La reconstruction phylogénétique était basée sur les séquences de NADH déshydrogénase F (ndhF) provenant de sept plantes spontanées d'Asteraceae : (i) des plantes du Sahara algérien (Rhanterium adpressum, Rhanterium suaveolens, Pulicaria laciniata, Perralderia coronopifolia, Pulicaria mauritanica et Inula conyzae) (Battandier et Trabut,1988 ; Chehma et al., 2005) et (ii) une plante de la péninsule arabique (Rhanterium epapposum) (Awad et Abdelwahab, 2016).

Les séquences nucléotidiques de ndhf de GenBank ont été alignées par CLUSTALW avec Gap Open Penalty de 15 et la matrice de notation IUB. L'arbre phylogénétique a été construit en utilisant la méthode de Neighbor-Joining (Saitou et Nei, 1987).

Les distances évolutives ont été estimées en utilisant la méthode Maximum Composite Likelihood (Tamura *et al.*, 2004) et se situent dans les unités du nombre de substitutions de base par site. Toutes les positions contenant des lacunes (Gaps) et des données manquantes ont été éliminées. Des analyses évolutives ont été menées dans MEGA6 (Tamura *et al.*, 2013).

II.1.1.3 La classification systematique de la plante

Nous avons établi la systématique de *Rhanterium adpressum* selon *Angiosperm Phylogeny Group (APG II)*

• **Règne** : *Plantae*

• Embranchement : Spermaphytes (plantes à graines)

• Sous embranchement : Angiospermes (plantes à fleurs)

• Classe : Magnolipsida (Dicotylédones)

• Sous classe: Magnoliidae

• Super ordre : Asterids

• Ordre: asterales

• Sous ordre : Euasterids II

• Famille : Asteriaceae (Compositeae)

• **Genre** : *Rhanterium*

• Espèce: Rhanterium adpressum Coss. & Durieu

• Nom commun: "aarfedj" ou "ârfedj"

II.1.1.4 La répartition géographique

Le genre *Rhanterium* couvre sept espèces réparties dans le monde : l'Afrique du Nord-Ouest, le centre de l'Asie, l'Irak et l'Iran (Figure 10). Parmi ces espèces compte *Rhanterium adpressum* Cosson & Durieu. Il est endémique en Algérie et au Maroc (El Oualidi, 2012). Cinq espèces ont été identifiées : *R. adpressum*, *R. epapposum Oliver*, *R. suaveolens* Desf, *R. squarrosum* et *R. intermedium*, rapportée comme étant une espèce hybride entre *R. adpressum* et *R. suaveolens* Desf (Kala *et al.*, 2009 ; Oueslati *et al.*, 2005 ; Yaghmai et Kolbadipour, 1987 ; Wiklund, 1986).

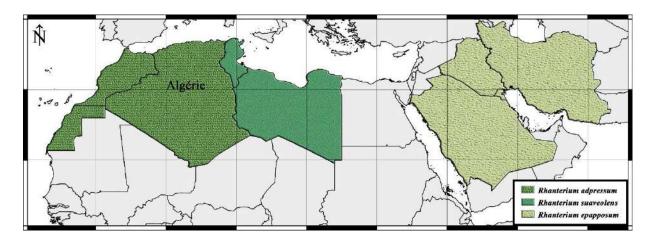


Figure 10 : Répartition géographique du genre Rhanterium. Carte réalisée avec le logiciel QGIS 2.10.1.

II.1.1.5 La collecte de la plante

Afin d'approfondir la connaissance des constituants chimiques des huiles essentielles des feuilles et des fleurs du *R. adpressum* et mettre en évidence l'existence des groupes chimiques (chémotypes), une étude détaillée a été réalisée dans une aire (spatio temporaire) plus large que celle adoptée dans notre travail de Mgister.

Dans un premier temps, une collecte a été faite, selon l'espace, mettant en œuvre Trentecinq (35) échantillons répartis sur quatre localités différentes du sud algérien et durant le mois de Mai de l'an 2010 : Laghouat (400 Km sud d'Alger), Zelfana (670 Km sud d'Alger), Ouargla (dans le sud-est d'Alger à 800 Km), El-Goléa (dans le sud-ouest, à 900 Km d'Alger) (Figure 11). Ces échantillons sont de deux types : les feuilles (20 échantillons) et les fleurs (15 échantillons).

Dans un second temps, une autre collecte a été faite dans le temps afin de suivre la variation saisonnière de la composition chimique en huiles essentielles ainsi que leurs activités. Les parties aériennes, feuilles et fleurs, de *R. adpressum* ont été collectées durant trois mois différents (avril, mai et juin), pendant trois années successives (2011, 2012 et 2013) par le Pr Yousfi Mohamed. L'échantillonnage a eu lieu dans la région de Zelfana (Wilaya de Ghardaïa).

L'identification de la plante a été faite par Pr Chehma Abedelmajid (Université de Ouargla, Algérie).

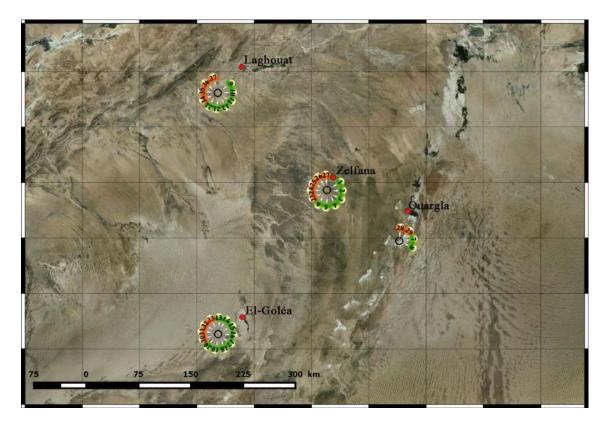


Figure 11 : Les sites de collectes des échantillons de *R. adpressum*, En orange (les échantillons de fleurs) ; en vert (les échantillons de feuilles). Carte réalisée avec le logiciel QGIS 2.10.1.

II.1.1.6 La Description des localités de collecte

Les informations, concernant la situation géographique et l'étage bioclimatique des localités de collecte, sont présentées dans le tableau ci-après.

Tableau 5 : La situation géographique et l'étage bioclimatique des localités de collecte, selon "Atlas Mondial Microsoft Encarta, 2015".

Région	Altitude	Latitude	Longitude	Etage bioclimatique
Laghouat	788 m	38°48'00.00" N	2°52'00.00" E	Chaud et aride
Zelfana (Ghardaïa)	354 m	32°23'46.70" N	4°13'34.40" E	Chaud et aride
Ouargla	137 m	31°57'46.72" N	5°20'31.17" E	Chaud et aride
EL-Goléa	398 m	30°35'45.99" N	2°52'54.73" E	Chaud et aride

II.1.1.7 La conservation de la plante

Les échantillons fraîchement collectés ont été séchés à température ambiante et à l'abri de la lumière et de l'humidité, dans un endroit sec et aéré. Les échantillons sont retournés, chaque jour, surtout au début du séchage, afin d'éviter les moisissures, puis stockés soigneusement dans des boites en carton propres. La plante est scindée en deux parties : les fleurs, d'une part, et, d'autre part, les feuilles. Chaque partie a été broyée manuellement avec un mortier.

Linalool

Géraniol

II.1.2 Les composés chimiques bioactifs testées (composants d'huiles essentielles)

Des produits synthétiques (composants existant dans notre huile essentielle) bioactifs purs, sous forme liquides, ont été testés dans l'ensemble de l'étude sur nos souches phytopathogènes. Ils nous ont été fournis gracieusement par Monsieur Fleurat-Lessard Francis de L'institut National de la Recherche Agronomique INRA, Bordeaux (France). Leurs caractéristiques sont résumées dans le tableau ci-après.

Composés	Formule brute	Degré de pureté	Densité	Masse molaire	% dans huile essentielles
α-Pinène	$C_{10}H_{16}$	≥ 95%	0,86	136,23 g/mol	10
β-Myrcène	$C_{10}H_{16}$	/	0,80	136,24 g/mol	10
Limonène	$C_{10}H_{16}$	97%	0,84	136,23 g/mol	5

>97%

98%

0,86

0,88

154,25 g/mol

154,25 g/mol

4

Tableau 6 : Les produits purs testés et leurs principales caractéristiques.

II.1.2.1 L'α-Pinène et le β-Myrcène

 $C_{10} H_{18}O$

 $C_{10}H_{18}O$

Les alpha et bêta pinène (Merck, Germany) sont des monoterpènes bicycliques isomères. Ils ont la même formule brute ($C_{10}H_{16}$) mais avec formule développée différente. Ces terpènes sont des liquides incolores, solubles dans l'éthanol et insolubles dans l'eau. Ils ont des fragrances différentes. Ils sont présents dans de nombreuses plantes. On les trouve également dans l'essence de térébenthine. Ils sont connus pour leurs propriétés antiseptiques et sont très utilisés dans les désodorisants, les parfums d'intérieur et les produits d'entretien.

L'industrie pharmaceutique a souvent recours à ces molécules efficaces pour le traitement des affections respiratoires (rhume, toux et bronchite). Ils sont, aussi, utilisés en médecine pour leurs propriétés mucolytiques, expectorantes, anti-inflammatoires et antiseptiques. Les terpènes alpha et bêta pinène ont déjà fait l'objet d'études d'activités antifongiques sur différents champignons (Fleurat-Lessard *et al.*, 2014).

II.1.2.2 Le Limonène

Le limonène (Merck, Germany) est un hydrocarbure terpénique ($C_{10}H_{16}$) présent dans de nombreuses huiles essentielles, à partir desquelles il peut être extrait par distillation. A température ambiante, c'est un liquide incolore à odeur forte, fraîche et acidulée ; caractéristique des agrumes (famille des *Rutaceae*). C'est un composé de deux formes isométriques (le d- et l-limonène). Le d-limonène est un constituant naturel dans certaines plantes, arbres, légumes et fruits (particulièrement présent dans les agrumes). Le l-limonène, quant à lui, est, surtout, retrouvé dans les huiles de pin, de térébenthine et de la menthe.

Le limonène est notamment utilisé en parfumerie, dans l'industrie agroalimentaire ainsi que dans l'industrie pharmaceutique, pour parfumer les médicaments. Il est également utilisé dans les produits nettoyants pour son odeur rafraîchissante orange-citron et son effet dissolvant. L'utilisation du limonène est très fréquente dans les produits cosmétiques. Plusieurs études ont testé le Limonène pour ses propriétés antifongiques (Fleurat-Lessard *et al.*,2014; Krishna-Kishore *et al.*, 2007; Barrera-Necha *et al.*, 2009; Banihashemi et Abivardi, 2011).

II.1.2.3 Le Linalool et Le geraniol

Le linalol (ou linalool) et le Geraniol (Merck, Germany) sont des alcools terpénique (C₁₀H₁₈O; monoterpènes). Comme exposé précédemment, les terpènes sont des hydrocarbures formés à partir d'unités pentacarbonées. Ces alcools tertiaires sont insaturés. ILs ont une odeur très agréable, apparaissent comme des huiles claires à jaune pâle, insolubles dans l'eau, mais solubles dans la plupart des solvants organiques. On les retrouve notamment dans les HE. Ils sont utilisés en parfumerie, en cosmétique, dans les produits ménagers et en tant que saveur en agroalimentaire (OECD, 2001). Comme les autres produits, le linalol et le géraniol ont fait l'objet de plusieurs études, pour leurs activités antifongiques (Fleurat-Lessard *et al.*, 2014; Krishna-Kishore *et al.*, 2007; Pattnaik *et al.*, 1996; Banihashemi et Abivardi, 2011).

II.1.3 Les souches fongiques mycotoxinogène

Les souches fongiques, des champignons filamenteux, ayant fait l'objet de cette étude ont été gracieusement fournies par l'unité de recherche 1264 MycSA de l'institut national de recherche agronomique (INRA) bordeaux, France et par notre collègue Touati-Hattab Sihem.

Notre choix s'est porté sur quatre souches du genre *Fusarium*, un champignon phytopathogène mycotoxinogène, en raison des dégâts qu'il cause sur des céréales. Dans notre étude, nous avons choisi de travailler sur ces souches, après avoir fait des tests préliminaires sur 12 souches les plus virulentes, sept souches de *F. culmorum* (INRA 124, INRA 337, INRA 305, INRA 319, INRA 117, BD17 et T5) et cinq souches de *F. graminearum* (INRA 156, INRA 812, INRA 349, INRA 91, INRA 214).

Deux isolats de *Fusarium graminearum*, de la collection mycothèque de l'INRA-France et deux isolats de *Fusarium culmorum* algériens de la mycothèque de Touati-Hattab Sihem.Tous ces isolats sont, référencés (Tableau 7). Ces souches ont une grande capacité à produire les Trichothécènes de type B, le critère primordial de sélection.

Espèce	Code	Origine	Toxines TCTB		
Fusarium	INRA 349	Appartient à la collection CBS CBS 185.32 (Centraal Bureau voor Shimmelkulturen, Netherlands)	Chémotype DON/15-ADON		
graminearum	INRA 812	Appartient à la collection Fungal Genetic Stock Center PH-1, NRRL 31084 (Michigan, États-Unis)	Chémotype DON/15-ADON		
Fusarium	BD17	Rouiba (Nord de l'Algérie)	Chémotype DON/3-ADON		
culmorum	T5	Oued Smar (Nord de l'Algérie)	Chémotype NIV / FX		

Tableau 7 : Codes, origines et Chémotypes des souches fongiques étudiées.

Le genre *Fusarium* regroupe les champignons filamenteux imparfaits, les Deutéromycètes; ils se multiplient de façon asexuée (conidies). Certaines espèces de ce genre sont parfaites (téléomorphes; à reproduction sexuée, classe des *Ascomycètes*, famille des Nectriaceae. Le genre *Fusarium* est le plus représenté sur le blé avec une contamination lors de la culture aux champs. La période critique de contamination commence à l'épiaison et dure quelques jours. Pendant cette période, les conditions climatiques (humidité et température) ont un rôle important sur le niveau d'infection (Suton, 1982; Thèse Merhej, 2010).

En effet *F. graminearum* possède une forme sexuée *Gibberella zeae* (téléomorphe). Cependant, chez *F. culmorum*, la forme parfaite n'a jamais été observée. Leurs spores (conidies) sont cloisonnées et en forme de fuseau d'où leur nom (du latin *Fusus*) (Cardiet, 2010).

L'identification des espèces de *Fusarium* est basée sur un grand nombre de caractères, morphologiques et non-morphologiques, incluant la virulence; ce qui en fait un groupe hétérogène et polyphylétique (Goswami et Kristler, 2004; Wagacha et Muthomi, 2007).

Les TCT sont des sesquiterpènes (Figure 12), caractérisés par une double liaison en C9-10 et un groupement époxyde en position C12-13, responsable de leur toxicité. De plus, la catégorie B renforce leur toxicité par leur caractère amphiphile, permettant de traverser les membranes plasmiques et d'interagir, ainsi, avec certains organites (mitochondries et ribosomes) et d'affecter les fonctions immunitaire, reproductrice, hépatique et nerveuse (Anses, 2009).

Dans les espèces *F. graminearum* et de *F. culmorum*, les souches ont différentes capacités à produire des TCTB (forte/faible et spécificité de production). D'où le classement en trois groupes, appelés chémotypes, selon le type de fusariotoxine produite.

La voie de biosynthèse est contrôlée par une quinzaine de gènes identifiés, appelés gènes *Tri* (15 répartis dans un cluster et des loci particuliers). La production de mycotoxines est considérée comme un élément de réponse à un environnement plus ou moins hostile (Goswami et Kistler, 2004; Wagacha et Muthomi, 2007).

Dérivés	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	16 9 0 2
Deoxynivalenol (DON)	ОН	Н	ОН	ОН	,0,
3-acetyl deoxynivalenol (3ADON)	O-CO-CH₃	Н	ОН	ОН	8 7 8 3 5
15-acetyl deoxynivalenol (15ADON)	ОН	Н	O-CO-CH₃	ОН	15 CH ₂
Nivalenol (NIV)	ОН	ОН	ОН	ОН	14
Fusarenone (FX)	ОН	O-CO-CH₃	ОН	ОН	R ³

Figure 12 : Structure chimique des Trichothécènes de type B.

Les espèces *F. graminearum* et *F. culmorum* sont prédominantes, du fait de leur développement dans les régions tempérées (25 à 27°C et 22 à 25°C, respectivement). Elles causent des maladies regroupées sous le terme "fusariose". Ils se développent, notamment, sur les céréales (maïs, orge et blé) et provoquent des pertes de rendement et de qualité pré- et post-récolte (Anses, 2009). En effet, ils survivent durant l'hiver sous forme saprophytique sur des débris végétaux contaminés ou dans le sol, puis quand les conditions deviennent favorables, ils infectent les nouvelles cultures. Le stade de la floraison est le plus sensible à l'infection par les spores, mais le succès de celle-ci dépend des facteurs climatiques (Goswami et Kristler, 2004; Wagacha et Muthomi, 2007).

II.2 Les méthodes expérimentales

L'ensemble du travail que nous avons mené dans cette étude se structure comme illustré dans l'organigramme ci-après. Après la collecte de la plante, nous avons procédé à l'extraction des huiles essentielles par hydrodistillation. Par la suite, nous avons (i) établi la composition chimique afin de déterminer les groupes chimiques (chémotypes); (ii) puis testé le pouvoir antifongique sur deux milieux, solide et liquide; (iii) effectué le dosage de la production des mycotoxines Trichothécènes de type B afin de détecter l'effet de nos huiles essentielles et des produits bioactifs sur la croissance mycélienne et la production de toxines TCTB. Pour compléter l'étude, nous avons analysé la modulation de l'expression des gènes clés impliqués dans la biosynthèse des TCTB, après traitement avec les extraits naturels pur d'huiles essentielles (Feuilles et fleurs).

Figure 13 : Organigramme représentant les principales démarches expérimentales de notre travail.

II.2.1 L'extraction des huiles essentielles

L'extraction des huiles essentielles a été faite par hydrodistillation dans un appareil de type Clevenger, pendant une durée de 5 heures.

II.2.1.1 Le procédé d'extraction

Pour chaque plante, 200g de la partie aérienne (feuilles ou fleur) sont macérés dans de l'eau, dans un ballon de capacité de deux litres, pendant 24 heures. L'ensemble est placé dans le Clevenger, et porté à ébullition, à l'aide d'un chauffe-ballons multicapacité. En traversant un réfrigérant, les vapeurs chargées d'huile se condensent et décantent ; l'eau et l'huile se séparent par différence de densité.

Les hydrodistillats obtenus sont mesurés (en ml par Kg de matériel végétal) et séchés par du sulfate de sodium anhydre (Na₂SO₄) afin d'éliminer toutes trace d'eau. Après les avoir récupérées, les huiles essentielles sont conservées, dans des tubes en verre bien scellés et recouverts d'aluminium, au réfrigérateur à 5°C et à l'abri de la lumière (protection contre la chaleur, l'évaporation et la lumière).

II.2.2 L'analyse chromatographique

Les huiles essentielles des différents échantillons sont analysées par chromatographie en phase gazeuse (CPG), puis par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CG/SM) (Keravis, 1997 *in* Lahlou, 2004).

II.2.2.1 Les conditions opératoires de la CPG

La séparation des composés de l'HE a été effectuée à l'aide d'un chromatographe de type Agilent technologies 7890A, équipé d'une colonne capillaire HP5 (30 m × 0,32 mm), avec une épaisseur de film 0,40 μm et d'un détecteur d'ionisation de flamme (FID). La programmation de la température du four était la suivante : maintenue initialement à 80°C pendant 2 min ; varie de 80 à 200°C à raison de 5°C/min puis maintenue à 200°C pendant 5 min ; par la suite, elle augmente de 200 à 260°C, à raison de 20°C/min et maintenue pendant 5 min à 260°C. Les températures d'entrée et du détecteur sont de 280°C. L'hydrogène a été utilisé comme un gaz vecteur à un débit constant de 1 ml/min. Les injections sont de 1μl d'huile essentielle dans du Chlorure de méthylène (50 mg d'HE dans 1 ml de CH₂Cl₂).

Les indices de rétention linéaire sont calculés par rapport aux n-alcanes (C₈-C₂₆) standards.

II.2.2.2 Les conditions opératoires de la CG/SM

L'analyse GC-MS a été effectuée à l'aide d'un chromatographe de type Agilent Technologies 7890A, équipé d'une colonne capillaire HP5MS (30 m \times 0,25 mm \times 0,25 μ m), couplé à un spectromètre de masse MS 5975C VL MSD. L'hydrogène a été utilisé comme gaz vecteur à un débit de 1 ml/min, split 50 :1. Le programme de température du four était comme suit : maintenue initialement à 80°C pendant 2 min ; varie de 80 à 200°C à raison de 5°C/min ; puis maintenue pendant 5 minutes à 200°C ; par la suite on l'augmente de 200 à 260°C, à raison de 20°C/min et maintenue durant 5 minutes à 260 °C.

II.2.2.3 L'identification des constituants

L'identification des constituants des huiles essentielles a été faite sur la base de la comparaison de leurs spectres de masse et les indices de rétention, à la co-injection des composés de référence ainsi qu'aux spectres de masse des constituants de deux bibliothèques Wiley et de NIST (le National Institute of Standards and Technology) (mis à jour Mars 2015) en comparant leurs indices lineaires avec ceux de la littérature (Lubeck et Sutton, 1983; Adams, 2007; Benzo et al., 2007 Goodner, 2008; Babushok et al., 2011; Khan et al., 2016).

II.2.3 L'analyse statistique multivariée

La classification ascendante hiérarchique (CAH) et l'analyse en composantes principales (ACP) des données chimiques ont été effectuées avec le logiciel XLSTAT 2014.5.03 et MINITAB® 17. Pour la CAH, la méthode de liaison de Ward a été utilisée pour déterminer les agglomérations et la distance euclidienne pour estimer la distance entre les groupes. Une matrice de corrélation a été utilisée pour estimer les principales composantes.

II.2.4 L'étude de l'activité antifongique

Différentes méthodes existent pour connaître l'action antifongique des HE, vis-à-vis des espèces fongiques (Zollo Amvam *et al.*, 1998). Les effets des deux extraits d'HE (feuilles et fleurs) et des cinq composés bioactifs disponibles, ont été évalués sur deux paramètres majeur :

- ✓ La cinétique de la croissance mycélienne en milieu solide ;
- ✓ Le taux d'inhibition du mycélium, qui a été évalué par deux méthodes (en milieu solide par la méthode de contact direct et en milieu liquide par la technique de microdilution utilisant des micro-plaques à 96 puits.

II.2.4.1 La préparation des souches fongiques

Afin d'ensemencer les milieux de culture, solide et liquide, un disque de gélose de 5mm de diamètre contenant du mycélium a été transféré sur du milieu PDA (Potatos Dextrose Agar) vierge (Annexe 1), au centre de chaque boite, à partir d'une culture pure préparée au préalable. L'incubation a été faite à 25 ± 2°C, durant 6 jours (Collin *et al.*,1991). Un autre milieu liquide CMC (Carboxyméthyl cellulose) (Annexe 2) a été utilisé pour favoriser la production des spores qui sert comme inoculum pour le milieu de culture MSL (synthétique liquide) (Annexe 3).

II.2.4.2 La préparation des composés bioactifs purs testés

Les dilutions ont été préparés par déduction, selon leurs proportions dans l'huile essentielle de *R. adpressum*. Les différentes concentrations (dilution) ont été préparées de la même manière que les dilutions d'huiles essentielles.

II.2.4.3 La cinétique de la croissance fongique sur milieu solide

La cinétique de la croissance des souches sélectionnées a été déterminée en mesurant le diamètre du thalle quotidiennement à la même heure, après avoir introduit les extraits d'HE et les doses des composés bioactifs, dans le milieu de culture, sur boite de Pétri et à différentes concentrations (de 0,5 à 20 µl/ml).

II.2.4.4 L'évaluation de l'activité antifongique sur milieu solide

L'activité des deux extraits d'HE (feuilles et fleurs), les composés bioactifs purs ou mélangés, sur le développement Mycélien, a été évaluée, en utilisant la méthode de contact direct, par le calcul du pourcentage d'inhibition du mycélium, après 7 jours d'incubation à $25 \pm 2^{\circ}$ (El Ajjouri *et al.*, 2008 ; Remmal *et al.*, 1993 ; Satrani *et al.*, 2001). Seuls les échantillons d'HE de la collecte de juin 2013 (feuilles et fleurs) ont été choisis pour les tests d'activité parce qu'ils ont présenté les rendements les plus élevés ; avec une composition chimique proche de celle des autres échantillons.

> En présence des huiles essentielles pures

Une mise en émulsion de l'huile essentielle a été préalablement réalisée, en utilisant une solution d'Agar Agar à 0,2 % (Remmal *et al.*, 1993 ; Satrani *et al.*, 2001) vue la non miscibilité à l'eau et donc aux milieux de culture. Elle permet d'obtenir, dans le milieu, une répartition homogène des composés et augmenter, au maximum, le contact entre le germe et les composés.

Le mode opératoire

Des dilutions d'HE sont préparées (de 1/10 au 1/1500), dans la solution d'agar, dans des tubes à essais contenant, chacun, 13,5 ml de milieu PDA gélosé, stérilisé à l'autoclave (20 min à 121°C) et refroidi à 45°C. On ajoute 1,5 ml de chacune des dilutions, de façon à obtenir les concentrations finales de 1/100 à 1/150000 (v/v). Puis les tubes ont été agités au vortex avant de les verser dans des boîtes de Pétri. Des témoins, contenant le milieu de culture et la solution d'agar à 0,2 %, sans HE, sont également préparés (El Ajjouri *et al.*, 2008).

L'ensemencement est rélisé par le dépôt d'un disque de gélose, contenant du mycélium, prélevé à partir de la périphérie du thalle provenant d'une culture de 7 j, sur PDA. Une culture sur milieu PDA, sans extrait, a servi de témoin. L'incubation des cultures a été faite à 25 ± 2°C, à l'obscurité et pendant 7 jours. Chaque essai est répété trois fois.

Les cultures sont notées au bout de 48 heures. Les diamètres de croissance ont été mesurés, quotidiennement, à l'aide d'un pied à coulisse pour suivre la cinétique de la croissance mycélienne.

L'effet de l'HE, sur la croissance fongique, a été noté après 6 jours de culture. L'effet fongicide est révélé par le fait que des repiquages, à partir de culture ayant fait objet d'inhibition, ne donnent aucune croissance après 7 jours d'incubation.

La lecture des résultats nous a permis de déterminer la CMI (la plus faible concentration en HE pour laquelle on n'observe pas de croissance, visible a l'œil nu, sur le milieu PDA, après 6 jours d'incubation.

> En présence des composés bioactifs purs

Afin de favoriser le contact champignon/composés bioactifs purs. Nous avons testé un par un l'effet de certains composés (l'α-Pinène, le β-Myrcène, le Limonène, le Linalol et le Géraniol) sur la croissance fongique des quatre souches étudiées, avec le même mode opératoire et dans les mêmes conditions qu'en présence d'HE.

A la lumière des résultats de l'identification des constituants chimiques de l'HE du *Rhanterium adpressum* (feuilles et fleurs), nous avons déduit leurs proportions dans notre huile afin de connaître les concentrations à tester.

> En présence d'un mélange des composés purs (les composés en mélange) :

Nous avons testé, séparement ou en mélange, cinq des composés de notre huile essentielle sur nos souches fongiques Dans le but d'évaluer la CI_{50} du mélange vis-à-vis des quatre souches, nous avons testé diverses dilutions (1/5, 1/10, 1/25, 1/50, 1/100 et 1/200).

Le calcul du pourcentage d'inhibition

Le pourcentage d'inhibition de la croissance fongique des HE, composés bioactifs et synergie entre les composés a été déterminé en comparant la croissance après le traitement avec celle du témoin, en utilisant la relation suivante :

$$I(\%) = \frac{(D_K - D_0)}{D_K} \times 100$$
 (Chang et al., 1999 in Cheng et al., 2008)

Où:

D_k : diamètre de la colonie mycélienne témoin, en centimètre ;

D₀ : diamètre de la colonie mycélienne dans l'expérience ;

T: taux d'inhibition de la croissance du mycélium (en %).

L'huile essentielle ou un composé bioactif est dit :

- ✓ Très actif, lorsqu'il possède une inhibition comprise entre 75 et 100 %; la souche fongique est dite très sensible;
- ✓ Actif lorsqu'il possède une inhibition comprise entre 50 et 75 %; la souche fongique est dite sensible;
- ✓ Moyennement actif, lorsqu'il possède une inhibition comprise entre 25 et 50% ; la souche est dite limitée ;
- ✓ Peu ou pas actif lorsqu'il possède une inhibition comprise entre 0 et 25%; la souche est dite peu sensible ou résistante (Alcamo, 1984; Rotimi *et al.*, 1988).

II.2.4.5 L'évaluation de l'activité antifongique sur milieu liquide

Les propriétés antifongiques des deux extraits d'HE (feuilles et fleurs) ainsi que celles des composés bioactifs, purs ou en mélange, ont été évaluées par la détermination du taux d'inhibition du mycélium sur milieu liquide, par la technique de microdilution (utilisation de micro-plaques à 96 puits). Un volume de 10μ1 d'inoculum, de chaque espèce fongique à 10⁶ spores/μ1, a été dilué dans un milieu de culture synthétique liquide (MSL). Après ensemencement, les plaques de microtitration ont été traitées avec des doses appropriées d'extraits d'HE afin d'obtenir des concentrations allant de 0,25 à 10 μ1/ml par puits (Fleurat-Lessard *et al.*, 2015). Chaque souche est testée sur la même microplaque pour les différentes concentrations, d'où l'utilisation d'un film transparent adhésif pour obturer les puits (maintien des concentration constantes en évitant la volatilité). Ensuite, l'ensemble est laissé à croître pendant 4 jours, à 25°C et à l'obscurité totale. Trois répétitions sont réalisées pour chaque traitement et chaque témoin.

L'évaluation de la croissance mycélienne est déterminée, par une comparaison de la croissance fongique avec celles des témoins inoculés sans traitement. L'activité antifongique est évaluée par la mesure directe de l'absorbance à 630 nm, immédiatement, à la fin de la période d'incubation; par une simple lecture spectrophotométrique (lecteur de microplaques Bio-TEK®instruments ELX 800, Allemagne).

II.2.4.6 La détermination des CMI et CI₅₀

Les CI50 et CMI ont été déterminées pour les deux extraits (feuilles et fleurs) et les composés bioactifs testés, pour toutes les souches sélectionnées et sur les deux milieux solides et liquide.

L'évaluation de la CI₅₀ et de la CMI a été réalisée avec le test dose-réponse de variable pente Hill à une probabilité d'erreur ≤ 0,05. Le traitement des données a été réalisé avec le logiciel Origin b9.3.226.

II.2.4.7 L'analyse de la production des mycotoxines TCTB des souches traitées

Afin de doser les toxines produites, en fonction du temps, par nos différentes souches fongiques et déterminer l'effet de nos HE et des produits chimiques bioactifs, nous avons utilisé un chromatographe en phase liquide à ultra performance (UPLC). Les mêmes extraits (collecte de juin 2013) ont été choisis pour cette analyse.

> L'extraction des mycotoxines

Les TCTBs ont été extraits à partir de 4 ml de milieu de culture synthétique liquide (MSL), récupérés après 4 jours d'incubation et centrifugés afin d'éliminer le mycélium, auxquels ont été ajoutés 2 volumes d'éthyle acétate. Après agitation par vortex (1 min) et décantation, 2 ml du surnageant ont été évaporés à sec sur un bloc chauffant, sous un flux d'azote et à 50°C. Les résidus secs ont été repris avec 1 ml de mélange méthanol /eau (50/50 v/v). Par la suite, ce mélange a été filtré à 0,45 μm puis analysé par UPLC (Ultra Performance Liquid Chromatography) couplées à un détecteur à barrettes diode (DAD) (Elhouiti *et al.*, 2017)

▶ Le dosage des mycotoxines TCTB par UPLC

La quantification des TCTB a été effectuée à l'aide d'un Shimadzu Chaîne UPLC de pointe, équipé de deux pompes LC-20 AD, un dégazeur DGU-20A3R, un échantillonneur automatique SIL-30AC et un détecteur diode SPD-M20A (Shimadzu Scientific Instruments, France).

La séparation a été réalisée sur une colonne Kinetex 2,6U XB-C18 100 Å (150×4,6 mm, 2,6 μm) (Phenomenex, France) maintenu à 45°C. La phase mobile était constituée d'eau acidifiée avec l'acide ortho-phosphorique pour atteindre un pH de 2,6 (solvant A) et acétonitrile (solvant B). Ce dernier a été utilisé pour l'élution : 7 % du solvant B pendant 1 min, 7-30 % du solvant B pendant 6 min, 30-90 % du solvant B pendant 2 min, 90 % du solvant B pendant 2 min, 90 % du solvant B pendant 1 min et 6 min. Puis un équilibrage post-marche avec les conditions initiales a été fait. Le débit a été maintenu à 0,7 ml/min pendant 18 min. L'injection du volume était de 0,5 μl. Les spectres UV-Vis ont été enregistrés de 220 à 550 nm et les zones des pics ont été mesurées à 230 nm. La quantification a été effectuée en utilisant un étalonnage externe allant de 6,25 à 100 μg/g préparé avec les solutions standards (Romer Labs, Autriche).

II.2.4.8 La détermination du taux de consommation d'oxygène des souches traitées dans une culture liquide (analyse dans un Oxymètre)

Les cultures se déroulent en plaque de 24 puits (2 ml de milieu synthétique liquide MSL). Au bout de 4 jours, à 25°C, l'ensemble est transvasé dans des tubes (2 ml) et centrifugés (10 min à 1000 rpm). Le surnageant est éliminé et remplacé par du milieu de culture frais, saturé en oxygène (q.s.p. 2 ml). La nouvelle culture, directement transvasée dans la chambre de l'oxymètre (Oxygraph®, Oxygen Electrode Control unit, Hansatech Instruments, England) et un volume d'HE est ajouté de manière à obtenir des concentrations finales de 0.25, 1, 2, 5 et 10 µl/ml. La consommation d'oxygène est mesurée en nmole/ml) pendant 20 minutes (logiciel Oxygraph® plus) et les Vitesses correspondantes (en nmole/seconde) en présence de l'HE sont estimées.

II.2.4.9 L'étude de l'expression des gènes

L'étude de l'expression génétique met en évidence l'effet des huiles essentielles de *R. adpressum* sur l'expression de plusieurs gènes impliqués dans la voie de la biosynthèse des TCTB (*Tri4*, *Tri5*, *Tri6*, *Tri12* et *Tri101*) ainsi que les deux gènes (*Mnsod 2.1* mitochondrial et *Mnsod 2.2* nucléique) responsables du stress oxydant. Cette étude nous permet d'évaluer les effets au niveau transcriptionnel impliqués dans l'inhibition de la biosynthèse par l'huile essentielle.

> L'extraction des ARN totaux

Les ARN totaux ont été extraits d'une culture fongique de *F. culmorum* et *F. graminearum* de 4 jours, dans un milieu de culture synthétique liquide (MSL) supplémenté ou non avec l'extrait d'huile essentielle. Trois réplications biologiques ont été préparées pour chaque état. Le mycélium lyophilisé a été broyé dans 1 ml de réactif TRIzol® (Invitrogen, Carlsbad, CA, États-Unis) en utilisant le Tissue Lyser System® (Qiagen, Venlo, Pays-Bas) pendant 2 min à 30 Hz (mouvement/s).

Les ARN totaux ont été extraits selon TRIzol® (Instructions du fabricant du réactif) (Annexe 4). Les éventuelles contaminations avec l'ADNc ont été éliminées après un traitement DNase. La qualité des ARN préparés a été vérifiée par électrophorèse sur gel d'agarose.

Après le traitement, Ces échantillons d'ARN ont été quantifiés par spectrophotométrie d'absorption moléculaire à 230 nm (détection des polysaccharides et des tampons contenus dans la solution), à 260 nm (pic de détection des acides nucléiques) et 280 nm (pic de détection des protéines). Les ratios DO₂₆₀/DO₂₈₀ et DO₂₆₀/DO₂₃₀ ont été utilisés comme indicateurs de pureté des extraits (Annexe 5). La quantification des échantillons d'ARN a été faite avec le spectrophotomètre pour micro-volumes Nanodrop ND 1000 (Labtech International, UK).

Nous avons réalisé, également, un contrôle de la qualité des ARN totaux, pour vérifier l'absence de RNases, par migration sur gel d'agarose à 2%. Après migration, la présence de deux bandes principales témoigne de l'intégrité des ARNr 18S et 28S; donc de l'intégrité des ARNm (Figure 14).

Afin de limiter les étapes de congélation/décongélation, manipulations déteriorant l'ARN, ces derniers ont été utilisés le jour même pour effectuer la réaction de transcription inverse.

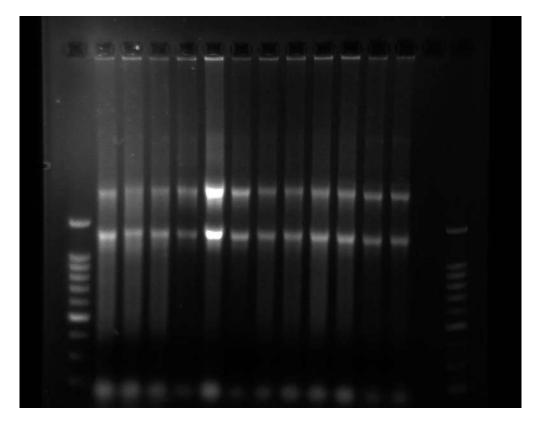


Figure 14: La migration de l'ARN sur gel d'agarose à 2 %.

➤ La Transcription inverse des ARN en ADNc (la RT-PCR)

Les ARN totaux (1 μg) ont été rétro-transcrits en ADNc en utilisant le système de synthèse de premier brin SuperScript III pour RT-PCR selon le protocole du fournisseur (Life Technologies SAS, Invitrogen) avec l'amorçage oligo dT, conformément aux instructions du fabricant (Annexe 6). Les transcriptions inverses ont été réalisées à l'aide du thermocycleur iCyclerTM (Bio-Rad, Richmond, CA, USA) suivant les instructions du fabricant (Invitrogen) (Figure 15). Les échantillons d'ADNc ont été conservés à -20 °C jusqu'à utilisation pour les analyses de PCR.

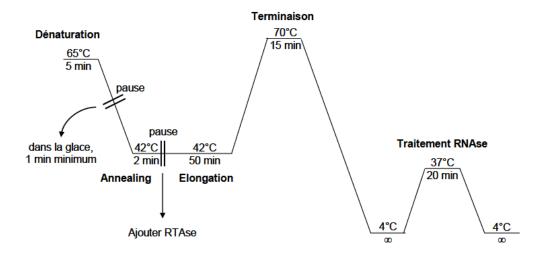


Figure 15: Etapes de transcription inverse.

➤ L'analyse par PCR classique

Les analyses par PCR classiques ont été réalisées à l'aide du thermocycleur iCyclerTM thermal cycling (Bio-Rad). Les réactions de PCR ont été réalisées dans des mélanges réactionnels de 25 μl contenant 1 μl de chaque échantillon d'ADNc (correspondant à 8 ou 10 ng d'ARN), 2,5 U de GoTaq® DNA polymerase (Promega), 3,5 mM MgCl₂, 0,5 mM de chaque dNTP, et 0,5 μM de chacune des amorces. Les amplifications de PCR ont été réalisées pendant 28 cycles. Les conditions de la PCR étaient : 94°C pendant 2 min, 28 x (95°C pendant 15 s, Tm de 56°C pendant 30 s, 72°C pendant 30 s) puis une conservation à 4°C. Les produits d'amplification ont été visualisés par électrophorèse sur gel d'agarose à 1,5 % (w/v).

L'analyse par PCR quantitative en temps réel

Les analyses de l'expression des gènes par PCR quantitative avec détection de fluorescence (SYBR® Green) ont été réalisées à l'aide du système LightCycler® LC2.0 équipé du logiciel LightCycler 4.0.5 (Roche Diagnostics, Rotkreuz, Suisse) (Montibus *et al.*, 2016; Ponts *et al.*, 2007).

L'abondance des transcrits des gènes d'intérêt a été évaluée en utilisant 1 µl de chaque préparation d'ADNc (correspondant à 8 ou 10 ng d'ARN totale) dans un volume réactionnel final de 10 µl en utilisant le kit de QuantiFast TM SYBR® PCR Green (Qiagen, Venlo, Les Pays-Bas).

Du MgCl₂ a été ajouté au mélange réactionnel PCR à une concentration finale de 4 mM. Les amorces (Tableau 8) ont été utilisées à une concentration finale de 1 μM.

Tableau 8: Gènes étudiés, Amorc	es utilisées pour ampl	lifier l'ADNc par P0	CRq en temps réel
--	------------------------	----------------------	-------------------

Gènes (accession No)	Séquence d'amorce (5'-3')	Séquence d'amorce reverse (5'-3')	Tm (°C)
UBH(FGSG_01231.3)	GTTCTCGAGGCCAGCAAAAAGTCA	CGAATCGCCGTTAGGGGTGTCTG	60
Tri4 (FGSG_03535)	TATTGTTGGCTACCCCAAGG	TGTCAGATGCGCCTTACAAA	60
Tri5 (FGSG_03537)	GACCCTAAGCGACTACAG	GTGCTACGGATAAGGTTC	60
Tri6 (FGSG_03536)	AGCGCCTTGCCCCTCTTTG	AGCCTTTGGTGCCGACTTCTTG	63
TRI10 (FG_3538)	GACGAGCTACAAAGGCTACC	CCTATGGTGATCCGTCAAGT	60
Tri12 (FGSG_03541)	ATTCGGTACATGGGCT	GCAGTGCTGTTCGTCA	60
Tri101 (FGSG_07896)	AGGGCATTAGCGAGGGAAACACA	ACGGCACGCCTTGGAGAGTAGAC	61
MnSOD1 (FGSG_04454)	CTCTCCCGATCTTCCCTAC	CGGGTAACGATGGACAGAGT	62
MnSOD2 (FGSG_02051)	TTGCGTATCGTTACCACCAA	TCAACATAGGCAGCCTTTCC	60

Les analyses ont été réalisées en triplicats. Les amplifications de PCR quantitative ont été réalisées pendant 45 cycles. Les conditions de la PCR sont présentées dans la Figure 16, selon les conditions recommandées par le fournisseur (Qiagen).

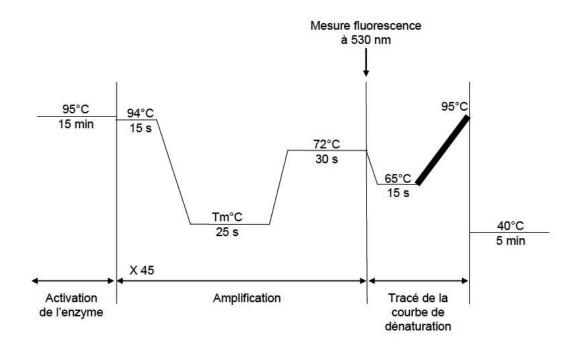


Figure 16 : Etapes des amplifications de PCR quantitative.

La Taq polymérase est activée après 15 min à 95°C. L'amplification des gènes cibles est réalisée en 45 cycles et la fluorescence est mesurée à chaque fin de cycle. Après 45 cycles d'amplification, la courbe de dénaturation est tracée en faisant varier la température de 65°C à 95°C par paliers de 0,1°C/s, avec une mesure de la fluorescence à la fin de chaque palier.

Pour déterminer l'efficacité moyenne de la PCR, un mélange standard a été réalisé en mélangeant un même volume de chaque échantillon d'ADNc. Une gamme de dilution a été préparée à partir du mélange standard. Pour chaque gène, l'efficacité (*E*) de la PCR a été déterminée grâce à la gamme de dilutions comme décrit par Ponts *et al.* (2007).

Les échantillons d'ADNc ont été testés pour leur contamination en ADN génomique (Ponts et al., 2007). L'absence de produits d'amplification de PCR non spécifique ou de la formation de dimères d'amorces ont été vérifiés par l'analyse des courbes de dénaturation et par l'électrophorèse des produits de PCR sur gel d'agarose.

L'analyse des résultats après PCR quantitative

Les valeurs des "crossing point" (Cp) expérimentalement mesurées (valeur moyenne de trios répétitions) obtenues pour le gène de référence et les gènes cibles ont été comparés dans les cultures témoins et dans les cultures traitées, puis, normalisées par rapport aux valeurs de Cp obtenues pour le gène de référence en utilisant le logiciel REST®-384 (Relative Expression Software Tool). Ce modèle mathématique prend en compte les différences d'efficacité entre le gène de référence et les gènes cibles ainsi que les différences des valeurs moyennes de Cp entre la condition du témoin et la condition du traitée (Pfaff1, 2001 ; Pfaff1 et al., 2002). Les niveaux d'expression des gènes cibles, normalisés par le niveau d'expression du gène de référence, sont exprimés en tant que facteurs de régulation dans la condition traitée, par rapport à la condition témoin : avec le facteur = $(E_{cible})^{\Delta Cp}$ cible (témoin-traité) / $(E_{réf})^{\Delta Cp}$ réf (témoin-traité). Les facteurs de régulation sont testés pour leur significativité par le test "Pair Wise Reallocation Randomisation Test©" avec p = 0.001 à l'aide du logiciel REST® REST-384 (Pfaff1, 2001 ; Pfaff1 et al., 2002).

Pour chaque gène, les niveaux d'expression des gènes étudiés (*Tri4*, *Tri5*, *Tri6*, *Tri12*, *Tri10*1, *Mnsod 2.1* et *Mnsod 2.2*) ont été normalisés à l'expression du gène de référence GZUBH, utilisé comme contrôle endogène.

II.2.4.10 L'analyse statistique

Toutes les expériences ont été répétées trois fois. L'étude statistique et le traitement des données ont été effectués avec les logiciels Microsoft Excel 2010, SigmaPlot 12.5, Origin Professionnel 8 et Origine b9.3.226. Nous avons déterminé la moyenne et l'écart type (n=3) de nos résultats, et adopté le seuil d'erreur de 5%. Les différences significatives entre les valeurs moyennes ont été analysées par ANOVA à sens unique et le test HSD de Tukey avec un niveau de signification à 5% où les valeurs de p < 0.05 ont été considérées différentes.

La détermination des CI_{50} et des CMI ont été réalisées avec une courbe dose-réponse, avec une pente Hill variable, à une probabilité d'erreur $\leq 0,05$ et les données ont été traitées avec le logiciel Origin b9.3.226.

Les expériences réalisées en biologie moléculaire ont été réalisées en trois répétitions biologiques indépendantes. Tous les résultats ont été exprimés sous forme de valeurs moyennes arithmétiques \pm SD. La valeur p=0,05 a été choisie comme le point de signification statistique. L'expression des gènes différentiels a été analysée avec REST (Pfaffl, 2001 ; Pfaffl *et al.*, 2002) en utilisant le gène codant GZUBH, comme référence interne. Les résultats sont rapportés dans la valeur log 2 du rapport (Traité / Contrôle).

Résultats et discussion

III. Résultats et discussion

III.1 La cinétique d'extraction et la teneur en huile

Dans un travail antérieur (Elhouiti, 2010), l'étude de la cinétique d'extraction des huiles essentielles par hydrodistillation, à partir du *Rhanterium adpressum*, nous a permis d'estimer la durée d'extraction et la teneur en huiles essentielles.

Nous avons trouvé que le temps optimal nécessaire pour l'extraction des huiles essentielles de *Rhanterium adpressum*, par l'hydrodistillation, est de 6 heures. Nous avons, ainsi, obtenu 5 millilitres d'huiles essentielles par kilogramme de matière végétale.

Les teneurs en huiles essentielles des feuilles et des fleurs varient de 0,11 % à 0,49 %. Comparées aux fleurs, les feuilles renferment des quantités en huiles essentielles élevées, dans une même région (Elhouiti, 2010).

III.2 La reconstruction Phylogénétique

L'arbre obtenu à partir de la reconstruction phylogénétique avec la somme de la longueur de branche = 0,029 est représenté dans la figure 18. Les longueurs des séquences sélectionnées sont comprises entre 1957 et 2229 pb; toutes les positions contenant des gaps et les données manquantes ont été éliminées. Un total de 1886 positions, dans l'ensemble de données finales, a été noté. On distingue deux clades principaux sur lesquels l'arbre était arbitrairement enraciné. Le premier clade se divise en deux sous-clades : clade de *Rhanterium* et *Perralderia*. Le second clade comporte les sous clades de *Pulicaria* et *Inula*. Ces quatre genres appartiennent à la tribu des *Inuleae*, dans l'état ancestral gynomonoïque, sauf pour le cas de *Perralderia coronopifolia* et *Inula conyzae*. Une telle transition de la gynomonoécie à la dioécie a été signalée par Torices et Anderberg (2009). Selon Wiklund (1986), les distributions de *R. adpressum* et de *R. suaveolens* s'etendent, selon le modèle de spéciation allopatrique. Ils sont considérés comme le résultat d'une dispersion secondaire couvrant des aires de répartition une fois entièreme séparées.

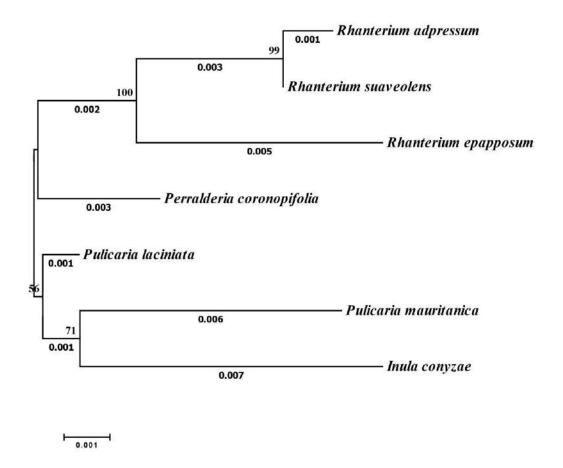


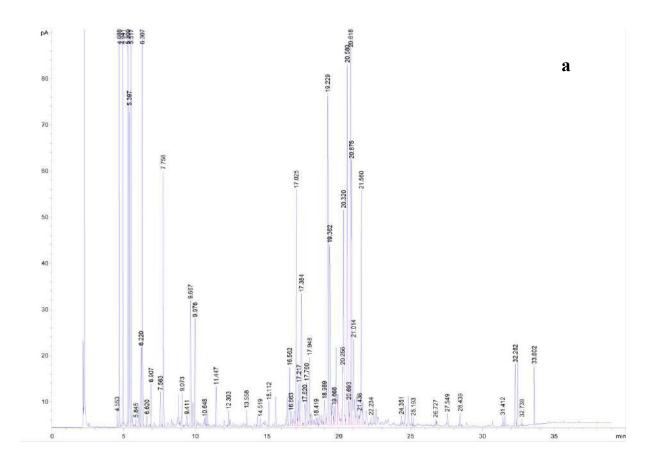
Figure 17 : L'arbre phylogénétique des plantes sélectionnées, reconstruit par la méthode Neighbor-Joining avec 100 réplications de bootstrap (la longueur des branches est montrée à côté des branches).

D'après la morphologie, il a été supposé que l'*Inula* et la *Pulicaria* étaient paraphylétiques ; Anderberg a identifié les grands genres et les genres hétérogènes, *Inula* L (100 spp.) et *Pulicaria* Gaertn (80 spp.) comme des cibles importantes pour la future recherches.

III.3 L'identification des constituants des huiles essentielles

La composition chimique des huiles essentielles du *Rhanterium adpressum* a été déterminée à l'aide de deux techniques d'analyses : la chromatographie en phase gazeuse CPG, et la chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse CG/SM.

La combinaison de ces deux méthodes analytiques nous a permis d'identifier trente-six composés chimiques, au total, pour les deux parties feuilles et fleurs (Tableau 9, Figure 18).



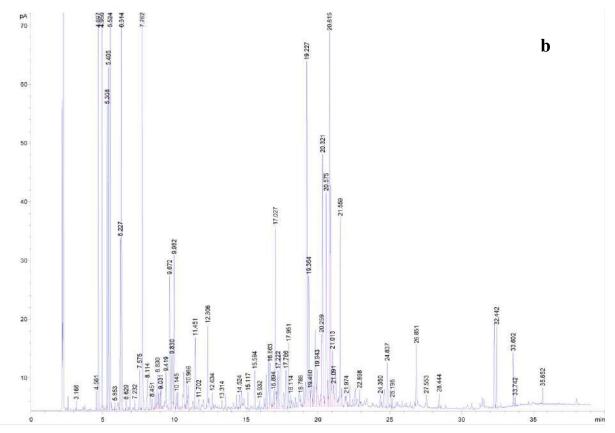


Figure 18 : Chromatogramme de l'huile essentielle de *Rhanterium adpressum* Coss. et Durieu, en utilisant une colonne capillaire HP-5 (a : Feuilles ; b : Fleurs).

Tableau 9 : La composition chimique des huiles essentielles des parties aériennes (feuilles et fleurs) de R. adpressum.

							A	ire du p	ic CPG	(%) ^a							
								Années	de réco	lte							_
			20)11					2	012				20	13		_
	A	vril	\mathbf{M}	Mai		Juin		Avril		Mai		Juin		Mai		Juin	
Composés	F	FL	F	FL	F	FL	F	FL	F	FL	F	FL	F	FL	F	FL	IRL ^b
α-Thujène	0,33	0,19	0,29	0,19	0,28	-	0,27	0,20	0,29	0,13	0,26	0,22	6,86	7,24	4,65	8,10	913
α-Pinène	8.82	12,39	11,54	15,64	10,02	7,83	9,86	10,91	10,63	11,42	9,29	12,24	11,45	8,34	8,99	10,20	927
Camphène	18.97	11,31	11,68	6,86	19,74	11,11	11,03	11,73	21,63	11,89	25,49	10,74	-	-	-	-	945
Sabinène	3,37	0,83	6,24	1,88	5,84	1,22	8,97	4,66	6,01	1,23	6,83	2,15	4,18	2,45	3,09	2,82	976
β-Pinène	4.54	2,77	4,86	3,02	5,11	2,52	4,89	3,36	5,45	2,55	5,55	2,91	13,91	7,28	10,20	9,92	983
β-Myrcène	11.31	9,68	21,59	12,81	16,17	9,00	13,46	7,45	17,25	8,35	9,21	3,93	0,14	-	0,15	0,7	990
α-Phellandrène	0,08	0,12	0,06	0,07	0,17	0,13	0,43	0,10	0,69	0,16	0,03	-	0,31	0,50	0,07	0,07	1009
α-Terpinène	0,09	0,07	0,08	0,11	0,09	-	0,34	0,11	0,38	0,09	0,35	-	0,22	1,83	0,79	1,48	1020
p-Cymène	1,68	2,41	1,44	2,07	1,37	1,51	0,88	1,94	1,08	2,48	1.02	2,84	5,52	3,81	4,22	4,29	1026
Limonène	3,96	3,64	5,04	5,48	7,42	5,12	4,16	3,15	4,40	3,69	4,88	3,73	0,14	-	0,11	0,9	1032
β-Ocimène	0,10	0,09	0,15	0,13	0,13	0,12	0,16	0,08	0,19	0,10	0,09	-	0,14	-	0,11	-	1044
γ-Terpinène	0,27	0,16	0,20	0,26	0,22	0,21	0,64	0,26	0,71	0,19	0,65	0,15	0,49	0,11	0,45	0,18	1058
Terpinolène	0,81	0,78	0,51	0,61	0,52	0,76	1,02	0,59	1,01	0,62	0,43	0,70	0,79	0,49	0,45	0,48	1087
Linalool	6,04	5,20	2,80	4,68	3,00	6,07	1,38	0,18	1,91	3,94	3,79	3,99	2,37	4,75	3,22	4,87	1099
Campholenic aldehyde	0,19	0,18	0,16	0,30	0,09	0,38	0,15	0,37	0,10	0,28	0,45	1,16	-	0,14	0,35	0,16	1143
Camphre	0,37	0,37	0,11	0,18	0,08	0,25	0,10	0,21	0,14	0,32	0,11	0,36	0,17	0,38	0,43	0,29	1151
Bornéol	0,68	1,11	0,12	0,70	0,07	0,72	0,02	0,05	0,17	0,08	0,05	0,61	2,12	2,19	1,64	1,64	1175
Trans-Isopulegone	2,80	1,74	1,50	1,70	1,40	1,55	1,25	1,51	1,57	1,31	1,81	2,68	-	-	-	-	1181

Terpinen-4-ol	0,59	0,58	0,35	0,39	0,36	0,51	0,11	0,53	0,17	0,53	0,31	1,21	0,38	0,72	0,31	0,63	1187
Verbenone	0,16	0,34	0,07	0,33	0,07	0,55	0,14	0,07	0,10	0,36	0,11	0,08	0,17	0,44	0,18	0,39	1226
Fenchyl acetate	0,38	0,42	0,16	0,38	0,17	0,52	0,10	0,21	0,13	0,31	0,18	0,35	-	0,32	-	0,41	1231
Géraniol	1,02	1,02	0,49	0,84	0,52	1,19	0,30	0,48	0,37	0,77	0,46	0,62	0,52	1,04	0,50	0,73	1257
Acétate de bornyle	0,76	0,10	0,32	0,94	0,20	0,91	0,26	0,67	0,20	0,67	0,13	1,33	0,21	0,22	0,18	0,87	1293
Méthyl eugénol	0,33	0,35	0,17	0,07	0,15	0,15	0,17	0,07	0,18	0,28	0,32	0.26	0,28	0,31	0,31	0,20	1307
α-Caryophyllène	0,39	0,56	0,30	0,43	0,32	0,50	0,56	0,04	0,44	0,37	0,09	0,14	0,66	0,65	0,93	0,72	1464
Germacrène D	0,30	0,34	0,38	0,37	0.38	0,55	0,34	0,31	0,23	0,29	0,52	0,57	0,35	0,51	0,57	0,45	1498
Bicyclogermacrène	1,02	0,34	1,32	1,08	0,92	1,55	3,81	0,93	2,50	0,89	0.30	0,10	2,80	0,24	2,09	1,07	1507
β-Bisabolène	0,10	0,30	0,19	0,30	0,20	0,45	0,16	0,16	0,14	0,17	0,22	0,15	0,59	0,53	0,58	0,58	1515
γ-Cadinène	0,32	0,65	0,43	0,67	0,35	0,73	0,39	0,52	0,30	0,53	0,25	0,43	1,18	0,53	0,93	0,75	1522
δ-Cadinène	0,86	1,19	0,83	1.08	0,07	1,20	1,13	0,07	0,95	0,74	0,08	0,07	0,16	0,88	0,93	0,20	1530
2-Hydroxy-6-	0,16	0,26	0,11	0,16	0,12	0,22	0,17	0,26	0,14	0,33	0,13	0,17	0,13	0,22	0,18	0,16	1562
Methoxyacetophenone	0,10	0,20	0,11	0,10	0,12	0,22	0,17	0,20	0,14	0,33	0,13	0,17	0,13	0,22	0,16	0,10	1302
Nérolidol	0,81	1,33	0,87	1,25	0,90	1,48	0,73	1,37	0,54	1,95	1,44	1,92	0,39	0,66	0,28	0,18	1594
Lédol	0.48	1,09	0,30	0,68	0,27	0,82	0,25	0,68	0,21	0,82	0,07	0,15	0,97	0,19	0,30	0,27	1602
γ-Sélinène	0,71	0,93	0,65	1,09	0,39	0,44	0,78	1,07	0,58	1,29	0,42	0,80	0,97	0,87	0,87	0,75	1616
T-Muurolol	2,49	2,34	2,11	2,51	2,24	3,26	1,98	2,20	0,12	2,67	0,12	2,13	0,24	0,40	0,35	0,33	1652
α-Eudesmol	2,64	2,31	1,82	2,10	1,51	3,01	2,19	2,05	1,55	2,49	1,04	1,81	0,65	0,64	1,44	0,87	1665

^a Pourcentages obtenus par normalisation des aires des pics FID.

^b IRL : Indices de rétentions linéaires relatives à la série homologue de n-alcanes C₈-C₂₆, obtenus sur colonne capillaire HP5.

Le tableau 9 montre que nos échantillons sont qualitativement proches les uns des autres, dans la mesure où ils sont tous caractérisés par les mêmes composés dominants. Les constituants présents en pourcentages majoritaires dans les huiles essentielles de *Rhanterium adpressum* sont : le Camphène (6,86 à 25,49 %), le β -Myrcène (0,7 à 17,25 %), l' α -Pinène (8,34 à 15,64 %), le β -Pinène (2,52 à 13,91 %), le Linalool (0,18 à 6,07 %) et la Sabinène (0,83 à 8,97 %).

D'autres constituants présents en quantités moins importantes ont été identifiés, à savoir le P-Cymène (0,88 à 5,52 %), le Limonène (0,9 à 5,48 %), le Bicyclo-Germacrène (0,34 à 3,81 %), la T-Muurolol (0,12 à 3,26 %), la Trans-Isopulegone (1,31 à 2,80 %), le Géraniol (1,71 à 4,34 %), et l'α-Eudesmol (0,64 à 2,64 %).

Les échantillons sont qualités comparables, quel que soit le mois et l'année de récolte. Cependant, les proportions de la plupart des constituants varient, considérablement, d'un mois à l'autre et d'un organe à l'autre, pour la même année (Tableau 10).

Ainsi, il y a une différence de composition entre les populations des différentes régions, entre les populations d'une même région et au sein même d'une population. Cette variation pourrait être due à des facteurs exogènes comme la photopériode, les conditions climatiques de la saison de collecte des échantillons, la nature et les composants du sol, la pluviosité, l'altitude et des facteurs endogènes tels que les aptitudes physiologiques de la plante et la composition génétique des individus (Figure 19). Les attaques des insectes et des micro-organismes peuvent, aussi, avoir une influence sur la composition des HE (Başer et Buchbauer, 2010).

Une comparaison de nos résultats avec ceux de travaux antérieurs, menés sur différentes espèces du genre *Rhanterium*, a montré que la composition chimique varie au sein de ce genre. Yaghmai et Kolbadipour (1987) ont mené une étude portant sur l'huile essentielle du *Rhanterium epapposum* collectée dans le Nord-est de l'Iran. Dans l'analyse chromatographique, ils ont révélé 107 composants volatils dont 92% sont des terpénoïdes, avec comme principaux constituants : l'α-Phellandrene, le Linalol, le Géraniol, le Bulnesol, et le β-Phellandrene ; avec un pourcentage global de 55,6 %.

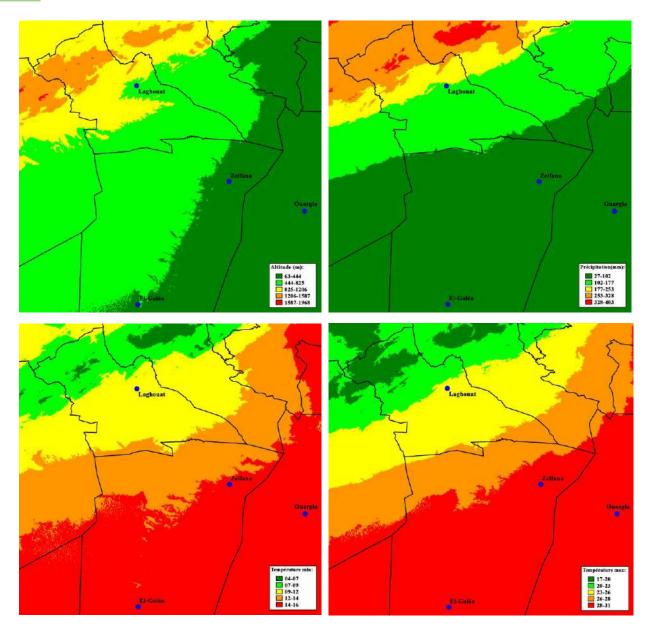


Figure 19 : Quelques facteurs exogènes influençant la variation de la composition chimique. Carte réalisée avec logiciel Diva-GIS 7.4.01.

Une étude réalisée par Bouheroum *et al.*, (2007) sur l'huile essentielle du *Rhanterium adpressum*, collectée, à Ouargla (Algérie), a révélé que les composés majoritaires de cette huile sont : le β-Eudesmol, le 16 β-Hydroxylupeolyl-3-hexadecanoate, le Stigmasterol et le Propan-2-ol. Kala *et al.*, (2009) ont rapporté que l'huile essentielle des parties aériennes de *Rhanterium adpressum* Coss & Durieu, collectée dans le Sud Algérien, analysée par (CG/SM), se distingue par la dominance du Spathulenol (19,6 %), du β-Eudesmol (15,2 %), du 2-isopropyl-5-methyl-9-methylene (12,9 %), du β-Cadinol (11,3 %), de l'α-Cadinol (6,56 %), de l'α-Eudesmol (5,37 %), du Myristicin (5.05 %), et du tetrahydro-2-(1,7-nonadiene-3,5-diynyl 4,81 %).

Cette variation de la composition pourrait être, probablement, due aux facteurs extrinsèques (à des différences des conditions environnementales et de la saison de collecte) ainsi qu'à d'autres facteurs tels que l'espèce ou bien les protocoles expérimentaux utilisés (le mode d'extraction, l'analyse chromatographique ...etc.).

III.4 La variabilité de la composition chimique des huiles essentielles

Globalement, les constituants des huiles essentielles étudiées sont répartis en quatre classes de composés, de pourcentages variables (Tableau 11), selon le mois de la collecte de la plante. Les hydrocarbures monoterpéniques ont présentés les pourcentages les plus élevés (feuilles : 22,50 à 69,71 % ; fleurs : 34,11 à 49,28 %).

Les monoterpéniques oxygénés sont moins représentés (feuilles : 4,24 à 13,32% ; fleurs : 4,05 à 12,64%) et les pourcentages les plus faibles sont ceux des hydrocarbures sesquiterpéniques (feuilles : 2,61 à 7,29 % ; fleurs : 1,46 à 4,98 %) et les sesquiterpènes oxygénés (feuilles : 1,97 à 6,42 % ; fleurs :1,64 à 7,93 %). L'ensemble de ces composés confère à cette huile une forte odeur, caractéristique agréable, et une couleur.

Tableau 10: La variation des pourcentages des différentes classes chimiques, selon le mois d'extraction, pour les deux extraits (feuilles et fleurs).

	Av 11	Ma 11	Ju 11	Av 12	Ma 12	Ju 12	Ma 13	Ju 13
Feuilles								
Hydrocarbures monoterpéniques	54,49	63,77	67,17	57,77	69,71	64,21	44,35	22,50
Monoterpéniques oxygénés	13,32	6,25	6,06	4,24	5,04	7,42	6,32	7,12
Total monoterpènes	67,80	70,01	73,23	62,01	74,75	71,63	50,67	29,62
Hydrocarbures sesquiterpéniques	3,70	4,10	2,61	7,29	5,14	1,58	5,50	5,30
Sesquiterpènes oxygénés	6,42	5,09	4,91	5,30	2,42	4,66	1,97	2,38
Total sesquiterpènes	10,12	9,20	7,52	12,58	7,56	6,24	7,47	7,68
Fleurs								
Hydrocarbures monoterpéniques	44,69	49,28	39,85	44,80	43,21	39,78	34,11	36,21
Monoterpéniques oxygénés	10,82	10,20	11,74	4,05	8,36	12,64	10,12	7,66
Total monoterpènes	55,51	59,48	51,59	48,84	51,58	52,43	44,23	43,87
Hydrocarbures sesquiterpéniques	3,96	3,95	4,98	2,54	3,37	1,46	2,55	3,14
Les sesquiterpènes oxygénés	7,06	6,53	8,57	6,30	7,93	6,01	2,93	1,64
Total sesquiterpènes	11,02	10,48	13,55	8,83	11,30	7,47	5,49	4,79

Cette variabilité serait influencée, essentiellement, par la température de la région (Holopainen et al., 2013). Ainsi, la période de floraison de R. adpressum est cernée entre les mois d'Avril et Mai et, à partir de Juin, commence la période chaude de l'été. Ainsi, les pourcentages des classes sont élevés au mois de Mai ; avec des températures moyennes allant de 21 et 24 °C.

Ces résultats montrent que les hydrocarbures monoterpéniques forment la classe principale, avec un pourcentage supérieur à 22 %, selon les mois. Les composés oxygénés sont à leur maximum pour les échantillons colléctés en mois de Mai en particulier pour l'extrait de fleurs.

Les composés représentant des concentrations plus ou moins élevées sont : l'α-Pinène (feuilles : 11,54 %; fleurs: 15,64 %), le β-Myrcène (feuilles: 21,59 %, fleurs: 12,81 %), l'α-Thujène (feuilles : 0,33 %, fleurs : 0,22 %), β-pinène (feuilles : 13,91 %, fleurs : 9,92 %), le δ-Cadinène (feuilles: 1,16 %, fleurs: 1,20 %), le Linalool (feuilles: 6,04 %, fleurs: 6,07 %), le Géraniol (feuilles: 1,02 %, fleurs: 1,19 %), 1'α-Eudesmol (feuilles: 2,64 %, fleurs: 3,01 %). Ces constituants sont connus comme agents antimicrobiens importants (Özek et al., 2008; Kim et al., 1995; Böhme et al., 2014; Bajpai et al., 2013; Dorman et Deans, 2000).

III.5 Les groupes chimiques des huiles essentielles de R. adpressum (feuilles et fleurs)

Une étude par Composition Ascendante Hiérarchique (CAH) et par Analyse en Composantes Principales (ACP) a été réalisée sur Trente-cinq échantillons d'huiles essentielles de R. adpressum, collectés dans quatre régions du sud algérien (Laghouat, Zelfana, Ouargla et El Goléa). Ces échantillons sont de deux types : les feuilles (20 échantillons) et les fleurs (15 échantillons).

L'analyse chromatographique a permis d'identifier 41 composants chimiques (constituant entre 65 et 82% de l'huile totale) pour les feuilles et les fleurs et pour toutes les régions. Les hydrocarbures monoterpéniques composent la classe majeure (40 à 53 %) suivis par les monoterpènes oxygénés (22 à 47 %), les sesquiterpènes oxygénés (15 et 38%) et les hydrocarbures sesquiterpéniques (7 à 26 %). Les composants majoritaires dans l'HE sont l'α-Pinène (11 à 29 %), le β-Myrcène (17 à 28 %), le Linalool (20 à 31 %), le α-Terpinéol (21 à 24 %), le α-Cadinol (9 à 17 %) et le β-Eudesmol (9 à 20 %). La composition de cette HE est très similaire à celle obtenue par Elhouiti et al., (2016) pour la même espèce et pour les mêmes régions collectées. Notons qu'une variation de teneur et de pourcentage des composants ont été enregistrée dépendent du mois de collecte et la partie de la plante extraite (Elhouiti et al., 2017).

III.5.1 Les résultats de l'analyse multivariée de la composition chimique

L'analyse multivariée basée sur 20 composants chimiques majoritaires constituant entre 52 et 72 % de la composition totale de notre l'huile essentielle. Les résultats de l'ACP (où F2 explique 17,31 % de la variation) et la CAH ont, d'une part, bien séparé entre les HE des feuilles et des fleurs et ont, d'autre part, exclu toute corrélation de cette variabilité avec la région d'échantillonnage. Nous avons utilisé l'ACP pour étudier et visualiser les corrélations entre les variables en nous basant sur les similitudes et les différences chimiques. Avec le diagramme des scores de l'ACP (Figure 20), représentant 49,36 % de la variance totale dans l'ensemble de jeu de données, trois groupes chimiques se sont formés. Ces groupes révèlent une variabilité intraspécifique entre les extraits feuilles et fleurs. Ainsi, deux groupes chimiques caractérisent la composition générale des feuilles et le troisième celle des fleurs.

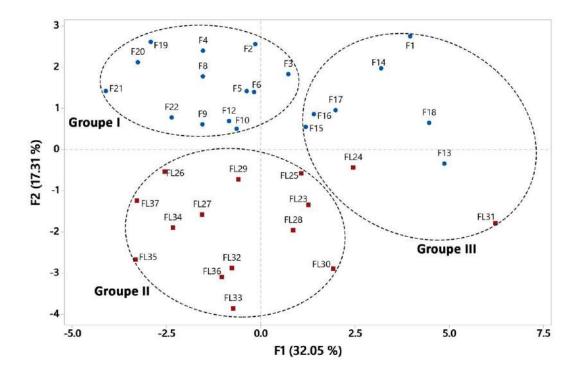


Figure 20 : Diagramme des scores d'ACP représentant la variation de la composition chimique entre les différents échantillons (F : Feuilles ; FL : Fleurs).

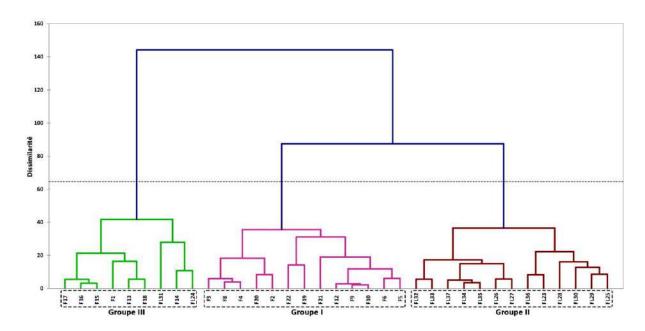


Figure 21 : Dendrogramme des échantillons construit en utilisant la méthode de Ward et la distance euclidienne pour calculer les indices de dissimilarité.

La CAH a, aussi, révélé la présence de trois classes, les mêmes, (Figure 21) séparées selon les indices de dissimilarité. Cette méthode, d'agrégation, affiche les différentes relations entre les échantillons de l'huile, sous forme de dendrogramme calculé sur la base de la méthode de minimum de variance de Ward. L'ACP et la CAH ont mis en évidence la présence de trois classes chimiques (groupes I, II et III) dans l'ensemble de nos échantillons. La première classe comprend 13 échantillons de feuilles (F9, F10, F12, F21, F22, F8, F19, F20, F6, F2, F3, F4 et F5), distribués dans les quatre régions. La composition chimique de cette classe est dominée par le Linalool/α-Terpinéol (M=52 %; SD=3,56 %). La deuxième classe comprend, aussi, 13 échantillons; tous de fleurs (FL34, FL37, FL35, FL36, FL28, FL29, FL30, FL32, FL33, FL25, FL23, FL26 et FL27). Cette classe se caractérise par la domination de l'α-Pinène/β-Myrcène (M=57%; SD=3,44 %). La troisième classe comprend 9 échantillons (F13, F14, FL31, F16, F18, F15, F17, F1, FL24) et est caractérisée par des pourcentages élevés de l'α-Pinène/β-Myrcène/α-Terpinéol (M=64 %; SD=3,33 %).

Les composants oxygénés (monoterpènes et sesquiterpènes) présentent des pourcentages élevés. Ils dominent la composition chimique du groupe I (71 %), alors que dans le groupe II, le pourcentage des composants chimiques de ces échantillons d'huiles sont beaucoup plus homogènes malgré les pourcentages, relativement, élevés de l'α-Pinène et du β-Myrcène. Dans le groupe III, le pourcentage des composants oxygénés est beaucoup plus faible que dans les deux premiers et les quatre composants principaux majoritaires (84 %) sont l'α-pinène, la β-Myrcène, l'α-Terpinéol et le Linalool.

Ces résultats montrent clairement que les échantillons de l'HE des feuilles appartiennent à un groupe chimique différent de celui des échantillons de fleurs. Cette différence a été révélée, précédemment, (Elhouiti *et al.*, 2016 ; Elhouiti *et al.*, 2017). Dans ces études, sur l'effet des HE de feuilles et de fleurs sur l'activité biologiques des champignons du genre *Fusarium*, les huiles de fleurs se sont avérées très actives contre la croissance fongique et la production des mycotoxines. Nous pensons que ceci est dû aux composants majoritaires ; connus pour leur activité antimicrobienne importante (Bajpai *et al.*, 2013).

D'autres travaux, similaires, ont été réalisés sur les huiles essentielles de *Pistacia atlantica* (Sifi *et al.*, 2015 ; Gourine *et al.*, 2010). L'ACP et la CAH des résultats de l'analyse par GC et GC/MS a permis à Sifi et *al.*, (2015) de révéler deux chémotypes différents (l'un Chémotype α-Pinène et un Chémotype α-Pinène / Sabinène / Terpinen-4-ol) et à Gourine *et al.*, (2010) trois chémotypes : un Chémotype δ -3-carène (16,4-56,2 %), un Chémotype terpinen-4-ol (10,8-16,0 %) et un Chémotype α-pinène / camphène (10,9-66,6 % / 3,8-20,9 %).

III.6 Les résultats des tests préliminaires de l'activité antifongique

Dans une première étape, nous avons réalisé des tests d'activité antifongique sur les champignons mycotoxinogènes en Algérie (Figure 22 et 23). Afin de vérifier l'exactitude de ces résultats et sélectionner des souches pour la suite de notre étude.

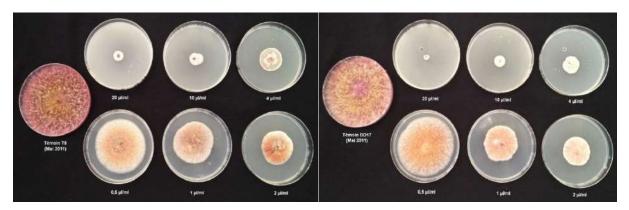


Figure 22 : Effet de l'huile essentielle de *Rhanterium adpressum* vis-à-vis de souches de *Fusarium culmorum* (Fc) isolées en Algérie.

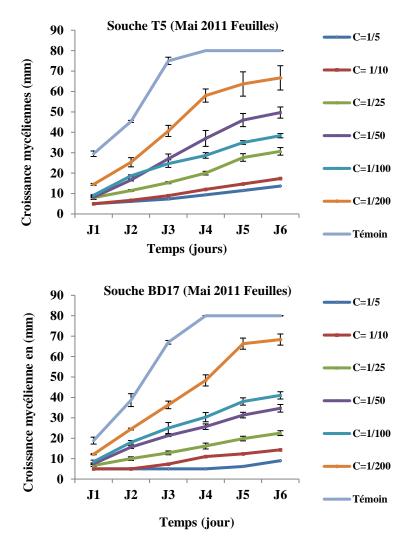


Figure 23 : La cinétique de la croissance mycélienne des souches de *Fusarium culmorum* (*Fc*) isolées en Algérie, en présence de différentes concentrations de l'extrait de feuille.

Nous avons refait ces tests sur douze souches fongiques toxinogènes ; dont 10 des plus virulentes de la collection de l'INRA Bordeaux (France) (Figures 24 et 25).

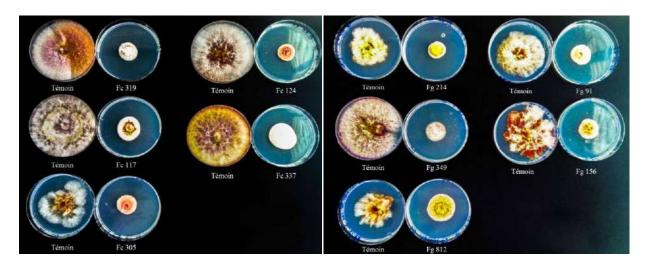


Figure 24 : Effet de l'huile essentielle de *Rhanterium adpressum* vis-à-vis de dix souches INRA de *Fusarium culmorum* (*Fc*) et *Fusarium graminearum* (*Fg*).

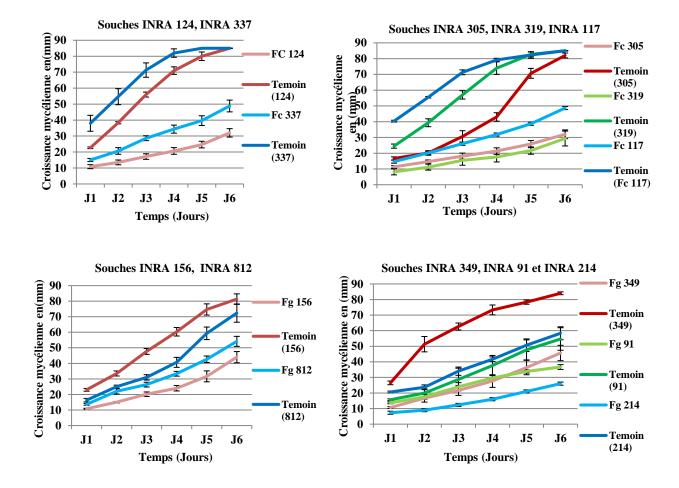


Figure 25 : La cinétique de la croissance mycélienne des souches de *Fusarium culmorum* (Fc) et *Fusarium graminearum* (Fg) (collection INRA), en présence de l'extrait de feuille à une concentration de 2μ l/ml.

Ces tests ont prouvé que notre huile essentielle a un effet inhibiteur sur les 12 souches testées ; avec des taux d'inhibition, relativement, élevés, quel que soit l'espèce, *Fusarium culmorum* ou *Fusarium graminearum* (Figure 26).

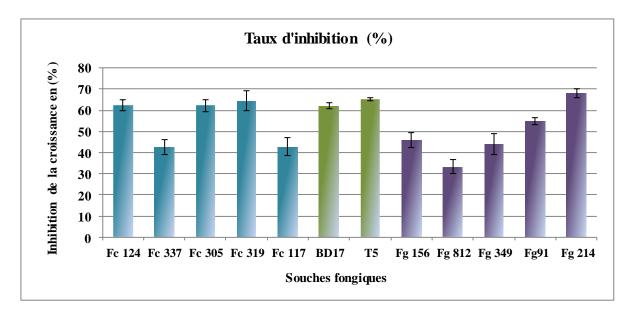


Figure 26 : Test préliminaire du pouvoir antifongique de l'huile essentielles de *R. adpressum* sur les 12 souches du genre *Fusarium* (deux souches isolées en Algérie BD17 et T5 ; et dix souches de la collection de l'INRA, France).

Suite à ces résultats, nous avons retenu les quatre souches les plus virulentes : deux souches de *Fusarium graminearum* de la collection INRA (France) et deux souches de *Fusarium culmorum* isolées en Algérie.

III.7 La cinétique de la croissance mycélienne sur milieu solide

La cinétique de la croissance fongique des souches sélectionnées (Figure 27) en présence de différentes concentrations d'HE a montré des sensibilités variables vis-à-vis des deux extraits ($p \le 0.05$). L'effet de l'extrait des feuilles sur la croissance mycélienne est observé à partir d'une concentration de 2 µl/ml. Les souches INRA 349 (Fg 349) et l'INRA 812 (Fg 812) de *Fusarium graminearum* étaient moins affectées que les souches de *Fusarium culmorum* (BD17 et T5).

Une sensibilité remarquable de toutes les souches à l'huile essentielle des fleurs a été observée, à partir de la concentration de 1 μ l/ml où l'inhibition de la croissance était très importante. Pour l'extrait des feuilles, l'inhibition était à son maximum, à la concentration de 10 μ l/ml, et une inhibition totale a été enregistrée à 20 μ l/ml. D'autre part, l'extrait des fleurs inhibe totalement la croissance de toutes les souches à 10 et 20 μ l/ml, tandis que la concentration de 4 μ l/ml induit une forte inhibition de la croissance mycélienne.

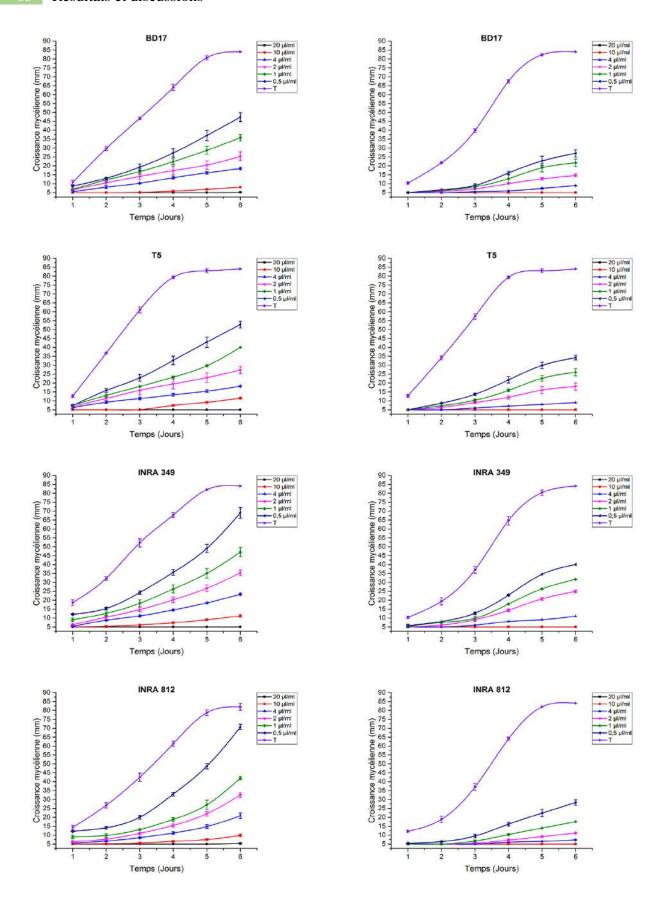


Figure 27 : La cinétique de la croissance mycélienne des quatre souches fongiques, en présence de différentes concentrations des deux extraits (de feuilles : à gauche ; de fleurs : à droite).

Les deux souches de *F. graminearum* semblent être beaucoup plus sensible à l'extrait de fleurs, en particulier pour la souche INRA 812, où la concentration de 4 μl/ml a montré un effet très similaire à ceux obtenus avec 10 et 20 μl/ml. Certains résultats de Velluti *et al.*, (2004), sur l'effet des huiles essentielles de cinq plantes sur la croissance de *F. graminearum*, ont montré un effet plus au moins significatif à une concentration de 1 μl/ml. De même, les résultats de Singh *et al.*, (2006), avec les huiles essentielles de *Foeniculum vulgare*, ont révélé que *F. graminearum* était très sensible à des concentrations de 4 et 6 μl/ml.

Les deux souches de *F. culmorum* présentent également une sensibilité envers l'extrait de fleurs, à partir de la concentration de 4μl/ml. Dans des études précédentes, Terzi *et al.*, (2007) ont également observé un niveau d'inhibition élevé, à une concentration de 5 μl/ml avec l'huile essentielle du théier, avec comme composés principaux le Terpinen-4-ol, le 1,8-Cinéole et le γ-Terpinene. Par ailleurs, à une concentration de 2 μl/ml, l'huile essentielle de *Cinnamomum zeylanicum* présente une inhibition importante de la croissance de *F. culmorum* (Sumalan *et al.*, 2013).

III.8 Le pouvoir antifongique des huiles essentielles pures en milieu solide et liquide

Rappelons que les taux d'inhibition du mycélium sur milieux solide et liquide sont déterminés en utilisant la méthode de contact direct sur milieu solide. Elle consiste à additionner aseptiquement l'extrait naturel dilué dans le milieu de culture en état de fusion. Et celle de microdilution, en milieu liquide, utilisant des micro-plaques à 96 puits qui consiste à comparer la croissance fongique avec celles des témoins inoculés sans traitement ; en mesurant l'activité antifongique par une mesure directe de l'absorbance à 630 nm.

III.8.1 L'activité antifongique des huiles essentielles (feuilles et fleurs) en milieu solide

L'analyse de l'activité antifongique des extraits (feuilles et fleurs) sur milieu solide a révélé une variabilité entre l'effet des HE des feuilles et celles des fleurs (Figure 28).

La concentration de 20 μ l/ml inhibe complètement la croissance fongique pour les deux extraits, lorsqu'elle dépasse la CMI (Tableau 12). Cependant, une différence significative ($p \le 0.05$) entre les deux extraits (feuilles et fleurs) a débuté à partir de la concentration 0,5 à 10 μ l/ml.

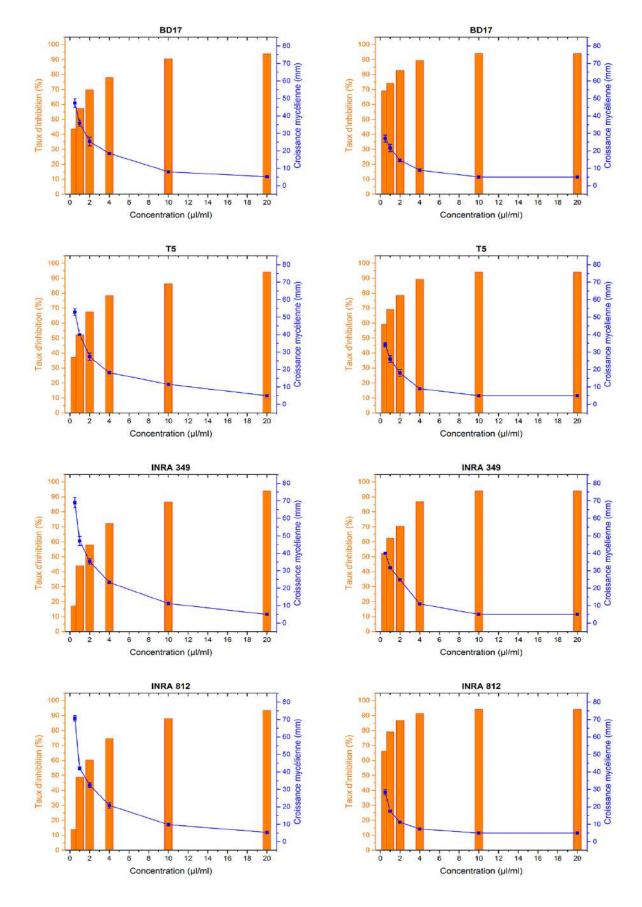


Figure 28 : L'activité antifongique, sur milieu solide, en présence de différentes concentrations des deux extraits (de feuilles : à gauche ; de fleurs : à droite).

La concentration de 10 μ l/ml de l'extrait de fleurs a présenté le même effet que pour la concentration 20 μ l/ml, pour toutes les souches ; avec un taux l'inhibition de 94,04 %. Quant à l'extrait de feuilles, le taux d'inhibition était variable, selon la souche, et moins important. L'effet des concentrations 0,5, 1, 2 et 4 μ l/ml diffère significativement entre les deux extraits (feuilles et fleurs). Comme dans le cas de l'extrait des fleurs, la plus faible concentration (0,5 μ l/ml) engendre des taux d'inhibitions importants. Ils varient entre 52 et 67 %, pour toutes les souches. Cependant, les taux d'inhibition de cette même concentration pour l'extrait de feuilles n'excédaient pas 50 % (13 à 47 %).

Ces résultats nous permettent d'établir que l'effet antifongique est dû essentiellement à la composition chimique des huiles essentielles. Le pouvoir antifongique de l'HE de *Rhanterium adpressum* peut être expliqué par la forte présence d'hydrocarbures monoterpéniques et les monoterpéniques oxygénés, révélés par l'analyse qualitative et quantitative de cette HE.

L'extrait du mois de juin a révélé une activité antifongique importante, comparée à celles des extraits des mois de mai et d'avril, où le pourcentage de composés est, relativement, faible (Figure 29). L'activité antimicrobienne serait influencée par les pourcentages élevés en composés oxygénés (Bajpai *et al.*, 2013).

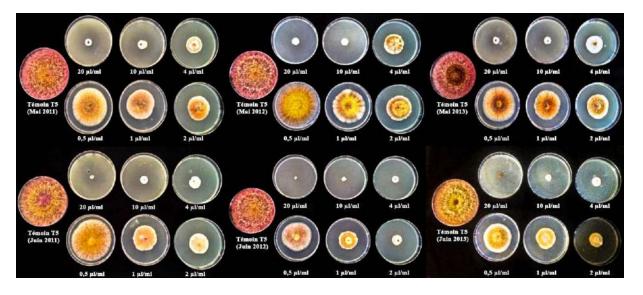


Figure 29 : Exemples de l'effet des huiles essentielles de *Rhanterium adpressum*, provenant de différents échantillons, sur la croissance de *Fusarium culmorum* (la souche T5)

Nos résultats ne concordent pas avec ceux des travaux menés par Kordali *et al.*, (2009) où ils ont signalé une faible sensibilité de *F. graminearum* et *F. culmorum*, vis-à-vis des huiles essentielles *Achillea gypsicola* et *Achillea biebersteinii*, malgré la richesse de ces huiles en monoterpènes oxygénés (94,42 et 83,98 %).

III.8.2 L'activité antifongique des huiles essentielles en milieu liquide

L'activité antifongique en milieu liquide a également permis de noter la variabilité de l'effet inhibiteur entre les extraits (Figure 30). Les souches étaient plus sensibles à l'HE des fleurs que l'HE des feuilles. La plus faible concentration de l'extrait des fleurs (0,25 µl/ml) était capable d'inhiber plus de 70 % de la croissance fongique. Cependant, l'effet de cette concentration était d'environ la moitié pour l'extrait de feuilles. Pour tous les extraits, la concentration de 10 µl/ml a été suffisante pour inhiber, totalement, la croissance des souches testées (Figure 31).

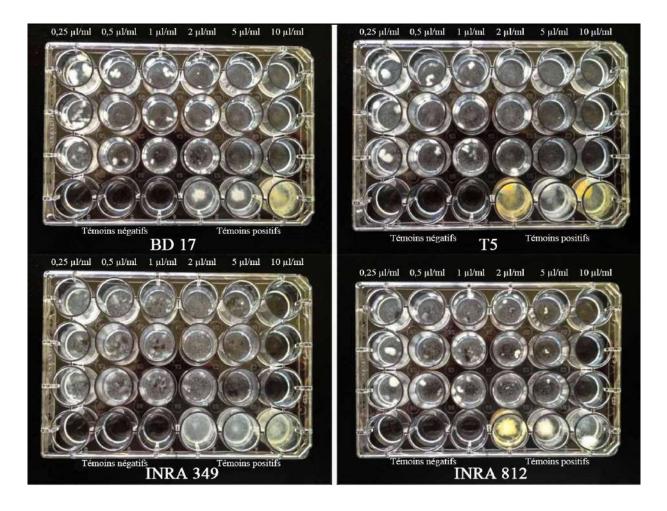


Figure 30 : Exemples de l'effet des huiles essentielles des feuilles de *Rhanterium adpressum* sur la croissance de *Fusarium culmorum* et *Fusarium graminearum* à différentes concentrations

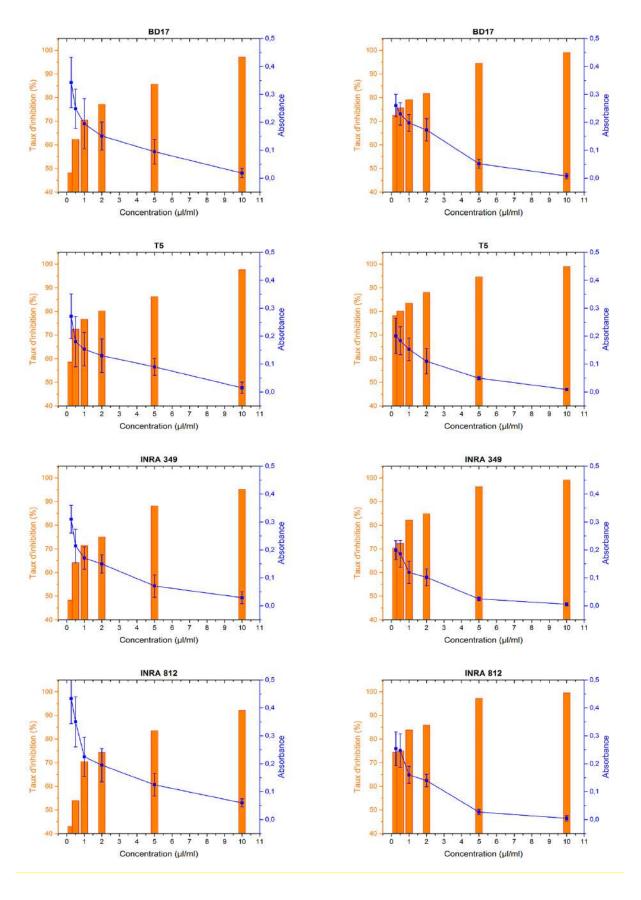


Figure 31 : L'activité antifongique sur milieu liquide en présence de différentes concentrations d'huiles essentielles (de feuilles : à gauche ; de fleurs : à droite).

Dans les deux milieux de culture, les souches T5 et INRA 812 ont montré une grande sensibilité envers l'huile essentielle de fleurs (taux d'inhibition supérieur à 60%, en milieu solide et supérieur à 70% en milieu liquide, à partir de la plus faible concentration).

La variabilité de l'effet antifongique des HE en milieu solide et liquide ainsi que leurs effets sur la croissance mycélienne, dépendaient des concentrations et de la variation dans la composition chimique des extraits testés.

L'analyse de l'activité antifongique sur les deux milieux solide et liquide a révélé une grande sensibilité de toutes les souches vis-à-vis de l'extrait pure de la parties aériennes. Cette activité est très importante à partir de la plus faible concentration $(0,5 \,\mu\text{l/ml})$ et pour toutes les souches sur les deux types de milieux avec des différences non significatives (p > 0.05).

La composition chimique de cet extrait d'HE est caractérisée par la présence de 10,8 à 43,72 % d'hydrocarbures monoterpéniques, de 12,11 à 30,32 % de monoterpènes oxygénés, de 5,42 à 19,22% de sesquiterpènes oxygénés et de 1,91 à 3,29 % d'hydrocarbures sesquiterpéniques (Elhouiti *et al.*, 2016).

La souche T5 montre la plus grande sensibilité avec une CI₅₀ de 0,09 µl/ml et une CMI de 12,31 µl/ml, en milieu liquide (Tableau 13). Les valeurs d'CI₅₀ et de CMI sont significativement différentes dans les deux milieux et pour toutes les souches.

III.9 Le pouvoir antifongique composés bioactifs purs en milieu solide et liquide

La différence de sensibilité des souches au sein du même genre vis-à-vis d'une même substance, peut être expliquée par la variabilité physiologique. Les pourcentages d'inhibition de la croissance fongique enregistrés, en milieu solide et liquide, pour les deux monoterpènes oxygénés (Géraniol et Linalool), ont été importants à partir de la concentration 2 μ l/ml, pour toutes les souches (Figure 32). Ces pourcentages ne diffèrent pas significativement (p > 0.05) de ceux de l'HE pure. Cette activité semble etre liée à la structure chimique des composés, de notre huile, décrits par Bajpai *et al.*, (2013) comme agents antimicrobiens forts.

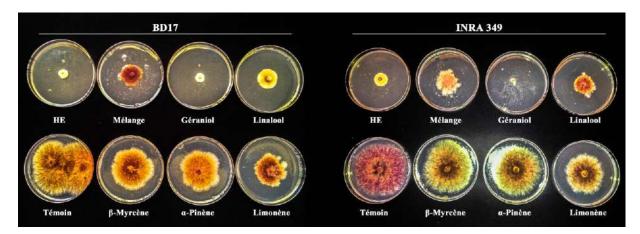


Figure 32 : Exemples de l'effet des huiles essentielles des feuilles de *Rhanterium adpressum* sur la croissance de *Fusarium culmorum* et *Fusarium graminearum*, en présence de l'huile essentielle pure, des composés chimiques bioactifs et le mélange de ces composés.

D'après Fleurat-Lessard *et al.*, (2014), le Géraniol et le Linalool, à une concentration de 1 μl/ml, exercent une forte inhibition sur la croissance de *F. graminearum* et d'*Aspergilus westerdijkiae*. Sur ces deux même souches, l'α-Pinène, le Myrcène et le Limonène n'ont d'effet qu'à partir d'une concentration de 10 μl/ml.

L'efficacité du Géraniol et du Linalool a été, aussi, prouvée par Pattnaik *et al.*, (1996) avec des concentrations, respectivement, de 0,4 et $5 \mu l/ml$ sur *F. oxysporum* et de $0,8 \mu l/ml$ et $5 \mu l/ml$ sur *F. solanium*.

Concernant l' α -Pinène et le Limonène, la croissance des souches était fortement inhibée à partir d'une concentration de 2 μ l/ml en milieu liquide. En milieu solide une concentration de 10 μ l/ml est nécessaire pour obtenir le même effet (Figure 33).

Le Limonène a présenté une différence significative (p < 0.05) entre les deux milieux, pour toutes les souches. Les souches de F. culmorum ont montré une résistance à ce produit, surtout en milieu solide (Figure 33). Ces résultats sont similaires à ceux obtenus par Fleurat-Lessard et al., (2014) sur F. graminearum où l'activité inhibitrice du Limonène et du Myrcène était inférieure à 50 %, même avec une concentration de $10 \,\mu$ l/ml.

D'après Slinski *et al.*, (2015) l'α-Pinène, le Limonène et le β-Myrcène présentent un faible effet car un volume de 250 μl d'HE a été nécessaire pour l'inhibition de la germination et de la croissance radiale de *F. circinatum* et *F. temperatum*.

Le β -Myrcène, même à une concentration de 10 μ l/ml, n'induit pas d'inhibition de la croissance (elle dépasse 45%) et cela pour toutes les souches et sur les deux types de milieux (Figure 33); bien qu'il soit connu comme l'un des composants antimicrobiens importants des huiles essentielles (Bajpai *et al.*, 2013).

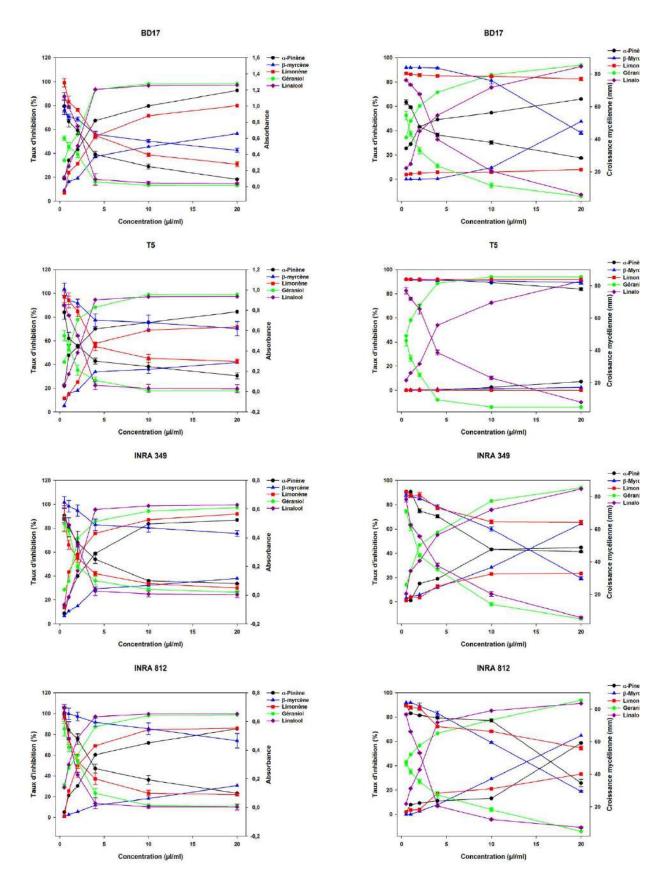


Figure 33 : Les taux d'inhibition de la croissance fongique des quatre souches, en présence de différentes concentrations des produits volatils bioactifs testés sur les deux milieux (liquide : à gauche ; solide : à la droite).

Une étude similaire a été réalisée par Maëlys et al., (2013) sur l'effet antifongique de deux molécules chimiquement différentes, le Linalol et le Citral, sur la croissance fongique d'INRA 349. Le Citral s'est révélé plus actif que le Linalool; avec des CI₅₀ de 0,56 et 0,74 µl/ml, respectivement.

Nos résultats concordent parfaitement avec ceux de Tantaoui et al., (1993) où il a été admis que l'activité antimicrobienne des HE peut être classée dans un ordre décroissant, selon la nature de leur composés majoritaires Phénol > alcool > aldéhyde >cétone> oxyde > hydrocarbures > esters.

Des rapports sur l'activité antifongique et la composition chimique des huiles essentielles des plantes aromatiques appartenant à la famille des Asteraceae ont été publiés dans la littérature, confirmant l'effet de l'huile essentielle et de ses composés majeurs sur les champignons phytopathogènes et/ou liés à la santé humaine et vétérinaire (Tableau 11).

Tableau 11 : Plantes de la famille des *Asteraceae* contenant une activité antifongique

Nom scientifique	Composés	Reference(s)
Arnica longifolia	Camphor, 1,8-Cineole	(Tabanca <i>et al.</i> , 2007)
Aster hesperius	Carvacrol, α-Bisabolol	(Tabanca et al., 2007)
Baccharis latifolia	Hexadecanoic Acid, Carvacrol	(Alvarez et al., 2001)
Chrysothamnus nauseosus	Camphor, α- And β-Pinene, Lyratyl Acetate.	(Tabanca et al., 2007)
Elephantopus spicatus	β-Phellandrene, β-Pinene	(Govinden et al., 2004)
Eupatorium semialatum	γ- Elemene, Farnesene, α-Curcumene, Selina-4,7(11)-Diene, β-Bisabolene	(Govinden et al., 2004)
Spilanthes americana	Piperitone, Piperitenone	(Romagnoli et al., 2005)

D'autres exemples d'espèces de la famille des Asteraceae comportent, également, des huiles essentielles à activité antifongique : Chrysactinia mexicana Grag, pour l'inhibition totale de la croissance d'Aspergillus flavus (Cárdenas et al., 2005) et Helichrysum italicum (Roth) contre Pythium ultimum (Tundis et al., 2005).

Les compositions d'huiles de feuilles, obtenues par hydro-distillation, a également été étudiée chez les Asteraceae (Govinden-Soulange et al., 2004). L'huile essentielle de Tagetes patula L. a exercé une forte activité antifongique contre deux champignons phytopathogènes, Botrytis cinerea et Penicillium digitatum, en inhibant complètement la croissance (Romagnoli et al., 2005).

III.10 Le pouvoir antifongique des composés bioactifs mélangés sur milieu solide et liquide

L'action du mélange des cinq composés a révélé une grande activité contre la croissance mycélienne, en milieux liquide et solide (Figure 34). A partir d'une concentration de 1 μ l/ml, l'inhibition dépasse 50%, en milieu liquide. Une telle inhibition n'est obtenue qu'à une concentration de 4 μ l/ml, en milieu solide.

L'activité en synergie des produits bioactifs volatils, testés en milieu liquide, diffère significativement (p < 0.05) de l'activité de l'HE pure dans le même milieu. Il est à noter que l'activité des composés mélangés est beaucoup plus faible que celle de l'huile essentielle pure sur les deux milieux.

L'expérience de Slinski *et al.*, (2015) a montré que le mélange de monoterpènes (à 250 µl) a une action synergique contre la croissance radiale de *F. circinatum* et *F. temperatum*. L'efficacité supérieure de l'huile pure semble être due à la présence des autres composés chimiques influant de manière additive sur l'activité fongique (Bajpai *et al.*, 2013).

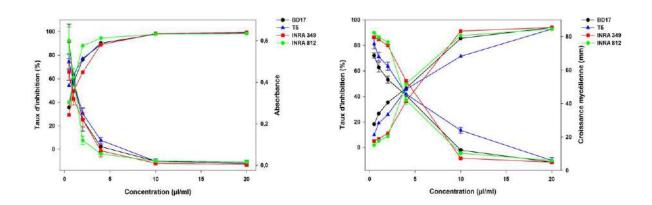


Figure 34 : L'activité des composés chimiques volatils en mélange sur la croissance fongique des souches de *F. culmorum* (BD17 et T5) et *F. graminearum* (INRA 349 et INRA 812) sur les deux milieux (liquide, à gauche, et solide, sur la droite).

III.11 La détermination des CMI et CI50 sur milieu solide et liquide

Les pourcentages d'inhibition de la croissance fongique nous ont permi de déterminer les CI₅₀ et CMI (ou CI99), de chaque champignon par molécule testée.

III.11.1 Les CMI et les CI₅₀ des extraits d'huiles essentielles feuilles et fleurs

La sensibilité des souches F. graminearum, INRA 349 et INRA 812, à l'extrait de fleurs a été également révélée par la CI_{50} et la CMI (Tableau 12). Ces valeurs sont significativement différentes ($p \le 0.05$), entre les extraits des feuilles et ceux des fleurs, sur le milieu solide. La CI_{50} et la CMI ont présenté des valeurs intéressantes en milieu liquide pour l'extrait de fleurs, mais pas pour celui de feuilles.

Dans une étude, Dobre et Niculita (2012), ont montré que des souches de *F. culmorum* et de *F. graminearum* étaient très sensibles aux huiles essentielles du clou de girofle, du thym blanc et de l'origan ; avec une CMI de 1 et 1,5 µl/ml. Cependant, plusieurs études ont discuté l'inefficacité de certains fongicides dans le contrôle de la production des mycotoxines car ils deviennent des facteurs de stress supplémentaires stimulateurs de la production de ces mycotoxines (Magan *et al.*, 2002 ; D'mello *et al.*, 1998 ; Milus et Parsons 1994).

Tableau 12 : les valeurs des CI₅₀ et des CMI pour différentes concentrations des deux extraits, pour les souches de *F. culmorum* et *F. graminearum*.

	Feu	illes	Fle	eurs
	CI ₅₀ (µl/ml)	CMI (µl/ml)	CI_{50} (µl/ml)	CMI (µl/ml)
Milieu de culture solide				
BD17	0,70	12,81	0,27	9,30
T5	0,90	13,41	0,32	6,71
INRA 349	1,54	12,73	0,49	9,17
INRA 812	1,42	10,41	0,28	5,23
Milieu de culture liquide				
BD17	0,27	7,79	0,23	10,37
T5	0,24	6,69	0,20	8,84
INRA 349	0,26	8,05	0,24	5,85
INRA 812	0,37	10,40	0,22	5,90

III.11.2 Les CMI et les CI₅₀ des composés bioactifs purs et du mélange des composés bioactifs

En milieu liquide, une forte sensibilité des souches de F. culmorum et F. graminearum vis-àvis de l'HE pure et des composants bioactifs volatils mélangés a été mise en évidence par les valeurs des CI₅₀ et des CMI (Tableau 13). Ces valeurs sont significativement différentes (p < 0.05) de celles obtenues dans le milieu solide.

L'étude de Cardiet et al., (2012) a révélé qu'avec l'huile de Girofle, l'inhibition de 50% et de 99% de la croissance de F. graminearum nécessite des concentrations de 0,13 et 0,73 µl/ml, respectivement.

Les valeurs des CI₅₀ et des CMI des monoterpènes oxygénés (Géraniol et Linalool) sont aussi importantes, avec des différences significatives, pour un même milieu qu'entre les deux milieux. L'activité du Linalool sur la souche INRA 349 a été, également, prouvée par Fleurat-Lessard et al., (2014) avec une CI_{50} de 0,36 µl/ml et une CMI de 0,78 µl/ml.

Ces deux monoterpènes ont présenté une action fongicide vis-à-vis de F. oxysporum (0,4 µl/ml pour le Géraniol et 5 µl/ml pour le Linalool) et de F. solanium (0,8 µl/ml pour le Géraniol et 5 ul/ml pour le Linalool) (Pattnaik et al.,1996).

Les hydrocarbures monoterpéniques (l'a-Pinène et le Limonène) se sont montrés moins actifs contre la croissance des souches, comparé aux autres composants, mais plus actif que le β-Myrcène, révélé inactif sur les quatre souches testées.

Tableau 13: Les valeurs des CI₅₀ et des CMI pour les différents composants bioactifs volatils testés, vis-à-vis des souches de *F. culmorum* (BD17 et T5) et de *F. graminearum* (INRA 349 et INRA 812), sur les deux milieux (liquide et solide).

Milieu de culture liquide

	Huile essentielle pure		α-Pinène		β-Myrcène		Limonène		Géraniol		Linalool		Synergie	
	CI ₅₀ (µl/ml)	CMI	CI ₅₀	CMI										
		(µl/ml)	(µl/ml)	(µl/ml)										
BD17	0,27	9,30	2,19	21,77	12,49	>30	3,94	>30	1,10	10,43	1,68	8,94	0,80	6,47
T5	0,09	6,71	1,60	>30	>30	>30	4,66	>30	0,75	8,77	1,54	8,43	0,47	8,36
INRA 349	0,30	9,17	2,91	20,09	>30	>30	1,55	13,95	1,19	10,94	1,87	6,38	1,03	8,39
INRA 812	0,32	5,23	3,61	27,90	>30	>30	2,33	15,98	1,09	10,63	0,92	4,84	0,70	4,22

Milieu de culture solide

	Huile esser	Huile essentielle pure		α-Pinène		β-Myrcène		Limonène		Géraniol		Linalool		Synergie	
	CI ₅₀	CMI	CI ₅₀	CMI	CI ₅₀	CMI	CI ₅₀	CMI	CI ₅₀	CMI	CI ₅₀	CMI	CI ₅₀	CMI	
	(µl/ml)	(µl/ml)	(µl/ml)	(µl/ml)	(µl/ml)	(µl/ml)	(µl/ml)	(µl/ml)	(µl/ml)	(µl/ml)	(µl/ml)	(µl/ml)	(µl/ml)	(µl/ml)	
BD17	0,37	20,48	0,66	>30	20,62	>30	>30	>30	1,14	20,78	3,48	22,30	3,11	24,93	
T5	0,56	20,68	5,03	>30	>30	>30	0	0	0,66	17,59	4,17	23,61	4,30	28,56	
INRA 349	0,95	20,45	>30	>30	15,18	>30	>30	>30	2,55	20,85	3,31	23,88	4,77	21,42	
INRA 812	0,66	21,66	19,82	>30	15,01	>30	>30	>30	1,03	22,44	2,46	22,12	4,22	22,73	

III.12 L'analyse de la production des mycotoxines

Suite à l'évaluation du pouvoir antifongique, décrit ci-dessus, l'inhibition de la production de mycotoxines TCTB, métabolites secondaires toxiques, a été évaluée en milieu liquide, par UPLC, pour les deux extraits d'HE (feuilles et fleurs) de R. adpressum ainsi que pour les composés bioactifs purs testés, séparément.

III.12.1 L'effet des huiles essentielles pures sur la production des Trichothécènes de type B

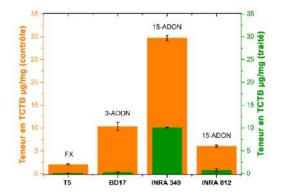
Les trichothécènes de type B sont considérés comme des déterminants principaux dans l'agressivité de F. culmorum et de F. graminearum (Wagacha et Muthomi 2007; Muthomi et al., 2000 ; Eudes et al., 2001). Selon leur production, les souches de F. culmorum et de F. graminearum se répartissent dans deux groupes : le chémotype NIV, regroupant les isolats produisant du nivalénol et de la fusarénone X, et le chémotype DON, comprenant les isolats produisant du DON et de l'acétyldeoxynivalénol (Wagacha et Muthomi 2007 ; Bakan et al., 2001).

Bakan et al., (2001) ont trouvé que les trichothécènes totaux varient entre 0,052 à 68,1 mg/kg, chez soixante souches de F. culmorum. Des échantillons d'épis de blé polonais infectés par F. culmorum et F. graminearum ont été contaminés par DON (100 %) et 3-ADON (80 %), à des concentrations très élevées (30,4 et 29,54 mg/kg, respectivement (Visconti et al., 1986, Bottalico et Perrone, 2002).

Cependant, 140 échantillons d'épis de blé bulgare infectés par les F. graminearum produisant du 3-ADON et du 15-ADON, contaminent 2,1 et 0,7 % de l'ensemble avec des concentrations qui dépassent 0,1 mg/kg (Bottalico et Perrone 2002 ; Vrabcheva et al., 1996). Une autre étude, menée par Touati-Hattab et al., (2016), sur des isolats algériens d'Oued Smar et Rouiba, a révélé une corrélation entre le niveau d'invasion de F. culmorum et la quantité de toxines de TCTB accumulées. Ces auteurs ont enregistré une production de DON variant entre 89,0 et 340,5 µg/g et de 3-ADON allant de 52,6 à 284,2 μg/g.

Dans notre étude, l'inhibition de la production des mycotoxines a été analysée en présence de 0,25 µl/ml, de chacun de nos extraits en milieu liquide (Figure 35). Dans le cas de l'extrait de feuilles, la production de mycotoxines était plus sensible à la présence d'huile essentielle, chez les souches de F. culmorum, où le taux de variation entre le temoin et le post-traitement est de 95 à 97 % d'inhibition, pour FX et 3-ADON (Annexe 7). Le même résultat a été obtenu pour les souches de F. graminearum (INRA 812), avec une faible résistance pour la souche INRA 349, dont l'inhibition n'était, relativement, que de 66 % (Elhouiti et al., 2017).

D'autre part, l'inhibition de la production de mycotoxines FX, 3-ADON et 15-ADON, avec l'extrait de fleurs était totale (100 %) chez T5, BD17 et INRA 812 (Annexe 7). Cependant, 15-ADON de l'INRA 349 a montré une légère résistance avec 76 % inhibition (Elhouiti *et al.*, 2017).



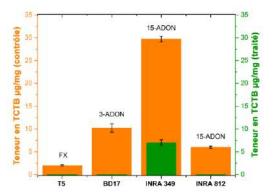


Figure 35 : La production des TCTB en μg/mg de mycélium par les souches de *F. culmorum* et de *F. graminearum*, en absence d'HE (témoin) et dans le traitement avec 0,25 μl/ml d'huiles essentielles des feuilles (à gauche) et de fleurs (à la droite).

Peu d'études concernant l'effet antimycotoxinogène des HE ont été mentionnées dans la bibliographie scientifique ; nous avons trouvé aucune étude consacrée aux Trichothécènes de type B.

Solimana et Badeaab (2002), ont travaillé sur *Aspergillus flavus*, *A. parasiticus* et *A. ochraceus*, producteur de mycotoxines de type Aflatoxines, Ochratoxine et Fumonisine. Leurs résultats ont montré que les champignons toxigènes testés sont sensibles à 12 huiles essentielles, avec une sensibles, relativement, supérieure à celles du thym et de la cannelle.

III.12.2 L'effet des composés bioactifs purs sur la production des Trichothécènes TCTB

Nos résultats montrent que la production des mycotoxines de type B (Figure 36), des souches de *F. graminearum*, est faiblement affectée et inhibée par l'α-Pinène. Le même résultat a été enregistré pour le Limonène avec les souches de *F. culmorum*. Le Géraniol et le Linalool ont eu un effet inhibiteur très élevé sur la production des TCTB pour toutes les souches. Cet effet est très similaire à celui de l'HE pure ayant présenté un pourcentage d'inhibition de production des TCTB de 95 à 98 %, pour les souches de *F. culmorum* et de 66 à 88 %, pour les souches de *F. graminearum*.

Des résultats similaires ont été rapportés par Fleurat-Lessard *et al.*, (2014) pour le Géraniol et le Linalool, sur la souche INRA 349 (*F. graminearum*). La synergie des composants bioactifs a révélé une grande activité inhibitrice de la production des TCTB, pour toutes les souches ; cet effet étant proche à celui de l'HE pure.

Pareil que pour les autres espèces du genre Fusarium, une relation significativement positive a été notée entre l'agressivité, de F. culmorum et de F. graminearum, et la production en DON dans les graines infectées (Mesterházy et al., 1999).

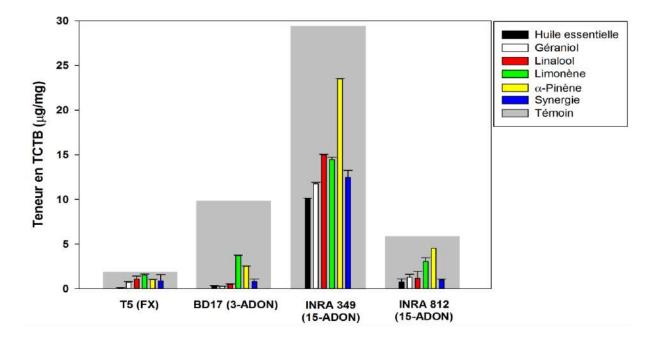
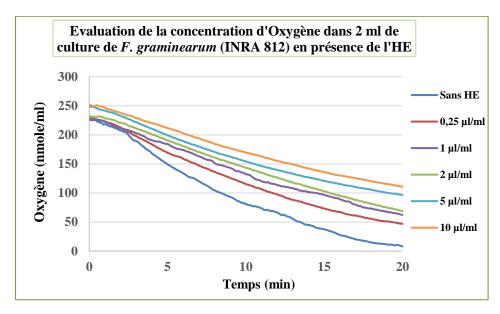


Figure 36 : La production des mycotoxines TCTB en μg/mg de mycélium par les souches de *F*. culmorum et de F. graminearum en présence des composants bioactifs volatils et de l'HE à une concentration de 0,25 µl/ml.

III.13 L'effet des huiles essentielles sur la respiration des souches fongiques

Cette analyse nous a permis de confirmer l'effet de l'huile essentielle de R. adpressum sur la consommation d'oxygène, par les souches fongiques, et sa diminution dans le milieu liquide. La diminution de dioxygène dans le milieu de culture, saturé par ce gaz au départ, nous laisse penser que ce résultat serait dû à une atteinte de la chaine respiratoire de ces souches.

Ainsi, nos résultats nous permettent de suggérer que notre extrait d'HE a un impact sur la chaine respiratoire de F. graminearum (souches INRA 812 et INRA 349) (Figure 37). Cet effet est plus accentué sur F. culmorum (souches T5 et BD17) où la diminution d'oxygène était observable dès l'ajout de l'HE (Figure 38).



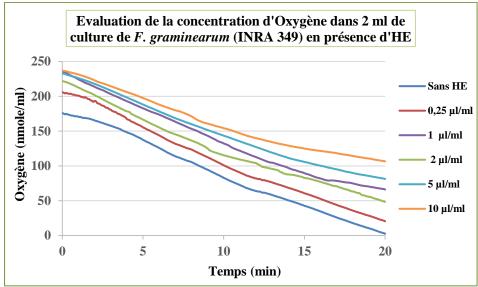
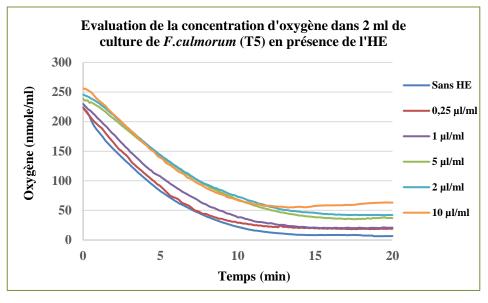


Figure 37 : Evolution de la concentration en dioxygène (nmol/ml), en présence de l'huile essentielle de R. adpressum, dans 2 ml de milieu de culture, des champignons INRA 812 et INRA 349.



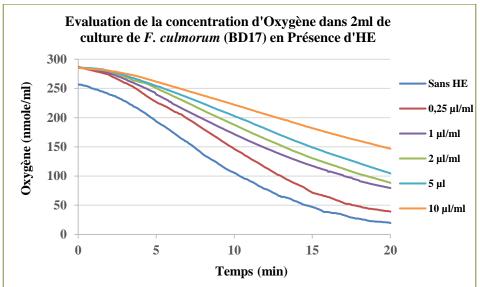


Figure 38 : Evolution de la concentration en dioxygène (nmol/ml), en présence de l'huile essentielle de *R. adpressum*, dans 2 ml de milieu de culture, des champignons T5 et BD17.

A une faible dose d'HE, à raison d'une concentration de 0,25 μl/ml, les vitesses de consommation d'oxygène sont de 0,82 et 0,88 nmole/Sec pour les souches BD17 et T5, respectivement. Des vitesses de 0,51 et 0,52 nmole/Sec ont été enregistrées pour les souches INRA 349 et INRA 812, respectivement. A une dose plus forte d'HE, 10 μl/ml, des vitesses de consommation d'oxygène de 0,40 et 0,75 nmole/Sec ont été enregistrées, respectivement, pour les souches BD17 et T5, et une de vitesse de 0,40 nmole/Sec pour les souches INRA 349 et INRA 812 (Tableau 14).

Tableau 14: Vitesses de consommations d'Oxygène en (nmole/seconde) des souches (F. culmorum et F. graminearum), en absence d'HE (Témoin) et en présence d'HE (traités) à différentes concentrations d'huiles essentielles.

		Vitesses de consommation de l'O2 en (nmole/seconde)									
		Témoins 0.25 μl/ml 1 μl/ml 2 μl/ml 5 μl/ml 10 μ									
Fusarium culmorum	BD17	0,84	0,82	0,65	0,62	0,53	0,40				
1 usurum cumorum	T5	0,90	0,88	0,87	0,85	0,81	0,75				
Fusarium graminearum	INRA 349	0,54	0,51	0,45	0,44	0,43	0,40				
r usurum grammearum	INRA 812	0,72	0,52	0,49	0,48	0,43	0,40				

En résumé, la variation de la consommation et la diminution de l'oxygène sont influencés par la concentration de l'HE ajoutée. La chaine respiratoire serait une cible potentielle de certains composés de l'HE. Cependant, une différence de sensibilité, aux composés, existe selon l'espèce de champignon étudiée.

III.14 L'expression des gènes clés de la biosynthèse des Trichothécènes TCTB en presence de l'huile essentielle

Afin d'évaluer les effets au niveau transcriptionnel impliqués dans l'inhibition de la biosynthèse du Trichothécènes de type B par l'huile essentielle, Nous avons analysé l'expression de plusieurs gènes représentatifs clés, impliqués dans la voie de la biosynthèse des TCTB (Tri4, Tri5, Tri6, Tri12 et Tri101) ainsi que les deux gènes (Mnsod 2.1 mitochondrial et Mnsod 2.2 nucléique) responsables du stress oxydant.

L'expression de tous les gènes Tri étudiés était plus faible dans la culture supplémentée d'huile essentielle comparée au témoin, pour les deux souches de Fusarium testées (BD17 et INRA 349) ; avec des taux d'inhibition différents. Comparée à la souche INRA 349, la souche BD17 a présenté des taux d'inhibition plus élevés et très significatifs. Ceci pourrait être expliqué par la synthèse retardée de mycotoxines pour le F. culmorum, par rapport à F. graminearum (Figure 39).

Une inhibition significative de l'expression induite par l'HE sur le F. culmorum (BD17) a été observée pour les gènes Tri4, Tri5 et Tri101, tandis que pour les gènes Tri6 et Tri12, une répression a été observée, en comparant leurs valeurs de Cp avec les autres gènes (Tableau 15). Cette diminution a été statistiquement non significative car nous n'avons pas pu quantifier le produit pour les trois répétions. Ainsi, le gène de l'oxygénase Tri4 et celui de la biosynthèse Tri5 ont été 6,07 et 7,84 fois moins exprimés, respectivement, dans les cultures traitées à l'HE, tandis que l'expression du gène transporteur *Tri10*1 a été réduite de 4,72 fois (Figure 40).

Tableau 15 : Valeurs des *Cp* des différents gènes étudiés pour les deux souches.

			UBH	Tri4	Tri5	Tri6	Tri12	Tri101	Mnsod2.1	Mnsod2.2
		Rep 1	25,29	31,08	21,44	32,25	32,21	28,57	22,70	21,55
	Ech Contrôle	Rep 2	25,21	30,67	20,70	31,61	31,91	28,18	22,17	21,52
F. culmorum (BD 17)	Controle	Rep 3	25,24	30,82	21,09	31,55	31,96	28,15	22,52	21,66
, ,		Rep 1	25,01	37,92	30,73	NQ	NQ	34,55	20,86	19,69
	Ech Traités	Rep 2	24,69	36,41	25,20	36,05	35,78	30,65	20,51	19,37
		Rep 3	25,14	NQ	30,11	NQ	NQ	33,15	20,76	21,25
		Rep 1	26,18	22,68	20,84	30,81	28,18	27,26	23,32	20,52
	Ech Contrôle	Rep 2	26,08	21,99	20,43	30,51	28,22	27,01	23,22	20,36
F. graminearum	Controle	Rep 3	25,24	21,73	20,40	29,69	27,31	26,17	22,38	19,55
(INRA 349)		Rep 1	25,85	23,60	20,92	30,81	28,96	26,98	22,71	20,25
	Ech Traités	Rep 2	26,04	23,56	21,10	30,99	29,10	26,96	22,99	20,32
	Traites	Rep 3	25,27	23,50	20,67	30,60	28,45	26,74	22,01	20,36

NQ: Produit spécifique non quantifié

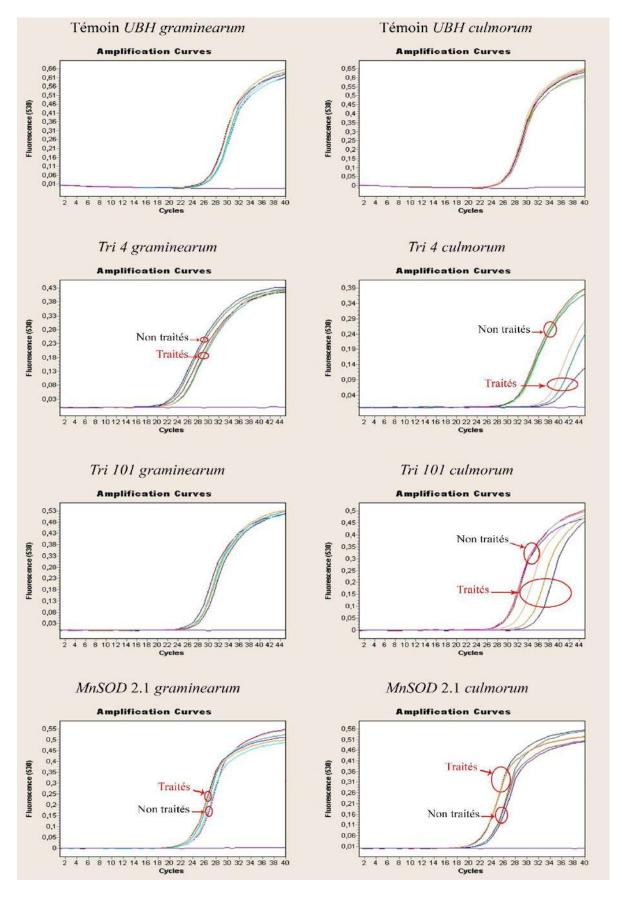


Figure 39: Modulation de l'expression génétique de quelque gènes Tri et Mnsod chez Fusarium culmorum et Fusarium graminearum en présence de l'huile essentielle de R. adpressum.

En outre, l'expression des gènes chez le F. graminearum Tri4, Tri5, Tri6, Tri12, Tri101 a été réduite de 1.42, 0.45, 0.53, 0.90 et 0.19 fois, respectivement, dans des cultures traitées. Ce résultat montre une faible inhibition pour tous les gènes Tri. Les résultats de l'expression de ces gènes (Figure 40) suggèrent que la diminution de la production de toxine observée dans les cultures supplémentées en huile essentielle pourrait résulter d'une répression exercée sur l'expression des gènes Tri.

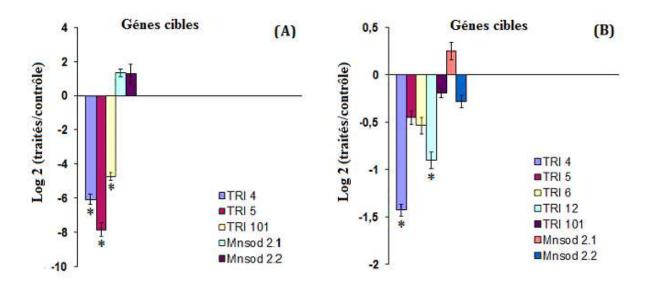


Figure 40 : Expression des gènes en culture additionnées d'huile essentielle, en comparaison avec une culture témoin. (A) Expression des gènes (rapport d'expression traité/non traité à l'échelle Log 2) chez F. culmorum (BD17). (B) Expression des gènes (rapport d'expression traité/non traité à l'échelle Log 2) chez F. graminearum (INRA 349). L'étoile (*) indique une différence significative pour la culture traitée par rapport au témoin (p < 0.05).

Ceci suggère, pour la première fois, que l'inhibition de la synthèse de toxines par notre huile essentielle pourrait être régulée au niveau de la transcription. Des résultats comparables, sur les métabolites secondaires tels que les composés phénoliques et leurs effets sur la biosynthèse des TCTB en réprimant l'expression des gènes *Tri*, ont été faites.

Boutigny et al., (2010), suggèrent que les acides phénoliques naturels du blé inhibent in vitro la biosynthèse du Trichothécènes de type B de F. culmorum, en réprimant l'expression du gène Tri. D'autres travaux similaires ont été obtenus par Ferruz et al., (2016). Ils ont montré que les acides phénoliques ont un effet variable sur la croissance fongique et la production de mycotoxines, en fonction de la souche, de la concentration et du type d'acide phénolique testé.

Nos résultats appuient ces travaux, ayant suggéré que la biosynthèse des trichothécènes de type B pourrait être régulée au niveau de la transcription; la production étant affectée par des métabolites secondaires tels que les acides phénoliques et les huiles essentielles.

Par ailleurs, le niveau de l'expression des gènes de réponse au stress oxydatif a été analysé en présence de l'huile essentielle, pour les deux souches testées. Dans les deux cas, les deux gènes codant pour la Mnsod 2.1 mitochondrial ou la Mnsod2.2 nucléique étaient surexprimés chez F. Culmorum (BD17) mais pas chez F. graminearum (INRA 349) (Figure 40). Nous suggérons que les huiles essentielles inhiberaient la fonction mitochondriale, entraînant potentiellement un stress oxydatif causé par un relargage d'électrons de la chaîne respiratoire.

La réponse au traitement à l'HE ne module pas significativement l'expression des gènes de réponse au stress oxydantif. Cependant, elle module fortement l'expression des gènes Tri associés à la production de trichothécènes de type B, à la CI₅₀.

Enfin, nos résultats ont démontré que l'huile essentielle de R. adpressum a un effet sur la modulation de l'expression génétique de quelques gènes Tri responsables de la biosynthèse des Trichothécènes de type B. Il serait intéressant de reproduire ce résultat pour la souche F. graminearum, en faisant cinétique dans le temps avec une analyse PCRq, afin de cerner la biosynthèse des TCTB et confirmer la modulation de l'expression génétique.

Conclusion

Conclusion

L'emploi intensif des produits chimiques dans la lutte contre les champignons phytopathogènes mycotoxinogènes, représente un réel danger pour la planète. Il est donc plus que nécessaire de trouver des solutions alternatives, dites biologiques, en utilisant des substances naturelles à propriété antifongique.

Au terme de cette étude, nos résultats nous permettent déduire ce qui suit :

Les résultats de l'analyse chimique de la composition des huiles essentielles du *R. adpressum* par la chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectroscopie de masse (CG/SM) et l'identification des constituants, par la comparaison des indices de rétentions obtenus avec ceux de la littérature, indiquent :

Trente-six (36) composés ont été identifiés dans les huiles essentielles d'échantillons dont la collecte a été échelonnée dans le temps. Les constituants présents en pourcentages majoritaires sont le Camphène (6,86-25,49 %), la β -Myrcène (0,7-17,25 %), l' α -Pinène (8,34-15,64 %), le β -Pinène (2,52-13,91 %), le Linalool (0.18-6,07 %) et la Sabinène (0,83-8,97 %). Ces composés sont répartis en quatre classes de pourcentages variables selon le mois de la collecte. Les hydrocarbures monoterpéniques (feuilles : 22,50 à 69,71 %; fleurs : 34,11 à 49,28 %) ont présenté les pourcentages les plus élevés. Les monoterpéniques oxygénés (feuilles : 4,24 à 13,32 %, fleurs : 4,05 à 12,64 %) sont moins représentés et les pourcentages les plus faibles sont ceux des hydrocarbures sesquiterpéniques (feuilles : 2,61 à 7,29 %, fleurs : 1,46 à 4,98 %) et les sesquiterpènes oxygénés (feuilles : 1,97 à 6,42 %, fleurs : 1,64 à 7,93 %).

Les HE des échantillons d'issus des diverses régions, ont permis d'identifier 41 composants chimiques à partir des feuilles et fleurs. Les hydrocarbures monoterpéniques composent la classe majeure (40 à 53 %) suivis par les monoterpènes oxygénés (22 à 47 %), les sesquiterpènes oxygénés (15 à 38%) et les hydrocarbures sesquiterpéniques (7 à 26%). Les composants majoritaires sont le α-Pinène (11 à 29 %), le β-Myrcène (17 à 28 %), le Linalool (20 à 31 %), l'α-Terpinéol (21 à 24 %), l'α-Cadinol (9 à 17 %) et le β-Eudesmol (9 à 20 %). L'ACP et l'CAH ont révélé trois classes chimiques (groupe I, II et III) dans l'ensemble de nos échantillons.

La première classe est dominée par le Linalool/α-Terpinéol (M=52%, SD=3.56%), la deuxième par l'α-Pinène/β-Myrcène (M=57%, SD=3.44%) et la troisième par des pourcentages élevés de lα-Pinène/β-Myrcène/α-Terpinéol (M=64 %, SD=3.33 %). Les HE de feuilles appartiennent à un groupe chimique différent de celui des échantillons de fleurs.

L'évaluation de la croissance fongique, en milieu solide, a révélé que le taux d'inhibition de la croissance des deux espèces de Fusarium augmente avec les doses d'HE utilisées, quel que soit le composé volatil testé. Une sensibilité remarquable de toutes les souches a été observé, à partir de la concentration de 1 µl/ml (l'inhibition de la croissance était très importante). Les deux souches de F. graminearum semblent être beaucoup plus sensible à l'extrait de fleurs, en particulier la souche INRA 812. Egalement, Les deux souches de F. culmorum présentent une sensibilité envers l'extrait de fleurs à partir de la concentration 4 µl/ml. Cependant, l'extrait des feuilles s'est avéré, relativement, moins actif ; l'effet sur la croissance mycélienne n'est observé qu'à partir de 2 µl/ml. Les souches INRA 349 et l'INRA 812 de Fusarium graminearum étaient moins affectées que les souches de Fusarium culmorum.

Les tests in vitro du pouvoir antifongique sur les deux milieux, solide et liquide, ainsi que le pouvoir antimycotoxinogène, sur milieu liquide, ont permis d'estimer l'action de nos huiles essentielles, celle des produits bioactifs purs et leur mélange vis-à-vis de quatre souches (F. culmorom T5 et BD17; F. graminearum INRA812 et INRA 349). Ces expériences révèlent une grande sensibilité.

Les extraits d'HE de la partie aérienne, feuilles et fleurs, ont montré une grande activité antifongique vis-à-vis de toutes les souches testées ; en particulier les souches T5 et INRA 812. Cette activité est très importante à partir de la plus faible concentration (0,5 µl/ml). La souche T5 montre la plus grande sensibilité avec une CI₅₀ de 0,09 µl/ml et une CMI de 12,31 µl/ml, en milieu liquide. En générale, l'activité de l'HE de fleurs est observable sur les deux milieux ; avec des concentrations apréciables de IC50 et MIC

Concernant les composés bioactifs purs, une variabilité de l'inhibition a été remarquée pour les différents produits et sur les deux milieux. Les pourcentages d'inhibition du Géraniol et du Linalool sont élevés, à partir de la concentration 2 µl/ml, pour toutes les souches. Une action inhibitrice modérée a été enregistrée pour le β-Myrcène avec une concentration élevée (10 μl/ml), pour toutes les souches et sur les deux milieux. L'action synergique du mélange des cinq composés a révélé une grande activité inhibitrice de la croissance mycélienne, en milieu liquide et en milieu solide, à partir de la concentration 1 µl/ml.

L'ampleur du pouvoir antifongique en milieu solide et liquide et l'effet sur la croissance mycélienne varient avec les concentrations utilisées et la composition chimique des extraits testés. En général, les taux d'inhibition des deux espèces de Fusarium augmentent avec les doses utilisées quel que soit le composé volatil testé (HE pure ou composés bioactifs).

Les résultats de cette activité pour les deux extraits d'HE (feuilles et fleurs) ont révélé qu'elles sont dotées d'un pouvoir antifongique important. Les tests du pouvoir antifongique des composés purs testés, séparément, nous ont permis de confirmer que :

- ✓ La proportion d'un composé dans une huile essentielle (majoritaire ou minoritaire) ne reflète pas forcément l'intensité de son activité;
- ✓ Le pouvoir antifongique d'une HE est dû aux groupements fonctionnels de ses composés;
- ✓ Les composés oxygénés sont plus actifs que les hydrocarbures terpéniques.

En comparant l'activité des composés testés, séparément ou bien mélangés, avec celles les HE, on peut conclure que l'activité antifongique du Géraniol et celle des composés testés en mélange sont les plus similaires comparés aux HE pures de R. adpressum. Cette activité antifongique de l'HE pure pourrait être due à sa composition chimique, d'une part, et l'effet synergique de ses constituants, d'autre part.

Les résultats de l'activité antimycotoxinogène ont prouvé que l'inhibition de la production de mycotoxines FX, 3-ADON et 15-ADON, avec l'extrait de fleurs, était totale (100 %), chez T5, BD17 et INRA 812. Cependant, la 15-ADON, de la souche l'INRA 349, a montré une faible résistance (76 % inhibition). Le Géraniol et le Linalool, testés séparément, ont montré un effet inhibiteur très élevé sur la production des TCTB, pour toutes les souches. Cet effet est très similaire à celui de l'HE pure qui a présenté un pourcentage d'inhibition de la production des TCTB de 95 à 98 %, pour les souches de F. culmorum, et de 66 à 88%, pour les souches de F. graminearum. Les souches de F. graminearum et F. culmorum ont été faiblement affectées (inhibées) par la présence de l'α-Pinène et le Limonène, respectivement.

L'analyse de l'effet de nos HE sur la consommation de l'oxygène par les souches fongiques nous permettent de supposer que la chaine respiratoire des souches a été, probablement, touchée ; plus visible sur F. culmorum (souche T5 et BD17) et, relativement, moins chez graminearum (souche INRA 812 et INRA 349).

L'étude de l'effet des HE de R. adpressum, au niveau transcriptionnel, a montré une modulation de l'expression de plusieurs gènes clés impliqué dans la voie de la biosynthèse des Trichothécènes de type B. La souche BD17 a présenté des taux d'inhibition élevés et très significatifs comparée à la souche INRA 349. Une inhibition significative de l'expression a été observée chez F. culmorum (BD17), pour les gènes Tri4, Tri5 et Tri101.

L'analyse des gènes de réponse au stress oxydatif, en présence de l'HE et pour les deux souches testées, révèle que le gène codant pour la Mnsod 2.1 mitochondrial était surexprimé, chez les deux souches testées, et le gène codant pour Mnsod 2.2 nucléique était surexprimés, chez F. Culmorum (BD17) mais pas chez F. graminearum (INRA 349).

Ce travail fournira des solutions pour la préservation des graines stockées, nourriture ou semence, en proposant des molécules naturelles d'origine végétale pouvant servir d'agents antifongiques. Ces produits, exemptes d'effets délétères sur les cultures, pourraient remplacer, partiellement ou totalement, les fongicides chimiques utilisés habituellement. Ces résultats prouvent, ainsi, que l'utilisation des composés bioactifs dans les stratégies de contrôle de la croissance fongique dans les cultures doit être serennement discutée.

Il est à noter que ces résultats, prometteurs, obtenus in vitro, ne constituent qu'une première étape dans la recherche de substances naturelles biologiquement active. Ainsi, des essais complémentaires seront nécessaires et devront pouvoir confirmer les performances mises en évidence. Ce travail mérite d'être poursuivi et approfondi :

- ✓ Il serait intéressant de reproduire nos résultats sur d'autres souches F. graminearum, en faisant la cinétique dans le temps, lors de l'extraction des TCTB avec une analyse PCRq afin de cerner la biosynthèse des TCTB et confirmer la modulation de l'expression génétique;
- ✓ Il est souhaitable de faire des études, plus approfondie, complémentaires sur les différents chémotypes caractérisant les populations de cette plante, selon l'altitude, le type de terrain et les conditions climatiques ; avec si possible, une vérification avec des outils informatiques de pointe;
- ✓ Une étude plus approfondie devrait être réalisée pour caractériser les constituants inhibiteurs de notre huile essentielle afin de proposer leur(s) mécanisme(s) d'action moléculaire; donc un Docking est envisageable;
- ✓ En particulier, l'étude moléculaire de la régulation transcriptionnelle pourra être poursuivie afin d'identifier le ou les régulateurs mis en jeu, en testant d'autres gènes qui codent pour quelques enzymes clés du cycle de Krebs, du Cytochrome P450 et de la Trichodiene Synthase;
- ✓ Les extraits naturels pourraient être considérés comme des alternatives appropriées pour le contrôle des maladies fongiques chez les plantes. Cependant, une formulation adaptée et une maîtrise des phénomènes d'absorption dans les grains restent à approfondir;
- ✓ En fin, il faudrait penser à passer de l'état spontané de la plante à la culture, en optimisant les conditions de la production d'une huile essentielle bioactive.

Références Bibliographiques

Références bibliographiques

- **Abbas, H. K., Williams, W. P., Windham, G. L., Pringle, H. C., Xie, W., & Shier, W. T.** (2002). Aflatoxin and fumonisin contamination of commercial corn (Zea mays) hybrids in Mississippi. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(18), 5246-5254.
- **Abdel-Kader, M. M., El-Mougy, N. S., El-Gamal, N. G., El-Mohamdy, R. S., & Fatouh, Y. O.** (2012). In vitro assay of some plant resistance inducers, essential oils and plant extracts on antagonistic ability of fungal bio-agents. *J Appl Sci Res*, 8(3), 1383-1391.
- **Aboul, M. E., El-Shaer, N. S., & Ghanem, N. B.** (1996). Antimicrobial evaluation and chromatographic analysis of some essential and fixed oils. *Die Pharmazie*, 51(12), 993-994.
- Adam, K., Sivropoulou, A., Kokkini, S., Lanaras, T., & Arsenakis, M. (1998). Antifungal activities of *Origanum vulgare* subsp. hirtum, Mentha spicata, *Lavandula angustifolia*, and *Salvia fruticosa* essential oils against human pathogenic fungi. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46(5), 1739-1745.
- **Adams, R. P. (2007)**. Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry. *4th ed*. Allured Publ. Corp, Carol Stream.
- Adams, S., Kunz, B., & Weidenbörner, M. (1996). Mycelial deformations of *Cladosporium herbarum* due to the application of eugenol or carvacrol. *Journal of Essential Oil Research*, 8(5), 535-540.
- **Adejumo, T. O., Hettwer, U., & Karlovsky, P. (2007)**. Occurrence of *Fusarium* species and trichothecenes in Nigerian maize. *International journal of food microbiology*, 116(3), 350-357.
- **Afnor** (1989). Recueil de normes françaises," huiles essentielles". AFNOR, 3ème Edition, Paris,609.
- Altintas, A., Tabanca, N., Wedge, D.E., Kosar, M., Ozek, T., & Baser, K.H.C. (2006). Characterization of volatile constituents of *Origanum onites* and their antifungal activities against phytopathogens. *Presented at the 37th International Symposium on Essential Oils* (ISEO Grasse, France, 10-13.
- Alvarez-Castellanos, P. P., Bishop, C. D., & Pascual-Villalobos, M. J. (2001). Antifungal activity of the essential oil of flowerheads of garland chrysanthemum (*Chrysanthemum coronarium*) against agricultural pathogens. *Phytochemistry*, 57(1), 99-102.
- **Anderberg, A. A. (1991)**. Taxonomy and phylogeny of the tribeInuleae (Asteraceae). *Plant Systematics and Evolution*, 176(1-2), 75-123.
- Anses (2009). Évaluation des risques liés à la présence de mycotoxines dans les chaînes alimentaires humaine et animale, Rapport d'expertise de l'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail, 308.
- Aoudou, Y., Léopold, T. N., Michel, J. D. P., Franccedil, E., & Moses, M. C. (2010). Antifungal properties of essential oils and some constituents to reduce foodborne pathogen. *Journal of yeast and fungal research*, 1(1), 001-008.

- **Arab, K., Bouchenak, O., & Yahiaoui, K.** (2014). Etude phytochimique et évaluation de l'activité antimicrobienne et antioxydante de l'huile essentielle et des composés phénoliques du pistachier lentisque (*Pistacia lentiscus* L.). *J. Fundment. Appl. Sci*, 6(1), 79-93.
- **Ash, G. J.** (2010). The science, art and business of successful bioherbicides. *Biological Control*, 52(3), 230-240.
- **Awad, M., & Abdelwahab, A. (2016)**. Chemical diversity of essential oils from flowers, leaves, and stems of *Rhanterium epapposum* Oliv. growing in northern border region of Saudi Arabia. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 6(9), 767-770.
- **Ayalew, A., Fehrmann, H., Lepschy, J., Beck, R., & Abate, D.** (2006). Natural occurrence of mycotoxins in staple cereals from Ethiopia. *Mycopathologia*, 162(1), 57-63.
- **Bajpai, V. K., Shukla, S & Sharma, A. (2013)**. Essential oils as antimicrobial agents. In: Rramawat KG, *Merillon JM (eds) Natural products. Springer*, Berlin, Heidelberg, 3975-3988
- **Bajwa, R., Shafique, S., Anjum, T., & Shafique, S.** (2004). Antifungal activity of allelopathic plant extracts IV: growth response of *Drechslera hawaiiensis*, *Alternaria alternata* and *Fusarium monilifrome* to aqueous extract of *Parthenium hysterophorus*. *Int J Agric Biol*, 6(3), 511-16.
- Bakan, B., Pinson, L., Cahagnier, B., Melcion, D., Semon, E., & Richard-Molard, D. (2001). Toxigenic potential of *Fusarium culmorum* strains isolated from French wheat. *Food Additives & Contaminants*, 18(11), 998-1003.
- **Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D., & Idaomar, M.** (2008). Biological effects of essential oils—a review. *Food and chemical toxicology*, 46(2), 446-475.
- Barkley, T. M., Brouillet, L., & Strother, J. L. (1993). Magnoliophyta: Asteridae: Asteraceae, part 1 vol. 19, part 2 vol. 20, and part 3 vol. 21. Flora of North America Editorial Committee, Eds.
- Barrera-Necha, L. L., Garduno-Pizana, C., & Garcia-Barrera, L. J. (2009). In vitro antifungal activity of essential oils and their compounds on mycelial growth of *Fusarium oxysporum* f. sp. *gladioli* (Massey) Snyder and Hansen. *Plant Pathology Journal*, 8(1), 17-21.
- Başer, K. H. C., & Buchbauer, G. (2010). Handbook of Essential Oils: Science. *Technology and Applications, CRC Pres, Boca Raton, London, New York*, 994.
- Baser, K. H. C., & Buchbauer, G. (Eds.). (2015). Handbook of essential oils: science, technology, and applications. CRC Press.
- **Battandier, J. A., & Trabut, L.** (1888). Flore de l'Algérie, ancienne" Flore d'Alger" transformée. *Dicotylédones. I.* F. Savy.
- Benkert, P., Künzli, M., & Schwede, T. (2009). QMEAN server for protein model quality estimation. *Nucleic acids research*, 37(suppl-2), W510-W514.
- Bennett, J. W., & Klich, M. Mycotoxins Clin Microbiol Rev (2003); 16: 497–516. CrossRef/PubMed, CAS, Web of Science® Times Cited, 428.

- Benzo, M., Gilardoni, G., Gandini, C., Caccialanza, G., Finzi, P. V., Vidari, G., ... & Layedra, P. (2007). Determination of the threshold odor concentration of main odorants in essential oils using gas chromatography—olfactometry incremental dilution technique. *Journal of chromatography A*, 1150(1-2), 131-135.
- Bernard, T., Perineau, F., Bravo, R., Delmas, M., & Gaset, A. (1988). Extraction des huiles essentielles : chimie et technologie. *Informations chimie*, (298), 179-184.
- **Besombes**, C. (2008). Contribution à l'étude des phénomènes d'extraction hydro-thermomécanique d'herbes aromatiques : applications généralisées (Doctoral dissertation, La Rochelle).
- Böhme, K., Barros-Velázquez, J., Calo-Mata, P., & Aubourg, S. P. (2014). Antibacterial, antiviral and antifungal activity of essential oils: Mechanisms and applications. In *Antimicrobial Compounds* (pp. 51-81). Springer, Berlin, Heidelberg.
- **Boonchird, C., & Flegel, T. W.** (1982). In vitro antifungal activity of eugenol and vanillin against *Candida albicans* and *Cryptococcus neoformans*. *Canadian Journal of Microbiology*, 28(11), 1235-1241.
- **Bottalico**, A., & Perrone, G. (2002). Toxigenic Fusarium species and mycotoxins associated with head blight in small-grain cereals in Europe. In *Mycotoxins in Plant Disease* (pp. 611-624). Springer, Dordrecht.
- **Bouaziz, M., Dhouib, A., Loukil, S., Boukhris, M., & Sayadi, S. (2009)**. Polyphenols content, antioxidant and antimicrobial activities of extracts of some wild plants collected from the south of Tunisia. *African Journal of Biotechnology*, 8(24),7017-7110.
- Bouheroum, M., Benayache, S., Benayache, F., Zaiter, L., Barrera, J. M., & Francisco, L. (2007). Terpenoids and triynepoxide from the aerial part of Rhantherium adpressum. *Chemistry of Natural Compounds*, 43(1), 110-111.
- **Boureghda, H., & Bouznad, Z.** (2009). Lutte biologique contre la fusariose de Chicpea en utilisant des isolats de *Trichoderma harzianum* et *T. reesei*. *Acta Phytopathologica et Entomologica Hungaria*, 44(1),25-38.
- **Bourrel, C., Vilarem, G., & Michel, G. (1995)**. Analyse chimique et propriétés fongistatiques de quelques huiles essentielles en milieu liquid. Effects sur la morphogénes hyphale. *Riv Ital EPPOS*, *17*, 31-41.
- Boussoussa, H., Hamia, C., Djeridane, A., Boudjeniba, M., & Yousfi, M. (2014). Effect of different solvent polarity on extraction of phenolic compounds from Algerian *Rhanterium adpressum* flowers and their antimicrobial and antioxidant activities. *Current Chemical Biology*, 8(1), 43-50.
- **Boutigny, A. L.** (2007). Identification dans les grains de blé dur de composés inhibiteurs de la biosynthèse des trichothécènes B par *Fusarium*. *PhD*, *University of Bordeaux I*, *France*.
- Boutigny, A. L., Atanasova-Pénichon, V., Benet, M., Barreau, C., & Richard-Forget, F. (2010). Natural phenolic acids from wheat bran inhibit *Fusarium culmorum* trichothecene biosynthesis in vitro by repressing Tri gene expression. *European journal of plant pathology*, 127(2), 275-286.

- **Bouzid, N., Toulgouate, K., Villarem, G., & Gaset, A.** (1997). Analyse quantitative des fractions d'huile essentielle pouvant co-exister lors d'hydrodistillation de plants aromatiques. *Revista Ital. Eppos*, 79, 15-25.
- **Boyraz, N., & Özcan, M.** (2006). Inhibition of phytopathogenic fungi by essential oil, hydrosol, ground material and extract of summer savory (*Satureja hortensis* L.) growing wild in Turkey. *International journal of food microbiology*, 107(3), 238-242.
- **Broydé, H., & Doré, T. (2013)**. Effets des pratiques agricoles sur la contamination des denrées par les mycotoxines issues de *Fusarium* et *Aspergillus* spp. *Cahiers Agricultures*, 22(3), 182-194.
- **Bruneton, J., & Massiot, G. (1994)**. Pharmacognosie: Phytochimie, Plantes Medicinales. 4e édition, Paris: Lavoisier, *Phytochemistry*, *36*(1), 258.
- Buronzo, A. (2008). Grand guide des huiles essentielles. Hachette Pratique, 256.
- **Burt, S. (2004)**. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foodsa review. *International journal of food microbiology*, 94(3), 223-253.
- Cakir, A., Kordali, S., Zengin, H., Izumi, S., & Hirata, T. (2004). Composition and antifungal activity of essential oils isolated from *Hypericum hyssopifolium* and *Hypericum heterophyllum*. Flavour and Fragrance Journal, 19(1), 62-68.
- Cárdenas-Ortega, N. C., Zavala-Sánchez, M. A., Aguirre-Rivera, J. R., Pérez-González, C., & Pérez-Gutiérrez, S. (2005). Chemical composition and antifungal activity of essential oil of *Chrysactinia mexicana* Gray. *Journal of agricultural and food chemistry*, 53(11), 4347-4349.
- Cardiet, G. (2010). Effets biologiques d'huiles essentielles d'origine végétale et des substances actives associées sur insectes et champignons des grains. *Université de Bourgogne*, Dijon, 48.
- Cardiet, G., Fuzeau, B., Barreau, C., & Fleurat-Lessard, F. (2012). Contact and fumigant toxicity of some essential oil constituents against a grain insect pest *Sitophilus oryzae* and two fungi, *Aspergillus westerdijkiae* and *Fusarium graminearum. Journal of pest science*, 85(3), 351-358.
- Carette, A.S., (2000). La lavande et son huile essentielle. Thèse de doctorat, Université deToulouse, 100.
- Carson, C. F., Mee, B. J., & Riley, T. V. (2002). Mechanism of action of Melaleuca alternifolia (tea tree) oil on Staphylococcus aureus determined by time-kill, lysis, leakage, and salt tolerance assays and electron microscopy. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 46(6), 1914-1920.
- Castegnaro, M., & Pfohl-Leszkowicz, A. (2002). Les mycotoxines : contaminants omniprésents dans l'alimentation animale et humaine. La sécurité alimentaire du consommateur. 2e édition. Paris : Lavoisier, Tec. & Doc, 127-79.
- Chang, S. T., Wang, S. Y., Wu, C. L., Su, Y. C., & Kuo, Y. H. (1999). Antifungal compounds in the ethyl acetate soluble fraction of the extractives of Taiwania (*Taiwania cryptomerioides* Hayata) heartwood. *Holzforschung*, 53(5), 487-490.

- Chao, S. C., Young, D. G., & Oberg, C. J. (2000). Screening for inhibitory activity of essential oils on selected bacteria, fungi and viruses. *Journal of essential oil research*, 12(5), 639-649.
- **Chehma, A.** (2006). Catalogue des plantes spontanées du Sahara septentrional algérien. *Edition Dar El Houda, Algérie, 140p.*
- Chehma, A., Djebar, M. R., Hadjaiji, F., & Rouabeh, L. (2005). Étude floristique spatiotemporelle des parcours sahariens du Sud-Est algérien. *Science et changements* planétaires/Sécheresse, 16(4), 275-285.
- Chermette, R., & Bussieras, J. (1993). Parasitologie vétérinaire. Mycologie, Edité par le Service de Parasitologie de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Maisons-Alfort.
- Chiasson, H., Bélanger, A., Bostanian, N., Vincent, C., & Poliquin, A. (2001). Acaricidal properties of *Artemisia absinthium* and *Tanacetum vulgare* (*Asteraceae*) essential oils obtained by three methods of extraction. *Journal of Economic Entomology*, 94(1), 167-171.
- Chuang, P. H., Lee, C. W., Chou, J. Y., Murugan, M., Shieh, B. J., & Chen, H. M. (2007). Anti-fungal activity of crude extracts and essential oil of *Moringa oleifera* Lam. *Bioresource technology*, 98(1), 232-236.
- Cimanga, K., Kambu, K., Tona, L., Apers, S., De Bruyne, T., Hermans, N., ... & Vlietinck, A. J. (2002). Correlation between chemical composition and antibacterial activity of essential oils of some aromatic medicinal plants growing in the Democratic Republic of Congo. *Journal of ethnopharmacology*, 79(2), 213-220.
- Cirillo, T., Ritieni, A., Galvano, F., & Amodio Cocchieri, R. (2003). Natural co-occurrence of deoxynivalenol and fumonisins B1 and B2 in Italian marketed foodstuffs. *Food Additives & Contaminants*, 20(6), 566-571.
- Claeson, P., Rådström, P., Sköld, O., Nilsson, Å., & Höglund, S. (1992). Bactericidal effect of the sesquiterpene T-cadinol on Staphylococcus aureus. *Phytotherapy Research*, 6(2), 94-98.
- Collin, G. J., Lord, D., Allaire, J., & Gagnon, D. (1991). Huiles essentielles et extraits 'microondes'. *Parfums, Cosmét. Arômes*, 97, 105-112.
- Coppock, R. W., Swanson, S. P., Gelberg, H. B., Koritz, G. D., Hoffman, W. E., Buck, W. B., & Vesonder, R. F. (1985). Preliminary study of the pharmacokinetics and toxicopathy of deoxynivalenol (vomitoxin) in swine. *American journal of veterinary research*, 46(1), 169-174.
- **Corbaz, R.** (1990). Principes de phytopathologie et de lutte contre les maladies des plantes. PPUR presses polytechniques. Suisse, 275.
- **Cowan, M. M. (1999)**. Plant products as antimicrobial agents Clinical Microbiology Reviews, vol. 12. *No.* 4: 564, 582.
- Curtui, V., Usleber, E., Dietrich, R., Lepschy, J., & Märtlbauer, E. (1998). A survey on the occurrence of mycotoxins in wheat and maize from western Romania. *Mycopathologia*, 143(2), 97-103.

- **Dayan, F. E., Cantrell, C. L., & Duke, S. O. (2009)**. Natural products in crop protection. *Bioorganic & medicinal chemistry*, 17(12), 4022-4034.
- De Billerbeck, V. G., Roques, C. G., Bessière, J. M., Fonvieille, J. L., & Dargent, R. (2001). Effects of Cymbopogon nardus (L.) W. Watson essential oil on the growth and morphogenesis of *Aspergillus niger*. *Canadian journal of microbiology*, 47(1), 9-17.
- **Demirci, B., Baser, K. H. C., Tabanca, N., & Wedge, D. E.** (2006). Antifungal activity of *Haplopappus greenei* essential oil towards phytopathogenic *Colletotrichum* species. *J. Agric. Food Chem*, *54*, 3146-3150.
- **Desjardins, A. E. (2006)**. Fusarium mycotoxins: chemistry, genetics, and biology. American Phytopathological Society (APS Press).
- **Desjardins, A. E., & Proctor, R. H. (2007)**. Molecular biology of *Fusarium* mycotoxins. *International journal of food microbiology*, 119(1-2), 47-50.
- **Diaz, G. J., & Boermans, H. J.** (1994). Fumonisin toxicosis in domestic animals : a review. *Veterinary and Human Toxicology*, *36*(6), 548-555.
- **DiMello, J.P.F., Parker, J.K., MacDonald, A.M.C., & Placinta, C.M.** (1997). Fusarium mycotoxins in DiMello JPF, Ed. Handbook of plant and fungal toxicants, CRC Press, Boca Raton FL. 287 301.
- D'mello, J. F., Macdonald, A. M., Postel, D., Dijksma, W. T., Dujardin, A., & Placinta, C. M. (1998). Pesticide use and mycotoxin production in Fusarium and Aspergillus phytopathogens. European Journal of Plant Pathology, 104(8), 741-751.
- **Dobre, A. A., & Niculita, P. (2012)**. Preliminary research to develop active packaging for bakery products using essential oils. *Scientific Bulletin, Series F, Biotechnologies, 16*, 139-144.
- **Dorman, H. J. D., & Deans, S. G. (2000)**. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. *Journal of applied microbiology*, 88(2), 308-316.
- **EFSA** (2013). The 2010 European Union report on pesticide residues in food. *European Food Safety Authority Journa* .11, 808.
- El Ajjouri, M., Satrani, B., Ghanmi, M., Aafi, A., Farah, A., Rahouti, M., ... & Aberchane, M. (2008). Activité antifongique des huiles essentielles de *Thymus bleicherianus* Pomel et *Thymus capitatus* (L.) Hoffm. & Link contre les champignons de pourriture du bois d'oeuvre. *Biotechnologie, Agronomie, Société et Environnement, 12*(4), 345-351.
- ElHouiti, F., Tahri, D., Seba, M., Ouinten, M., Gaydou, E. M., & Yousfi, M. (2016). Inhibition of *Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis* by essential oils of flowers and stems of *Rhanterium adpressum*. *PhOL PharmacologyOnLine*, 3(22), 141-150.
- **ElHouiti F., 2010.** Composition chimique, activité antimicrobienne et antioxydante des huiles essentielles de Rhanterium adpressum. (Mémoire de Magister), Université Amar Telidji, Département de Biologie.
- **Elhouiti, F. (2017).** Valorisation des huiles essentielles de Rhanterium adpressum Algérien : Composition chimique, activités antimicrobiennes et antioxydante. Éditions universitaires européennes.

- Elhouiti, F., Tahri, D., Takhi, D., Ouinten, M., Barreau, C., Verdal-Bonnin, M. N., ... & Yousfi, M. (2017). Variability of composition and effects of essential oils from *Rhanterium adpressum* Coss. & Durieu against mycotoxinogenic *Fusarium* strains. *Archives of microbiology*, 199(10), 1345-1356.
- **Eudes, F., Comeau, A., Rioux, S., & Collin, J. (2001)**. Impact of trichothecenes on *Fusarium* head blight [*Fusarium graminearum*] development in spring wheat (*Triticum aestivum*). *Canadian Journal of Plant Pathology*, 23(3), 318-322.23(3):318-322.
- Ferruz, E., Atanasova-Pénichon, V., Bonnin-Verdal, M. N., Marchegay, G., Pinson-Gadais, L., Ducos, C., ... & Richard-Forget, F. (2016). Effects of Phenolic Acids on the Growth and Production of T-2 and HT-2 Toxins by *Fusarium* langsethiae and *F. sporotrichioides*. *Molecules*, 21(4), 449.
- Field, B., Jordán, F., & Osbourn, A. (2006). First encounters—deployment of defence-related natural products by plants. *New Phytologist*, 172(2), 193-207.
- Fletcher, J., Bender, C., Budowle, B., Cobb, W. T., Gold, S. E., Ishimaru, C. A., ... & Seem, R. C. (2006). Plant pathogen forensics: capabilities, needs, and recommendations. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 70(2), 450-471.
- Fleurat-Lessard, F., Bergougnoux, M., Debourdeau, G., & Barreau, C. (2014, November). In vitro large screening of bioactive compounds of botanical origin for antifungal activity against two mycotoxigenic fungi of wheat: Aspergillus westerdijkiae and Fusarium graminearum. In Actes de la 11e Conférence internationale de travail sur la protection stockée produit (pp. 24-28).
- Franchomme, P. (1981). L'aromatologie à visée anti-infectieuse. Phytomédecine, 1(2), 25-47.
- **Franchomme**, **P., & Pénoël**, **D.** (1990). Clefs pour l'aromathérapie. La molécule aromatique : matière, énergie, information. *L'aromathérapie exactement. RJ Editeur. Limoges*, 73-227.
- Gang, G., Miedaner, T., Schuhmacher, U., Schollenberger, M., & Geiger, H. H. (1998). Deoxynivalenol and nivalenol production by *Fusarium culmorum* isolates differing in aggressiveness toward winter rye. *Phytopathology*, 88(9), 879-884.
- Gari-Toussaint, M., Leguay, J. M., Zur, C., Michiels, J. F., Ferrara, L., Negre, F., & Le Fichoux, Y. (1997). Keratite à Fusarium solani chez une patiente diabétique. *Journal de mycologie médicale*, 7(4), 227-231.
- **Garnero, J.** (1976). Quelques problèmes rencontrés au cours de l'obtention, du contrôle et de l'étude de la composition d'une huile essentielle. *Riv. Ital. Ess. Prof., Pl. Off., Ar., Sap., Cosm., Aerosol, 85*, 105-127.
- **Garnéro, J. (1991)**. Les huiles essentielles, leur obtention, leur composition, leur analyse et leur normalisation, *Editions techniques- Encyclopédie des médecines naturelles*, (Paris, France), *phytothérapie*, *Aromathérapie*, 2-20.
- Garon, D., Richard, E., Sage, L., Bouchart, V., Pottier, D., & Lebailly, P. (2006). Mycoflora and multimycotoxin detection in corn silage: experimental study. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(9), 3479-3484.

- Gazim, Z. C., Rodrigues, F., Amorin, A. C. L., Rezende, C. M. D., Soković, M., Tešević, V., ... & Linde, G. A. (2014). New natural diterpene-type abietane from *Tetradenia riparia* essential oil with cytotoxic and antioxidant activities. *Molecules*, 19(1), 514-524.
- Gentry, P.A., Ross, M.L., & Chan, P.K.C. (1984). Effect of T-2 toxin on hematological and serum enzymes parameters. *Vet Hum Toxicol*. 26(1), 24-28.
- **Gil, Y., & Sinfort, C. (2005)**. Emission of pesticides to the air during sprayer application : a bibliographic review. *Atmospheric Environment*, *39*(28), 5183-5193.
- **Gil, Y., & Sinfort, C. (2005)**. Emission of pesticides to the air during sprayer application : a bibliographic review. *Atmospheric Environment*, *39*(28), 5183-5193.
- Goswami, R. S., & Kistler, H. C. (2004). Heading for disaster: Fusarium graminearum on cereal crops. Molecular plant pathology, 5(6), 515-525.
- Gourine, N., Sifi, I., M Gaydou, E., & Yousfi, M. (2011). Chemical composition of the essential oil of unripe galls of *Pistacia atlantica* Desf. from Algeria. *The Natural Products Journal*, 1(2), 125-127.
- Govinden-Soulange, J., Magan, N., Gurib-Fakim, A., Gauvin, A., Smadja, J., & Kodja, H. (2004). Chemical composition and in vitro antimicrobial activities of the essential oils from endemic *Psiadia* species growing in Mauritius. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 27(11), 1814-1818.
- Guarro, J., & Gené, J. (1992). Fusarium infections. Criteria for the identification of the responsible species. Mycoses, 35(5-6), 109-114.
- **Hajjaj, G., Bounihi, A., Tajani, M., Cherrah, Y., & Zellou, A.** (2014). In vivo analgesic activity of essential oil and aqueous extract of *Matricaria chamomilla* L.(*Asteraceae*). World journal of pharmacy and pharmaceutical sciences, 3(5), 01-13.
- Hamia, C., Gourine, N., Boussoussa, H., Saidi, M., Gaydou, E. M., & Yousfi, M. (2013). Chemical composition and antioxidant activity of the essential oil and fatty acids of the flowers of *Rhanterium adpressum*. *Natural product communications*, 8(8), 1171-1174.
- Hamrouni, L., Hanana, M., Amri, I., Romane, A. E., Gargouri, S., & Jamoussi, B. (2015). Allelopathic effects of essential oils of *Pinus halepensis* Miller: chemical composition and study of their antifungal and herbicidal activities. *Archives of phytopathology and plant protection*, 48(2), 145-158.
- Hanana, M., Bejia, A., Amri, I., Gargouri, S., Jamoussi, B., & Hamrouni, L. (2014). Activités biologiques des huiles essentielles de pins. *Journal of New Sciences*, 4(3), 18-32.
- **Hartmann, T. (2007)**. From waste products to ecochemicals: fifty years research of plant secondary metabolism. *Phytochemistry*, 68(22-24), 2831-2846.
- Harvey, R. B., Kubena, L. F., Elissalde, M. H., Rottinghaus, G. E., & Corrier, D. E. (1994). Administration of ochratoxin A and T-2 toxin to growing swine. *American journal of veterinary research*, 55(12), 1757-1761.
- **Heimbach, U., Kral, G., & Niemann, P.** (2002). EU regulatory aspects of resistance risk assessment. *Pest management science*, 58(9), 935-938.

- Helander, I. M., Alakomi, H. L., Latva-Kala, K., Mattila-Sandholm, T., Pol, I., Smid, E. J., ... & von Wright, A. (1998). Characterization of the action of selected essential oil components on Gram-negative bacteria. *Journal of agricultural and food chemistry*, 46(9), 3590-3595.
- **Hermal, C. (1993)**. Activité bactériostatique de sept émulsions d'huiles essentielles et de deux associations d'émulsions d'huiles essentielles (Doctoral dissertation).
- **Himejima, M., & Kubo, I.** (1993). Fungicidal activity of polygodial in combination with anethole and indole against *Candida albicans. Journal of agricultural and food chemistry*, 41(10), 1776-1779.
- **Hinoshita, F.** (1997). An experimental IgA nephropathy induced by an environmental mycotoxin, nivalenol. *JSM Mycotoxins*, 1997(45), 45-50.
- Hollaway, G. J., Evans, M. L., Wallwork, H., Dyson, C. B., & McKay, A. C. (2013). Yield loss in cereals, caused by *Fusarium culmorum* and *F. pseudograminearum*, is related to fungal DNA in soil prior to planting, rainfall, and cereal type. *Plant disease*, 97(7), 977-982.
- Holopainen, J. K., Himanen, S. J., Yuan, J. S., Chen, F., & Stewart Jr, C. N. (2013). Ecological functions of terpenoids in changing climates. In *Natural Products* (pp. 2913-2940). Springer Berlin Heidelberg.
- Huang, H.S., Chang, L.H., Jong, T.T., Nien, Y.F., & Chang, C.M. J. (1995). Supercriticalcarbon dioxide extraction of turmetic oil from *Curcuma longa Linn*., and purification ofturmerones. *Separation and Purification Technology*. 47, 119-125.
- Hulin, V., Mathot, A. G., Mafart, P., & Dufosse, L. (1998). Les proprietés anti-microbiennes des huiles essentielles et composés d'arômes. *Sciences des aliments*, 18(6), 563-582.
- **Inouye, S.** (2003). International journal of Aromatherapy. 45, 22-35
- **Ishii, H.** (2006). Impact of fungicide resistance in plant pathogens on crop disease control and agricultural environment. *Japan Agricultural Research Quarterly: JARQ*, 40(3), 205-211.
- Islam, Z., Nagase, M., Yoshizawa, T., Yamauchi, K. E., & Sakato, N. (1998). T-2 Toxin Induces Thymic Apoptosisin Vivoin Mice. *Toxicology and applied pharmacology*, 148(2), 205-214.
- **Isman, M. B.** (2000). Plant essential oils for pest and disease management. *Crop protection*, 19(8-10), 603-608.
- **Isman, M. B., Miresmailli, S., & Machial, C. (2011)**. Commercial opportunities for pesticides based on plant essential oils in agriculture, industry and consumer products. *Phytochemistry Reviews*, *10*(2), 197-204.
- Kala, A., Gherraf, N., Belkacemi, D., Ladjel, S., Zellagui, A., Samir, H., ... & Brahim, L. (2009). Composition of the essential oil of *Rhanterium adpressum* Coss. and Durieu. from Algeria. *Archives of Applied Science Research*, 1(2), 115-118.
- **Kalemba, D. A. A. K., & Kunicka, A. (2003)**. Antibacterial and antifungal properties of essential oils. *Current medicinal chemistry*, *10*(10), 813-829.

- Kassi, F. M., Badou, O. J., Tonzibo, Z. F., Salah, Z., Amari, L. N. D. G. E., & Kone, D. (2014). Action du fongicide naturel NECO contre la cercosporiose noire (*Mycosphaerella fijiensis* Morelet) chez le bananier plantain (AAB) en Côte d'Ivoire. *Journal of Applied Biosciences*, 75(1), 6192-6201.
- Kim, J. M., Marshall, M. R., Cornell, J. A., JF III, P. R. E. S. T. O. N., & Wei, C. I. (1995). Antibacterial activity of carvacrol, citral, and geraniol against *Salmonella typhimurium* in culture medium and on fish cubes. *Journal of food science*, 60(6), 1364-1368.
- Kim, M. J., Yang, K. W., Kim, S. S., Park, S. M., Park, K. J., Kim, K. S., ... & Hyun, C. G. (2014). Chemical composition and anti-inflammation activity of essential oils from *Citrus unshiu* flower. *Natural product communications*, 9(5), 727-730.
- Knobloch, K., Pauli, A., Iberl, B., Weigand, H., & Weis, N. (1989). Antibacterial and antifungal properties of essential oil components. *Journal of Essential Oil Research*, 1(3), 119-128.
- Knobloch, K., Weigand, H., Weis, N., Schwarm, H. M., & Vigenschow, H. (1986). *Action of terpenoids on energy metabolism* (pp. 429-445). Walter de Gruyter: Berlin, Germany.
- Kordali, S., Cakir, A., Akcin, T. A., Mete, E., Akcin, A., Aydin, T., & Kilic, H. (2009). Antifungal and herbicidal properties of essential oils and n-hexane extracts of *Achillea gypsicola* Hub-Mor. and *Achillea biebersteinii* Afan. (*Asteraceae*). *Industrial crops and products*, 29(2-3), 562-570.
- **Kordali, S., Cakir, A., Mavi, A., Kilic, H., & Yildirim, A.** (2005). Screening of chemical composition and antifungal and antioxidant activities of the essential oils from three Turkish *Artemisia* species. *Journal of agricultural and food chemistry*, 53(5), 1408-1416.
- Krysinska-Traczyk, E., Kiecana, I., Perkowski, J., & Dutkiewicz, J. (2001). Levels of fungi and mycotoxins in samples of grain and grain dust collected on farms in eastern Poland. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*, 8(2), 269-274.
- **Labuda, R., & Tancinova, D.** (2006). Fungi recovered from Slovakian poultry feed mixtures and their toxinogenity. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*, 13(2), 193.
- **Lahlou, M.** (2004). Méthodes pour étudier la phytochimie et la bioactivité des huiles essentielles. *Recherche en phytothérapie*, 18 (6), 435-448.
- **Langseth, W., & Rundberget, T.** (1999). The occurrence of HT-2 toxin and other trichothecenes in Norwegian cereals. *Mycopathologia*, 147(3), 157-165.
- Lanier, L., Joly, P., Bondoux, P., & Bellemère, A. (1998). Mycologie et pathologie Forestière, tome I (Mycologie forestière). *Ed Masson. Hongrie*, 487.
- **Laplace, J. P.** (2006). Agriculture et alimentation Réflexions croisées. *Cahiers Agricultures*, 15(4), 375-378.
- **Le Bars, J.** (1988). Toxigenesis as a function of the ecological conditions of the grain/microorganisms system. In "Presrvation and storage of grains, seeds and their by products". *JL MULTON, Lavoisier pub.* New-York, Paris, 347-366.

- **Lee, H. S.** (2007). Fungicidal property of active component derived from *Acorus gramineus* rhizome against phytopathogenic fungi. *Bioresource technology*, 98(6), 1324-1328.
- **Lepoivre, P. (2003)**. Phytopathologie: bases moléculares et biologiques des pathosystemes et fondements des strategies de lutte (No. 632.3 L598p). Bruxelles, BE: Ed. De Boeck Université, 432.
- **Leroux, P. (2003)**. Modes d'action des produits phytosanitaires sur les organismes pathogènes des plantes. *Comptes Rendus Biologies*, 326(1), 9-21.
- **Leslie, J. F., & Summerell, B. A.** (2006). The Fusarium laboratory manual. 2006. *Ames, Iowa : Blackwell Publishing CrossRef Google Scholar,* 388.
- Li, F. Q., Li, Y. W., Luo, X. Y., & Yoshizawa, T. (2002). Fusarium toxins in wheat from an area in Henan Province, PR China, with a previous human red mould intoxication episode. Food Additives & Contaminants, 19(2), 163-167.
- **Li, S., Hartman, G. L., Domier, L. L., & Boykin, D.** (2008). Quantification of Fusarium solani f. sp. glycines isolates in soybean roots by colony-forming unit assays and real-time quantitative PCR. *Theoretical and Applied Genetics*, 117(3), 343-352.
- **Li, S., Ouyang, Y., Yang, G. H., & Pestka, J. J. (2000)**. Modulation of transcription factor AP-1 activity in murine EL-4 thymoma cells by vomitoxin (deoxynivalenol). *Toxicology and applied pharmacology, 163*(1), 17-25.
- **Lis-Balchin, M.** (2002). Phytochemistry of the genus *Lavandula Lavender*. The genus *Lavandula Taylor & Francis, London*, 86-99.
- Liu, M., Seidel, V., Katerere, D. R., & Gray, A. I. (2007). Colorimetric broth microdilution method for the antifungal screening of plant extracts against yeasts. *Methods*, 42(4), 325-329.
- **Luchese, R. H., & Harrigan, W. F.** (1993). Biosynthesis of aflatoxin-the role of nutritional factors. *Journal of Applied Microbiology*, 74(1), 5-14.
- MacDonald, S., Prickett, T. J., Wildey, K. B., & Chan, D. (2004). Survey of ochratoxin A and deoxynivalenol in stored grains from the 1999 harvest in the UK. *Food additives and contaminants*, 21(2), 172-181.
- Magan, N., Hope, R., Colleate, A., & Baxter, E. S. (2002). Relationship between growth and mycotoxin production by *Fusarium* species, biocides and environment. In *Mycotoxins in Plant Disease* (pp. 685-690). Springer, Dordrecht.
- Magro, A., Carolino, M., Bastos, M., & Mexia, A. (2006). Efficacy of plant extracts against stored products fungi. *Revista iberoamericana de micología*, 23(3), 176-178.
- **Maihebiau, P.** (1994). La nouvelle aromathérapie : biochimie aromatique et influence psychosensorielle des odeurs. *Lausanne*, 635.
- Mann, C. M., Cox, S. D., & Markham, J. L. (2000). The outer membrane of *Pseudomonas aeruginosa* NCTC 6749 contributes to its tolerance to the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil). *Letters in Applied Microbiology*, 30(4), 294-297.

- Marpegan, M. R., Perfumo, C. J., Godoy, H. M., Sala, D. M. M., Diaz, E., & Risso, M. A. (1988). Feed refusal of pigs caused by *Fusarium* mycotoxins in Argentina. *Zentralblatt* fur Veterinarmedizin. Reihe A, 35(8), 610-616.
- Martins, M. L., & Martins, H. M. (2001). Determination of deoxynivalenol in wheat-based breakfast cereals marketed in Portugal. *Journal of food protection*, 64(11), 1848-1850.
- Mašková, Z., Tančinová, D., Barboráková, Z., Felšöciová, S., & Císarová, M. (2012). Comparison of occurrence and toxinogenity of *Alternaria* spp. isolated from samples of conventional and new crossbred wheat of Slovak origin. *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences*, 1(4), 552-562.
- Merhej, J., Boutigny, A. L., Pinson-Gadais, L., Richard-Forget, F., & Barreau, C. (2010). Acidic pH as a determinant of TRI gene expression and trichothecene B biosynthesis in *Fusarium graminearum*. Food Additives and Contaminants, 27(5), 710-717.
- Merhej, J., Richard-Forget, F., & Barreau, C. (2011). The pH regulatory factor Pac1 regulates Tri gene expression and trichothecene production in *Fusarium graminearum*. *Fungal genetics and biology*, 48(3), 275-284.
- Mesterházy, Á., Bartók, T., Mirocha, C. G., & Komoroczy, R. (1999). Nature of wheat resistance to *Fusarium* head blight and the role of deoxynivalenol for breeding. *Plant breeding*, 118(2), 97-110.
- **Meulemans, M., (1989)**. Champignons phytopathogènes in traité de phytopathologie (Semal J). *Ed Presses Agronomiques de Gembloux*, Belgique, 179-233.
- Meyer, A., Deiana, J., & Bernard, A. (2004). Cours de microbiologie générale. *Journal Applied of Microbiology*, 66(4),1523-1526.
- **Millet, F. (2014)**. Huiles essentielles et essence de citronnier (*Citrus limon L.*) Burm. f.). *Phytothérapie*, 12(2), 89-97.
- **Milus, E. A., & Parsons, C. E. (1994)**. Evaluation of foliar fungicides for controlling *Fusarium* head blight of wheat. *Plant disease*, 78(7), 697-699.
- Montibus, M., Ducos, C., Bonnin-Verdal, M. N., Bormann, J., Ponts, N., Richard-Forget, F., & Barreau, C. (2013). The bZIP transcription factor Fgap1 mediates oxidative stress response and trichothecene biosynthesis but not virulence in *Fusarium graminearum*. *PLoS One*, 8(12), e83377.
- Montibus, M., Khosravi, C., Zehraoui, E., Verdal-Bonnin, M. N., Richard-Forget, F., & Barreau, C. (2016). Is the Fgap1 mediated response to oxidative stress chemotype dependent in *Fusarium graminearum*. *FEMS microbiology letters*, 363(2).
- **Moretti, A. N.** (2009). Taxonomy of *Fusarium* genus: a continuous fight between lumpers and splitters. *Zbornik Matice srpske za prirodne nauke*, Nat. Sci, Matica Srpska Novi Sad (117), 7-13.
- Müller, H. M., Reimann, J., Schumacher, U., & Schwadorf, K. (2001). Further survey of the occurrence of *Fusarium* toxins in wheat grown in southwest Germany. *Archives of Animal Nutrition*, 54(2), 173-182.

- Muthomi, J. W., Schütze, A., Dehne, H. W., Mutitu, E. W., & Oerke, E. C. (2000). Characterization of *Fusarium culmorum* isolates by mycotoxin production and aggressiveness to winter wheat. *Journal of Plant Diseases and Protection*, (107),113-123.
- Nelson, P. E., Toussoun, T. A., & Marasas, W. F. O. (1983). Fusarium species: an illustrated manual for identification. Pennsylvania state Univ. Editor
- Ngundi, M. M., Shriver-Lake, L. C., Moore, M. H., Ligler, F. S., & Taitt, C. R. (2006). Multiplexed detection of mycotoxins in foods with a regenerable array. *Journal of food protection*, 69(12), 3047-3051.
- Nielsen, M., Lundegaard, C., Lund, O., & Petersen, T. N. (2010). CPHmodels-3.0-remote homology modeling using structure-guided sequence profiles. *Nucleic acids research*, 38(suppl_2), W576-W581.
- **Nikaido, H.** (1994). Prevention of drug access to bacterial targets: permeability barriers and active efflux. *Science*, 264(5157), 382-388.
- **Norhayati, A., Sardjono, T., Yamashita, A., & Yoshizawa, T. (1998)**. Natural co-ocurrence of aflatoxins and *Fusarium* mycotoxins (fumonisins, deoxynivalenol, nivalenol and zearalenone) in corn from Indonesia. *Food Addit Contam*, *15*, 377-384.
- O'Donnell, K., Rooney, A. P., Proctor, R. H., Brown, D. W., McCormick, S. P., Ward, T. J., ... & Robert, V. A. (2013). Phylogenetic analyses of RPB1 and RPB2 support a middle Cretaceous origin for a clade comprising all agriculturally and medically important fusaria. *Fungal Genetics and Biology*, 52, 20-31.
- **Oswald, I.P., & Comera, C. (1998).** Immunotoxicité des mycotoxines. *Revue de médecine vétérinaire (France)*, Vet. 149 : 585-590.
- Ouyang, Y. L., Azcona-Olivera, J. I., Murtha, J., & Pestka, J. J. (1996). Vomitoxin-mediated IL-2, IL-4, and IL-5 superinduction in murine CD4+ T cells stimulated with phorbol ester and calcium ionophore: relation to kinetics of proliferation. *Toxicology and applied pharmacology*, 138(2), 324-334.
- Özek, G., Özek, T., Işcan, G., Başer, K. H. C., Duran, A., & Hamzaoglu, E. (2008). Composition and antimicrobial activity of the oils of Ferula szowitsiana DC. from Turkey. *Journal of Essential Oil Research*, 20(2), 186-190.
- Pan, D., Bonsignore, F., Rivas, F., Perera, G., & Bettucci, L. (2007). Deoxynivalenol in barley samples from Uruguay. *International journal of food microbiology*, 114(2), 149-152.
- **Pandey, D. K., Tripathi, N. N., Tripathi, R. D., & Dixit, S. N. (1982)**. Fungitoxic and phytotoxic properties of the essential oil of *Hyptis suaveolens*. *Journal of Plant Diseases and Protection*, 344-349.
- Parveen, S., Wani, A. H., Ganie, A. A., Pala, S. A., & Mir, R. A. (2014). Antifungal activity of some plant extracts on some pathogenic fungi. *Archives of Phytopathology and Plant Protection*, 47(3), 279-284.
- Pattnaik, S., Subramanyam, V. R., Bapaji, M., & Kole, C. R. (1997). Antibacterial and antifungal activity of aromatic constituents of essential oils. *Microbios*, 89(358), 39-46.

- **Pattnaik, S., Subramanyam, V. R., Kole, C. R., & Sahoo, S.** (1995). Antibacterial activity of essential oils from *Cymbopogon*: inter-and intra-specific differences. *Microbios*, 84(341), 239-245.
- **Perkowski, J.** (1998). Distribution of deoxynivalenol in barley kernels infected by *Fusarium. Molecular Nutrition & Food Research*, 42(02), 81-83.
- **Pestka, J. J., & Bondy, G. S. (1994)**. Immunotoxic effects of mycotoxins. *Mycotoxins in grain*, Eagon Press, Minnesota, 339-358.
- **Pfaffl, M. W. (2001)**. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT–PCR. *Nucleic acids research*, 29(9), e45-e45.
- **Pfaffl, M. W., Horgan, G. W., & Dempfle, L. (2002)**. Relative expression software tool (REST©) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic acids research*, 30(9), e36-e36.
- **Pfohl-Leszkowicz, A. (2001)**. Définition et origines des mycotoxies in Les mycotoxines dans l'alimentation : évaluation et gestion du risque, Ed. *Tec & Doc*, 3-14.
- **Pibiri, M. C. (2006)**. Assainissement microbiologique de l'air et des systèmes de ventilation au moyen d'huiles essentielles. (Thèse de Doctorat), Lausane, Canada.
- Pirgozliev, V. R., Birch, C. L., Rose, S. P., Kettlewell, P. S., & Bedford, M. R. (2003). Chemical composition and the nutritive quality of different wheat cultivars for broiler chickens. *British poultry science*, 44(3), 464-475.
- Pitt, J. I. (2000). Toxigenic fungi and mycotoxins. British medical bulletin, 56(1), 184-192.
- **Placinta, C. M., D'mello, J. P. F., & Macdonald, A. M. C. (1999)**. A review of worldwide contamination of cereal grains and animal feed with *Fusarium* mycotoxins. *Animal feed science and technology*, 78(1-2), 21-37.
- Ponts, N., Pinson-Gadais, L., Barreau, C., Richard-Forget, F., & Ouellet, T. (2007). Exogenous H₂O₂ and catalase treatments interfere with Tri genes expression in liquid cultures of Fusarium graminearum. *FEBS letters*, Pub Med, *581*(3), 443-447.
- **Prabhu, A. V., Khelfane, K., & Bekal, S. (1992)**. Compilation des maladies fongiques des plantes en Algérie. *Univ. Tizi-ouzou. Ed office des publication Universitaire (OPU)*, 85.
- Prasad, N. R., Anandi, C., Balasubramanian, S., & Pugalendi, K. V. (2004). Antidermatophytic activity of extracts from *Psoralea corylifolia (Fabaceae)* correlated with the presence of a flavonoid compound. *Journal of Ethnopharmacology*, 91(1), 21-24.
- **Rasmussen, P. H., Ghorbani, F., & Berg, T.** (2003). Deoxynivalenol and other *Fusarium* toxins in wheat and rye flours on the Danish market. *Food Additives & Contaminants*, 20(4), 396-404.
- **Regnault-Roger, C. (2012)**. Trends for commercialization of biocontrol agent (biopesticide) products. In *Plant defence : biological control* (pp. 139-160). Springer, Dordrecht.
- Remmal, A., Bouchikhi, T., Rhayour, K., Ettayebi, M., & Tantaoui-Elaraki, A. (1993). Improved method for the determination of antimicrobial activity of essential oils in agar medium. *Journal of Essential Oil Research*, 5(2), 179-184.

- **Richter, G. (1993)**. *Métabolisme des végétaux : physiologie et biochimie*. Edition PRESSES Polytechniques et universitaires romandes, 526.
- **Robledo Lourdes, M., Marín, S., & Ramos, A. J.** (2001). Contaminación natural con micotoxinas en maíz forrajero y granos de café verde en el Estado de Nayarit (México). *Rev Iberoam Micol*, 18, 141-144.
- Romagnoli, C., Bruni, R., Andreotti, E., Rai, M. K., Vicentini, C. B., & Mares, D. (2005). Chemical characterization and antifungal activity of essential oil of *capitula* from wild Indian *Tagetes patula* L. *Protoplasma*, 225(1-2), 57-65.
- **Roquebert, M. F. (1998)**. Taxonomie des moisissures ; Méthodes de culture et techniques d'observation ; Identification", in "Moisissures des aliments peu hydratés", Ed. *Tec & Doc*, 39-95.
- **Saitou, N., & Nei, M.** (1987). The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular biology and evolution*, 4(4), 406-425.
- Sallé, J. L., & Pelletier, J. (1991). Les huiles essentielles : synthèse d'aromathérapie et introduction à la sympathicothérapie. Ed. Frison-Roche, Paris.
- Satrani, B., Farah, A., Fechtal, M., Talbi, M., Blaghen, M., & Chaouch, A. (2001). Composition chimique et activité antimicrobienne des huiles essentielles de *Satureja* calamintha et *Satureja* alpina du Maroc. In *Annales des falsifications, de l'expertise* chimique et toxicologique. Société des experts-chimistes de France, 94(956), 241-250.
- Schmidt, E., Wanner, J., Hiiferl, M., Jirovetz, L., Buchbauer, G., Gochev, V., ... & Geissler, M. (2012). Chemical composition, olfactory analysis and antibacterial activity of *Thymus vulgaris* chemotypes geraniol, 4-thujanol/terpinen-4-ol, thymol and linalool cultivated in southern France. *Natural product communications*, 7(8), 1095-1098.
- Schollenberger, M., Müller, H. M., Rüfle, M., Suchy, S., Planck, S., & Drochner, W. (2005). Survey of *Fusarium* toxins in foodstuffs of plant origin marketed in Germany. *International Journal of Food Microbiology*, 97(3), 317-326.
- **Segur-Fantino, N.** (1990). Etude du polymorphisme au sein d'une population de lavande (Lavandula angustifolia Mill.) : détermination de critères précoces de sélection (Doctoral dissertation, Nantes), Université de La Rochelle, 41-45.
- Shirole, R. L., Shirole, N. L., Kshatriya, A. A., Kulkarni, R., & Saraf, M. N. (2014). Investigation into the mechanism of action of essential oil of *Pistacia integerrima* for its antiasthmatic activity. *Journal of ethnopharmacology*, 153(3), 541-551.
- **Sifi, I., Gourine, N., Gaydou, E. M., & Yousfi, M. (2015)**. Chemotypes of essential oil of unripe galls of *Pistacia atlantica* Desf. from Algeria. *Natural product research*, 29(20), 1945-1949.
- **Sikkema, J., De Bont, J. A., & Poolman, B.** (1995). Mechanisms of membrane toxicity of hydrocarbons. *Microbiological reviews*, 59(2), 201-222.
- Simon, H., (1994). La protection des cultures, Ed Lavoisier Tec et Doc, France .35.

- **Singh, G., Maurya, S., Lampasoma, M. P., & Catalan, C.** (2006). Studies on essential oils. Part 44: Chemical, antifungal, antioxidant activity of Foeniculum vulgare volatile oil and its oleoresins. *Food Control*, *17*, 745-752.
- **Slinski, S. L., Zakharov, F., & Gordon, T. R. (2015)**. The effect of resin and monoterpenes on spore germination and growth in *Fusarium circinatum*. *Phytopathology*, *105*(1), 119-125.
- **Sokmen, A., Jones, B. M., & Erturk, M.** (1999). The in vitro antibacterial activity of Turkish medicinal plants. *Journal of ethnopharmacology*, 67(1), 79-86.
- **Soliman, K. M., & Badeaa, R. I.** (2002). Effect of oil extracted from some medicinal plants on different mycotoxigenic fungi. *Food and chemical toxicology*, 40(11), 1669-1675.
- **Steyn, P.** (**Ed.**). (**2012**). *The biosynthesis of mycotoxins : a study in secondary metabolism*. Elsevier, Acadelic Press, INC.
- **Sumalan, R. M., Alexa, E., & Poiana, M. A. (2013)**. Assessment of inhibitory potential of essential oils on natural mycoflora and *Fusarium* mycotoxins production in wheat. *Chemistry Central Journal*, 7(1), 32.
- **Sumonrat, C., Suphitchaya, C., & Tipparat, H.** (2008). Antimicrobial activities of essential oils and crude extracts from tropical *Citrus* spp. against food-related microorganisms. Songklanakarin. *J Sci Technol*, 30(1), 125-131.
- **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*, 1-17.
- **Tabanca, N., Demirci, B., Crockett, S. L., Başer, K. H. C., & Wedge, D. E. (2007)**. Chemical composition and antifungal activity of *Arnica longifolia*, *Aster hesperius*, and *Chrysothamnus nauseosus* essential oils. *Journal of agricultural and food chemistry*, 55(21), 8430-8435.
- **Tabassum, N., & Vidyasagar, G. M.** (2013). Antifungal investigations on plant essential oils. A review. *Int. J. Pharm. Pharm. Sci*, 5(2), 19-28.
- **Takaisi-Kikuni, N. B., Krüger, D., Gnann, W., & Wecke, J.** (1996). Microcalorimetric and electron microscopic investigation on the effects of essential oil from *Cymbopogon densiflorus* on *Staphylococcus aureus*. *Microbios*, 88(354), 55-62.
- **Tamura, K., Nei, M., & Kumar, S.** (2004). Prospects for inferring very large phylogenies by using the neighbor-joining method. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(30), 11030-11035.
- **Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A., & Kumar, S. (2013)**. MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Molecular biology and evolution*, 30(12), 2725-2729.
- **Tantaoui-Elaraki, A., Lattaoui, N., Errifi, A., & Benjilali, B.** (1993). Composition and antimicrobial activity of the essential oils of *Thymus broussonettii, T. zygis* and *T. satureioides. Journal of Essential Oil Research*, 5(1), 45-53.

- **Terzi, V., Morcia, C., Faccioli, P., Vale, G., Tacconi, G., & Malnati, M.** (2007). In vitro antifungal activity of the tea tree (*Melaleuca alternifolia*) essential oil and its major components against plant pathogens. *Letters in applied microbiology*, 44(6), 613-618.
- **Torices, R., & Anderberg, A. A. (2009)**. Phylogenetic analysis of sexual systems in *Inuleae* (Asteraceae). American Journal of Botany, 96(5), 1011-1019.
- Touati-Hattab, S., Barreau, C., Verdal-Bonnin, M. N., Chereau, S., Richard-Forget, F., Hadjout, S., ... & Bouznad, Z. (2016). Pathogenicity and trichothecenes production of *Fusarium culmorum* strains causing head blight on wheat and evaluation of resistance of the varieties cultivated in Algeria. *European journal of plant pathology*, 145(4), 797-814.
- **Trenholm, H. L., Prelusky, D. B., Young, J. C., & Miller, J. D.** (1988). Reducing mycotoxins in animal feeds. *Publication-Agriculture Canada* (*Canadá*)(no. 1827E) 22 p.
- **Tripathi, P., & Dubey, N. K.** (2004). Exploitation of natural products as an alternative strategy to control postharvest fungal rotting of fruit and vegetables. *Postharvest biology and Technology*, 32(3), 235-245.
- Tundis, R., Statti, G. A., Conforti, F., Bianchi, A., Agrimonti, C., Sacchetti, G., ... & Poli, F. (2005). Influence of environmental factors on composition of volatile constituents and biological activity of *Helichrysum italicum* (Roth) Don (*Asteraceae*). *Natural product research*, 19(4), 379-387.
- Tutelyan, V. A. (2004). Deoxynivalenol in cereals in Russia. *Toxicology Letters*, 153(1), 173-179.
- Ultree, A., Slump, R. A., Steging, G., & Smid, E. J. (2002). Antimicrobial activity of carvacrol toward Bacillus cereus on rice. *Journal of food protection*, 63(5), 620-624.
- **Velluti, A., Sanchis, V., Ramos, A. J., Turon, C., & Marin, S.** (2004). Impact of essential oils on growth rate, zearalenone and deoxynivalenol production by *Fusarium graminearum* under different temperature and water activity conditions in maize grain. *Journal of applied microbiology*, 96(4), 716-724.
- Vera, S. S., Zambrano, D. F., Méndez-Sanchez, S. C., Rodríguez-Sanabria, F., Stashenko, E. E., & Luna, J. E. D. (2014). Essential oils with insecticidal activity against larvae of *Aedes aegypti (Diptera : Culicidae). Parasitology research*, 113(7), 2647-2654.
- **Verdan, C.** (2002). Le monde magique du parfum, Une exposition proposée par le Comité Français du Parfum. Parfum -L'expo, 20.
- Verma, S., & Singh, S. P. (2008). Current and future status of herbal medicines. *Veterinary world*, 1(11), 347-350.
- **Verzele, L., Moudachirou, S., & Ramanoelina, G. (1988)**. Perfumer and flavorist. *flavour and fragrance journal*, 13: 61-67.
- **Vidal, D. R.** (1990). Propriétés immunosuppressives des mycotoxines du groupe des trichothécènes. *Bull. Inst. Pasteur*, 88, 159-192.
- **Visconti, A., Chelkowski, J., & Bottalico, A.** (1986). Deoxynivalenol and 3-acetyldeoxynivalenol-mycotoxins associated with wheat head fusariosis in Poland. *Mycotoxin Research*, 2(2), 59-64.

- Vrabcheva, T., Geßler, R., Usleber, E., & Märtlbauer, E. (1996). First survey on the natural occurrence of *Fusarium* mycotoxins in Bulgarian wheat. *Mycopathologia*, 136(1), 47-52.
- Wagacha, J. M., & Muthomi, J. W. (2007). Fusarium culmorum: Infection process, mechanisms of mycotoxin production and their role in pathogenesis in wheat. Crop protection, 26(7), 877-885.
- Wang, J., Fitzpatrick, D. W., & Wilson, J. R. (1998). Effects of the trichothecene mycotoxin T-2 toxin on neurotransmitters and metabolites in discrete areas of the rat brain. *Food and chemical toxicology*, 36(11), 947-953.
- Weiland, J. J., & Sundsbak, J. L. (2000). Differentiation and detection of sugar beet fungal pathogens using PCR amplification of actin coding sequences and the ITS region of the rRNA gene. *Plant disease*, 84(4), 475-482.
- **Wiklund, A.** (1986). The genus *Rhanterium* (Asteraceae: Inuleae). Botanical journal of the Linnean Society, 93(2), 231-246.
- Xue, A. G., Chen, Y., Voldeng, H. D., Fedak, G., Savard, M. E., Längle, T., ... & Harman, G. E. (2014). Concentration and cultivar effects on efficacy of CLO-1 biofungicide in controlling *Fusarium* head blight of wheat. *Biological control*, 73, 2-7.
- **Yaghmai, MS, & Kolbadipour, S. (1987)**. Composants volatils de *Rhanterium epapposum* Oliv. Journal d'arôme et de parfum, 2 (1), 29-32.
- Yamamura, H., Kobayashi, T., Ryu, J. C., Ueno, Y., Nakamura, K., Izumiyama, N., & Ohtsubo, K. (1989). Subchronic feeding studies with nivalenol in C57BL/6 mice. *Food and Chemical Toxicology*, 27(9), 585-590.
- Zani, F., Massimo, G., Benvenuti, S., Bianchi, A., Albasini, A., Melegari, M., ... & Mazza, P. (1991). Studies on the genotoxic properties of essential oils with *Bacillus subtilis* recassay and *Salmonella*/microsome reversion assay. *Planta medica*, 57(03), 237-241.
- Zhiri, A., & Baudoux, D. (2005). Huiles Essentielles Chémotypées Et Leurs Synergies. *Edition Inspir Development*, 80.
- **Zhou, H. R., Yan, D., & Pestka, J. J. (1998)**. Induction of cytokine gene expression in mice after repeated and subchronic oral exposure to vomitoxin (Deoxynivalenol): differential toxin-induced hyporesponsiveness and recovery. *Toxicology and applied pharmacology*, 151(2), 347-358.
- **Zollo Amvam, P. H., Biyiti, L., Tchoumbougnang, F., Menut, C., Lamaty, G., & Bouchet, P. H.** (1998). Aromatic plants of tropical Central Africa. Part XXXII. Chemical composition and antifungal activity of thirteen essential oils from aromatic plants of Cameroon. *Flavour and Fragrance Journal*, *13*(2), 107-114.
- Khan, M., Al-Saleem, M. S., & Alkhathlan, H. Z. (2016). A detailed study on chemical characterization of essential oil components of two Plectranthus species grown in Saudi Arabia. *Journal of Saudi Chemical Society*, 20(6), 711-721.

- **Goodner, K. L.** (2008). Practical retention index models of OV-101, DB-1, DB-5, and DB-Wax for flavor and fragrance compounds. *LWT-Food Science and Technology*, 41(6), 951-958.
- **Lubeck, A. J., & Sutton, D. L. (1983)**. Kovats retention indices of selected hydrocarbons through C10 on bonded phase fused silica capillaries. *Journal of Separation Science*, 6(6), 328-332.
- **Babushok, V.I., Linstrom, P.J., & Zenkevich, I. G. (2011)**. Indices de rétention pour les composés fréquemment rapportés d'huiles essentielles végétales. *Journal des données physiques et chimiques de référence*, 40 (4), 043101.

Annexes

Annexes

Annexes 1, 2, 3 : Composition des milieux de cultures

Annexe 1 : Potatoes dextrose Agar (PDA)

<u>Utilisation</u>: Milieu de culture pour les champignons

Composition du milieu CMC

Infusion de pomme de terre 200 ml

Glucose 15 g

Agar-agar 20 g

Eau distillée Qsp 1L

Mode opératoire (1L):

Conditions de stérilisation:

Autoclavage à 121°C pendant 20 minutes

Conservation: 4°C

Annexe 2: Milieu CMC

<u>Utilisation</u>: Production de spores de *Fusarium* en milieu liquide

Composition du milieu CMC:

CMC	15 g/l
Yeast extract	1 g/l
MgSO ₄ , 7H ₂ O	0.5 g/l
NH_4NO_3	1 g/l
KH_2PO_4	1 g/l

Mode opératoire (1L):

Carboxymethyl cellulose low viscosity (CMC)	15 g
Yeast extract	1 g
$MgSO_4$, $7H_2O$	0.5 g
NH_4NO_3	1 g
KH ₂ PO ₄	1 g
Eau distillée	Qsp 11

Ajouter le CMC en dernier et par petites quantités.

Chauffer à 100°C avec agitation pour solubiliser le CMC.

Conditions de stérilisation:

Autoclavage à 121°C pendant 20 minutes

Conservation: 4°C

Annexe 3 : Milieu synthétique « MS »

$\underline{\textbf{Utilisation}}:$

Composition

Glucose	20 g/l
KH ₂ PO ₄	0.5 g/l
K_2HPO_4	0.6 g/l
MgSO ₄ , 7H ₂ O	17 mg/l
Biotine	$100~\mu\text{g/ml}$
$(NH_4)_2SO_4$	1 g/l
Eléments traces de Vogel	$10 \mu g/ml$

Préparation pour 1L :

Glucose	20 g
KH ₂ PO ₄ 50 g/L	10 ml
K ₂ HPO ₄ 60 g/L	10 ml
MgSO ₄ 1.7 g/L	10 ml
Biotin 100 mg/mL	1 ml
$(NH_4)_2SO_4\ 100\ g/L$	10 ml
Eléments traces de Vogel 100 mg/mL	0.1 ml
Eau distillée	Qsp 11

Mode opératoire :

- Dissoudre le glucose dans environ 500 ml d'eau distillée
- Compléter à 960 ml avec de l'eau distillée
- Transvaser dans un flacon et autoclaver 30 minutes à 105°C
- Laisser refroidir
- Ajouter le reste des constituants stérilisés par filtration 0.45 μm

Conditions de stérilisation : Voir ci-dessus

Conservation: 4°C

Annexe 4: Extraction des ARN totaux au TRIzol

Mode opératoire

N.B.: - Placer le support de tubes du TissueLyser à -20°C une demi-heure avant le broyage.

- Réaliser toutes les étapes de centrifugation à 4°C.

(Régler la centrifugeuse à 4°C avant de commencer l'extraction)

Prélèvement du mycélium

- Récupérer le mycélium par centrifugation ou filtration de la culture.
- Aliquoter 200 mg de mycélium dans un tube 2 ml.
- Congeler immédiatement dans l'azote liquide, et conserver à -80°C jusqu'au broyage.

Broyage et lyse de l'échantillon

- Ajouter 1mL de TRIzol et une bille de broyage à l'échantillon.
- Broyer au TissueLyser pendant 1 minute 30 sec à 30 Hz.
- Incuber 5 minutes à température ambiante.

Elimination des débris cellulaires et contaminants

- Centrifuger 10 minutes à 16 000 g.
- Récupérer le surnageant dans un tube propre.

Remarque: répéter cette étape une fois si l'échantillon contient beaucoup de polysaccharides.

Purification de l'ARN

- Ajouter 200 µL de chloroforme. Vortexer 15 secondes.
- Incuber 2-3 minutes à température ambiante.
- Centrifuger 15 minutes à 16 000 g.
- Récupérer la phase supérieure dans un tube propre.
- Ajouter 500 µL d'isopropanol. Homogénéiser soigneusement par retournement.
- Incuber 10 minutes à température ambiante.
- Centrifuger 10 minutes à 16 000 g.
- Jeter le surnageant.

Lavage de l'ARN

- Ajouter 1 mL d'éthanol 75 %. Homogénéiser soigneusement par retournement.
- Centrifuger 5 minutes à 7 500 g.
- Jeter le surnageant.

N.B.: Il est possible de répéter le lavage pour améliorer la pureté des ARN.

Remise en suspension de l'ARN

- Laisser sécher le culot quelques minutes à l'air libre.
- Ajouter 50 μL d'H₂O nuclease-free.
- Réserver sur glace.

Quantité / Qualité de l'ARN

• Quantifier les ARN au Nanodrop, au moins 15 minutes après la resuspension.

 A_{260}/A_{280} compris entre 1.8 et 2.0 => pas ou peu de contamination par protéines.

 A_{260}/A_{230} compris entre 1.8 et 2.0 => pas ou peu de contamination par phénol

• Evaluer la qualité des ARN sur gel d'agarose 1,2 %

(Cf Mode opératoire « Migration d'ARN sur gel d'agarose)

Deux bandes d'ARN ribosomiques observables en conditions dénaturantes :

ARN 18S (1.9kb) et ARN 28S (4.8kb).

Si les ARN migrent sous la forme d'une trainée (smear) et que les bandes d'ARNr sont difficilement visibles, l'ARN a sans doute subi une dégradation majeure.

_Traitement DNase (Facultatif)

• Procéder à un traitement DNAse si contamination par ADNg

(ex: kit DNA free - Ambion).

Conservation

• Congeler à -80°C.

<u>Remarque</u>: préparer des aliquotes pour éviter la dégradation des ARN lors des phases de congélation/décongélation.

Annexe 5 : vérification de la qualité des acides nucleique

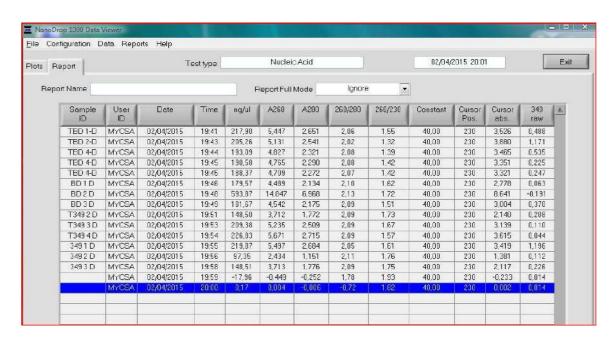


Figure 41: Quantification des ARN (vérification de leur qualité)

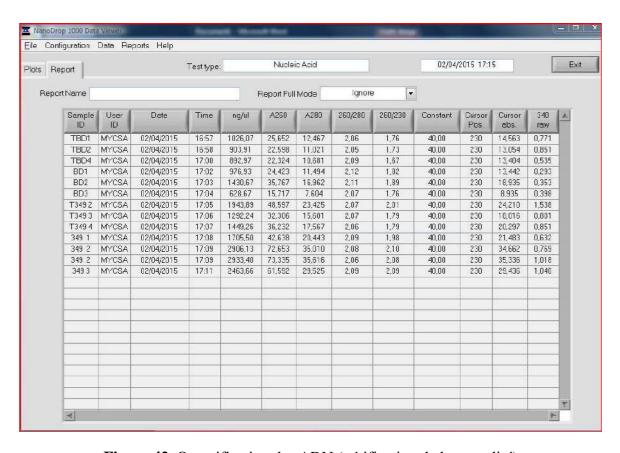


Figure 42: Quantification des ADN (vérification de leur qualité)

Annexes 6 : SuperScript III First-Strand Système de synthèse pour Rétro-Transcription des ARNm RT-PCR

Mode opératoire

Préparation des mélanges réactionnels

• Préparer le mix ARN/oligo(dT), dans la glace (tube 0,2 mL) :

ARN totaux $11 \mu L \max (1 pg à 5 \mu g)$

Mix dNTP 10mM 1 μL

Oligo(dT)₁₂₋₁₈ $0.5\mu g/\mu L$ 1 μL

Eau DEPC qsp 13 μL

Témoin ARN + : Total HeLa RNA

Témoin ARN -: Eau DEPC

Homogénéiser par pipetage. Centrifuger brièvement.

• Préparer le mix RT, dans la glace :

Tampon First Strand 5X 4 μL

DTT 0.1M 1 μ L

RNaseOUT TM $40U/\mu L$ 1 μL

SS III RT 200U/ μ L 1 μ L

Homogénéiser par pipetage. Centrifuger brièvement.

Dénaturation des structures secondaires de l'ARN

• Démarrer le programme du thermocycleur.

Incuber le mix ARN/oligo(dT) 5 minutes à 65°C.

• Mettre le programme du thermocycleur en pause.

Centrifuger brièvement.

Incuber 1 minute minimum sur glace.

Hybridation des amorces oligo(dT) et Rétrotranscription

• Ajouter 7 µL du mix RT à chaque échantillon.

Homogénéiser par pipetage. Centrifuger brièvement.

Redémarrer le programme du thermocycleur.

Incuber 30 à 60 minutes à 50°C.

Terminaison

• Incuber 15 minutes à 70°C.

Traitement RNase

• Mettre le programme du thermocycleur en pause.

Centrifuger brièvement. Réserver sur la glace.

Ajouter 1µL de RNase H (2U) à chaque tube.

• Redémarrer le programme du thermocycleur.

Incuber 20 minutes à 37°C.

Conserver les ADNc à 4°C, ou -20°C pour une utilisation ultérieure.

Annexe 7:: Profils chromatographiques obtenus par UPLC

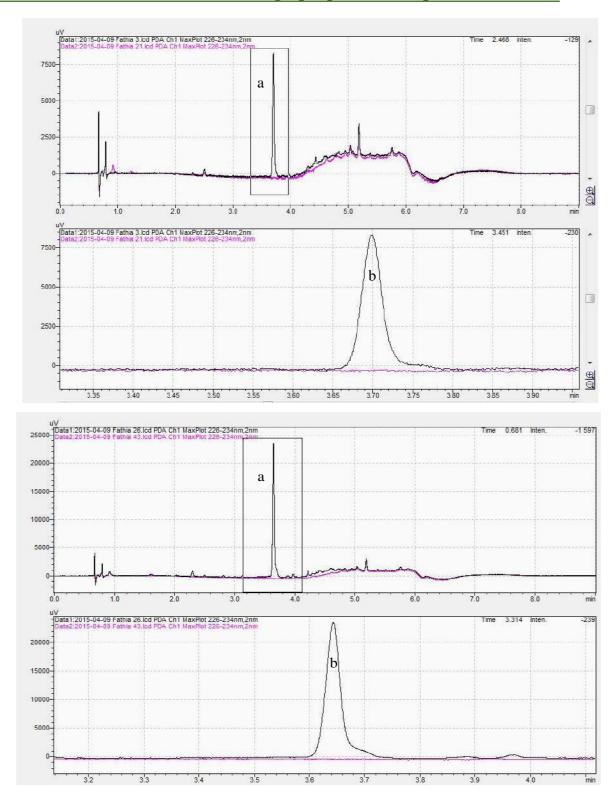


Figure 43: Profils chromatographiques de l'inhibition des TCTB (DON/3ADON) chez *F. culmorum* (BD17 et T5) respectivement par les huiles essentielles des Feuilles du *R. adpressum* obtenus par UPLC (Spectre noire : Témoin, Spectre Rose : Traité)

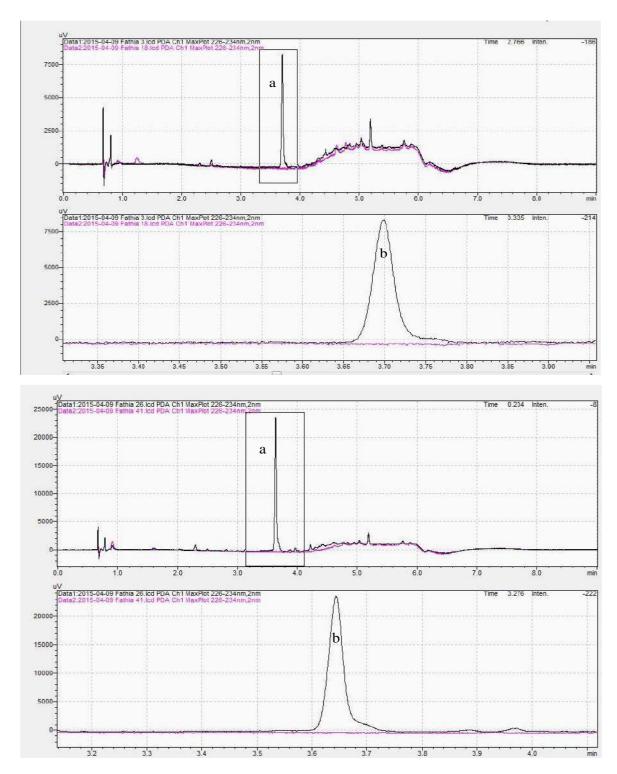


Figure 44 : Profils chromatographiques de l'inhibition des TCTB (DON/3ADON et NIV/FX) chez *F. culmorum* (BD17 et T5) respectivement par les huiles essentielles des Fleurs du *R. adpressum* obtenus par UPLC (Spectre noire : Témoin, Spectre Rose : Traité)

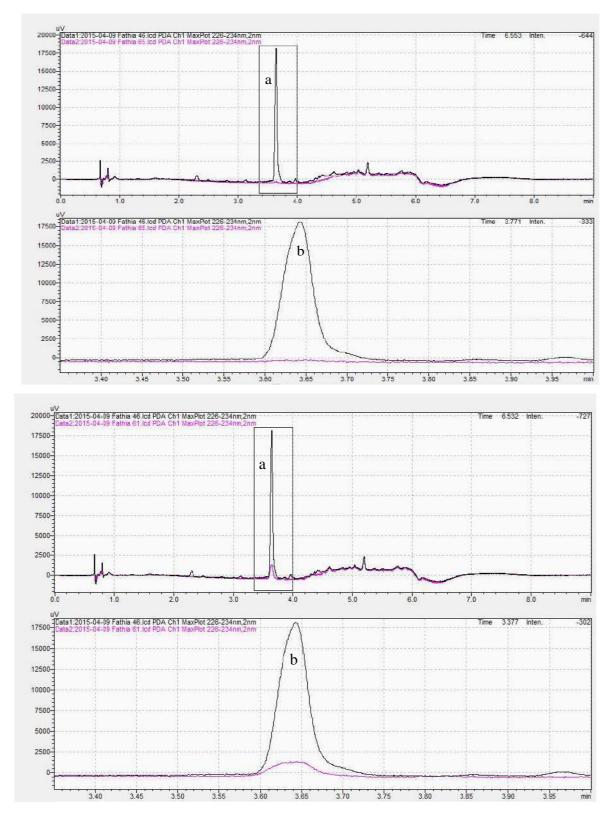


Figure 45: Profils chromatographiques de l'inhibition des TCTB (DON/15ADON) chez *F. graminearum* (349 et 812) respectivement par les huiles essentielles des Feuilles du *R. adpressum* obtenus par UPLC (Spectre noire : Témoin, Spectre Rose : Traité)

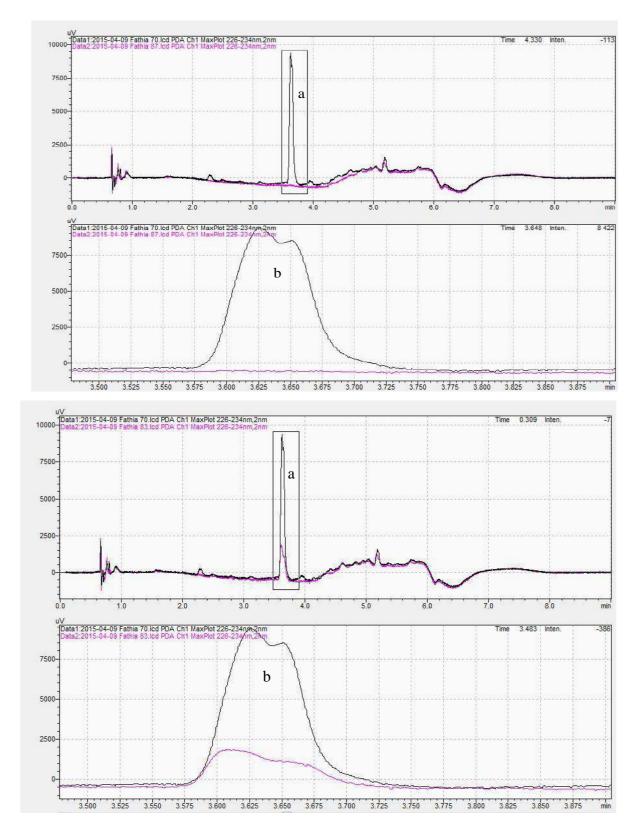


Figure 46: Profils chromatographiques de l'inhibition des TCTB (DON/15ADON) chez *F. graminearum* (349 et 812) respectivement par les huiles essentielles des Fleurs du *R. adpressum* obtenus par UPLC (Spectre noire : Témoin, Spectre Rose : Traité)

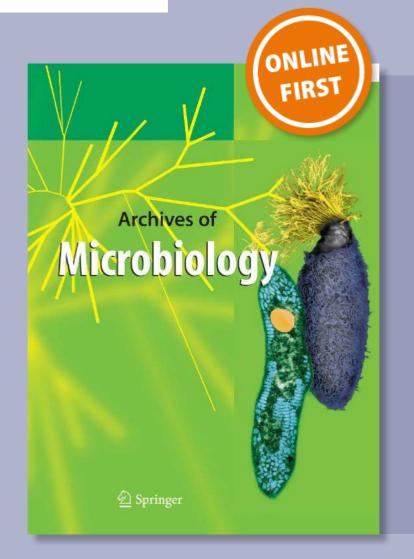
Publications

Variability of composition and effects of essential oils from Rhanteriu adpressum Coss. & Durieu against mycotoxinogenic Fusarium strains

Fatiha Elhouiti, Djilali Tahri, Djalila Takhi, Mohamed Ouinten, Christian Barreau, Marie-Noëlle Verdal-Bonnin, Isabelle Bombarda, et al.

Archives of Microbiology

ISSN 0302-8933 Arch Microbiol DOI 10.1007/s00203-017-1404-z



Your article is protected by copyright and all rights are held exclusively by Springer- Verlag GmbH Germany. This e-offprint is for personal use only and shall not be self-archived in electronic repositories. If you wish to self-archive your article, please use the accepted manuscript version for posting on your own website. You may further deposit the accepted manuscript version in any repository, provided it is only made publicly available 12 months after official publication or later and provided acknowledgement is given to the original source of publication and a link is inserted to the published article on Springer's website. The link must be accompanied by the following text: "The final publication is available at link.springer.com"		
Springer- Verlag GmbH Germany. This e-offprint is for personal use only and shall not be self-archived in electronic repositories. If you wish to self-archive your article, please use the accepted manuscript version for posting on your own website. You may further deposit the accepted manuscript version in any repository, provided it is only made publicly available 12 months after official publication or later and provided acknowledgement is given to the original source of publication and a link is inserted to the published article on Springer's website. The link must be accompanied by the following text: "The final publication is available		
Springer- Verlag GmbH Germany. This e-offprint is for personal use only and shall not be self-archived in electronic repositories. If you wish to self-archive your article, please use the accepted manuscript version for posting on your own website. You may further deposit the accepted manuscript version in any repository, provided it is only made publicly available 12 months after official publication or later and provided acknowledgement is given to the original source of publication and a link is inserted to the published article on Springer's website. The link must be accompanied by the following text: "The final publication is available		
	Springer- Verlag GmbH Germany. This e-of shall not be self-archived in electronic repositories. If you please use the accepted manuscript version You may further deposit the accepted man provided it is only made publicly available 1 or later and provided acknowledgement is publication and a link is inserted to the published artic must be accompanied by the following text	ffprint is for personal use only and wish to self-archive your article, n for posting on your own website. nuscript version in any repository, 12 months after official publication s given to the original source of cle on Springer's website. The link



Variability of composition and effects of essential oils from *Rhanterium adpressum* Coss. & Durieu against mycotoxinogenic *Fusarium* strains

Fatiha Elhouiti^{1,2}· Djilali Tahri¹· Djalila Takhi³· Mohamed Ouinten¹· Christian Barreau⁴· Marie-Noëlle Verdal-Bonnin⁴· Isabelle Bombarda⁵ · Mohamed Yousfi¹

Received: 25 February 2017 / Revised: 28 May 2017 / Accepted: 19 June 2017 © Springer-Verlag GmbH Germany 2017

Abstract The antifungal potency of the essential oils of Rhanterium adpressum was evaluated against four mycotoxigenic strains of the genus Fusarium. The essential oils were obtained, separately, by hydro-distillation of the aerial parts of R. adpressum (leaves and flowers). The parts were collected during the period of bloom (3 months) for 3 years. The GC-MS analysis revealed thirty-six compounds for the essential oils, divided into four classes of chemical compounds, with variable percentages according to the month of extraction. The monoterpene hydrocarbons form the main class in these oils. On the other hand, the highest percentages of the oxygenated compounds are observed in the samples collected during the month of May. The direct contact method was used to evaluate the antifungal activity of the essential oils. The activity can be attributed to their relatively high composition of oxygenated monoterpenes.

Communicated by Erko Stackebrandt.

- * Fatiha Elhouiti f.elhouiti@lagh-univ.dz
- Laboratoire de Recherche des Sciences Fondamentales, Université Amar TELIDJI, Route de Ghardaïa, BP 37G, 03000 Laghouat, Algeria
- ² Laboratoire de Recherche Valorisation et Promotion des Ressources Sahariennes (LVPRS), Université de Ouargla, Route de Ghardaïa, BP 511, 30000 Ouargla, Algeria
- ³ Laboratoire de Recherche Exploration et Valorisation des Écosystèmes Steppiques, Université Ziane Achour, BP 3117, 17000 Djelfa, Algeria
- Institut National de la Recherche Agronomique, INRA, UR1264, MycSA, BP 81, 71 Avenue Edouard Bourleaux, Villenave d'Ornon Cedex, 33883 Bordeaux, France
- Laboratoire LISA, Équipe METICA, EA 4672, Université Aix-Marseille, Marseille, France

Published online: 13 July 2017

Flowers extract showed strong inhibitory activity, with very interesting concentrations of IC50 and MIC for both tests on solid and liquid medium. The effect of these oils on the production of type B trichothecenes (TCTBs) was evaluated, showing a significant inhibitory effect on TCTBs production, for both extracts (leaves and flowers). The rates of inhibition were 66–97 and 76–100% of FX, 3-ADON and 15-ADON, respectively. The inhibition of fungal biomass and the production of TCTBs depended on the used concentration of the essential oils. These results suggest that the essential oils from *R. adpressum* are able to control the growth of the tested strains and their subsequent production of TCTB mycotoxins.

Keywords Essential oils · Rhanterium adpressum · Antifungal activity · Fusarium culmorum · Fusarium graminearum · Mycotoxin production

Introduction

Algeria offers an important and unexplored plant potential. In the studies of natural resources, several plant substances have been identified and have been proven to be useful for therapeutic purposes. In this context, the unexplored antifungal and antimycotoxigenic activities of the essential oils (EO) of *Rhanterium adpressum* Coss. & Durieu, have been studied. This spontaneous *Asteraceae*, commonly called Aarfadj, is found in different areas in southern Algeria (Chehma 2006). It is often used by the local population for tanning and as an antidiuretic in folk medicine (Bouheroum et al. 2007).

Many diseases affecting plants are of fungal origin. Among these, and one of the most damaging, is "Ear Fusariosis". It is widespread in small-grain cereals such as wheat, barley, oats and corn. This disease causes severe symptoms on different parts of the affected plants and can provoke necrosis of the ears. Thus, it generates significant quality and yield losses, and may lead to the loss of all crops (Pirgozliev et al. 2003).

The main phytopathogenic agents responsible for this fusariosis are the ascomycete fungi belonging to the genera *Fusarium* and *Microdochium*, including *Fusarium graminearum* and *Fusarium culmorum*. During the infection, these phytopathogenic fungi, with mycotoxigenic potential, can produce two major families of mycotoxins: trichothecenes B (TCTBs) and zearalenone (ZEN) (Merhej et al. 2011).

There are few studies on secondary metabolites of *Ranthterium* species mentioned in scientific literature (Bouheroum et al. 2007; Hamia et al. 2013; Kala et al. 2009). Organic extracts (ethyl acetate) from *Ranthterium adpressum* flowers and aerial parts of *Rhanterium suaveolens* were found to offer a potential source of antioxidants (Boussoussa et al. 2014; Bouaziz et al. 2009). The essential oils extracted by hydro-distillation from the aerial parts of the plant showed antifungal activity against *Fusarium oxysporum* (El Houiti et al. 2016).

In this work, the inhibition of fungal biomass using essential oils extracted from *R. adpressum*, the kinetics of mycelial growth and the rate of inhibition in the pres- ence of different concentrations of EOs were studied. In addition, the inhibition of TCTBs production by the EOs was examined. Eventually, this work will provide solutions for the preservation of food by proposing natural plant molecules that can serve as antifungal agents. These products could replace chemical fungicides that could be used to, partially or totally, inhibit the growth of fungicausing deleterious effects to economically important plant crops such as wheat, barley or corn.

The purpose of this work was to study the chemical composition of the essential oils (leaves and flowers) extracted from plant samples collected over 3 months, during 3 years. On the other hand, the antifungal and mycotoxigenic properties against four phytopathogenic and mycotoxinogenic isolates of the genus *Fusarium* (two

F. graminearum and two *F. culmorum*) were assessed. The effects of the two EOs were evaluated on three major parameters:

- The kinetics of mycelial growth, in solid medium;
- The rate of inhibition of the mycelium, by two methods (by the method of direct contact, and in a liquid medium by, the microdilution technique);
- The inhibition of the production of mycotoxins type B trichothecenes by UPLC analysis, to quantify the accumulation of mycotoxins (3-ADON and 15-ADON and Fx).

Materials and methods

Plant material and extraction of the essential oils

The aerial parts of *Rhanterium adpressum* were collected on three different months (April, May and June), for 3 years: 2011, 2012 and 2013 by Pr Yousfi Mohamed. The identification of the plant was performed by Pr Chehma Abedelmajid, a botanist from Biology Department, University of Ouargla Algeria. The samplings took place at the area of Zelfana (Department of Ghardaia), located 660 km SSE of Algiers: latitude 32°23′46″ (N); longitude 5°13′34″ (E); altitude 354 m. A voucher specimen (RACD47/05/07) was deposited in the herbarium of the Fundamental Sciences Research Laboratory at Laghouat University (Hamia et al. 2013).

The freshly collected samples were dried at room temperature, away from light and humidity. The plant was then divided into two parts: the flowers and the stems. The essential oil was obtained by hydro-distillation during 6 h, using a Clevenger type apparatus. The obtained oil was treated by anhydrous sodium sulfate, filtrated then stored at +4 °C, until analysis.

Analysis of essential oils

The separation of the compounds of the EO was performed by Agilent technologies 7890A gas chromatograph (GC), equipped with a flame ionization detector (FID), with a HP5 capillary column (30 m \times 0.32 mm, film thickness 0.40 µm). The oven temperatures program was as follows: 2 min at 80 °C; from 80 to 200 °C at 5 °C/min; 5 min at 200 °C; then from 200 to 260 °C at 20 °C/min; followed by 5 min at 260 °C. Detector and inlet temperatures were 280 °C. Hydrogen was used as a carrier gas at a constant flow of 1 mL/min with a split ratio 70/1. The injections were 1 µL of essential oil in methylene chloride (50 mg of EO in 1 mL CH₂Cl₂).

The GC–MS analysis was performed using an Agilent technologies gas chromatography 7890A equipped with a HP5MS capillary column (30 m \times 0.25 mm \times 0.25 μ m), and a mass detector MS 5975C VL MSD operated in EI mode. Helium was used as a carrier gas at a flow rate of 1 mL/min, split 50:1. The oven temperature program was as follows: 2 min at 80 °C; from 80 to 200 °C at 5 °C/min; 5 min at 200 °C; then from 200 to 260 °C at 20 °C/min; followed by 5 min at 260 °C. Detector and inlet temperatures were 280 °C. Identification of components was based on comparison of their mass spectra with those of WILEY and NIST Libraries, as well as on comparison of their retention indices with literature (Adams 2007; Benzo et al. 2007).

Fungal strains

In this study, four mycotoxinogenic strains of the genus *Fusarium* were tested for antifungal activity. These strains are known to cause spoilage of cereals. Two isolates of *F. graminearum* from the INRA-MycSA laboratory (PH-1, NRRL 31084, originally isolated from Michigan) from chemotype DON/15-ADON coded INRA 812, and CBS 185.32 (Centraal Bureau voor Shimmelkulturen, Netherlands) from the chemotype DON/15-ADON coded INRA 349. Two isolates of *F. culmorum* were also tested. These isolates were collected in Oued Smar and Rouiba (North of Algeria), and belong to the Mycothèque Touati-Hattab S. (one isolate of the chemotype NIV/FX coded T5; the other from the chemotype DON/3-ADON-coded BD17). All these strains have a high ability to produce Type B trichothecenes (TCTBs).

Antifungal activity

The EOs from June 2013 samples (leaves and flowers) were chosen for the tests of activity because they presented the highest yields. Various methods exist to access the antifungal activity of essential oils (Amvam Zollo et al. 1998). The effects of our EOs were evaluated regarding two major parameters:

- Kinetics of mycelial growth in solid medium.
- Rate of mycelium inhibition, which was evaluated by two methods: in solid medium by the method of direct contact, and in liquid medium by the microdilution technique using 96-well microplates.

To inoculate the solid and liquid culture media, a 5-mm diameter agar disk containing mycelium was transferred onto the center of PDA medium plates (Potato Dextrose Agar), using a pure culture prepared beforehand. Incubation was carried out at 25 ± 2 °C for 6 days (Collin et al. 1989). Another liquid medium (CMC, Carboxymethyl cellulose) was used to promote the production of spores which serves as an inoculum for the synthetic liquid culture medium (LSM, liquid synthetic medium).

Kinetics of fungal growth

Different concentrations of the EOs, ranging from $0.5\,$ to $20\,$ $\mu L/mL$, were added to the culture medium. Afterwards, the kinetics of the fungal growth was determined by measuring the diameter of the growth daily at the same hour.

Antifungal activity on solid medium

The effect of the EOs on mycelial development was evaluated using the direct contact method by calculating the inhibition percentage of the mycelium after 7 days of incubation at 25 ± 2 °C (El Ajjouri et al. 2008; Remmal

et al. 1993; Satrani et al. 2001).

1/5th-1/200th dilutions of the EOs were prepared in an agar solution (2%). In tubes, each containing 13.5 mL of sterile PDA medium (45 °C), 1.5 mL of each essential oil dilution was added to obtain final concentrations rang- ing from 0.5 to 20 µL/mL. The tubes were then shacked and poured into Petri plates. Witnesses, containing the medium and agar solution without EO were prepared and used as controls. The Petri plates were inoculated by putting an agar disc containing mycelium taken from the periphery of the thallus derived from a Fusarium culture of 7 days on PDA. A Fusarium culture on PDA medium without extract was used as a control. The cultures were incubated in the dark at 25 ± 2 °C for 7 days. The antifungal activity was determined by comparing the mycelial growth after treatment, with the mycelial growth of the control, then by calculating the percentage of mycelial inhibition.

Antifungal activity on liquid culture medium

The antifungal properties of the EOs were accessed by determining the rate of mycelium inhibition on liquid medium by the microdilution technique, using 96-well microplates. 10 µL of inoculum with a concentration of 10⁶ spores/μL of each fungal species were diluted in a liquid synthetic culture medium (LSM). After inoculation, the microtiter plates were treated with appropriate doses of the EOs to obtain concentrations ranging from 0.25 to 10 μ L/mL per well (Fleurat-Lessard et al. 2015). Each strain is tested on the same microplate for different concentrations, hence the use of a transparent adhesive film to close the wells (avoid mixing due to volatility). Then, the whole is left to grow for 4 days, at 25 °C in total darkness. A series of repetition are made, three wells (repetitions) for each concentration as well as for controls.

The assessment of mycelial growth is determined by comparing the fungal growth with and without EOs (controls). The antifungal activity was evaluated by measuring the absorbance at 630 nm immediately after the period of Incubation by a simple spectrophotometric reading (microplate reader Bio-TEK®instruments ELX 800, Germany). The IC50 (50% inhibitory concentrations) and MIC (minimal inhibitory concentrations) were determined for

both extracts (leaves and flowers) against all tested strains.

Analysis of mycotoxin production for the treated fungi

The same extracts (June 2013) were chosen for this analysis. The TCTBs were extracted from 4 mL of liquid culture medium, recovered after 4 days of incubation, and centrifuged to remove the mycelium, to which two volumes of ethyl acetate were added. After mixing in a vortex (1 min) and decantation, 2 mL of the supernatant were evaporated under a stream of nitrogen (at 50 °C). The dry residue was recovered in 1 mL of methanol/water mixture (50/50 v/v). Subsequently, it was filtered through a 0.45 µm porosity filter and analyzed by ultra performance liquid chromatography (UPLC), coupled to a detector with diode arrays (DAD).

The quantification of TCTB was performed on a Shimadzu Prominence UPLC chain, equipped with two pumps LC-20 AD, a degasser DGU-20A3R, an auto sampler SIL-30 AC and a diode-array detector SPD-M20A (Shimadzu Scientific Instruments, France). Separation was achieved on a Kinetex 2,6U XB-C18 100 Å column (150 × 4.6 mm, 2.6 µm) (Phenomenex, France) maintained at 45 °C. Mobile phase consisted of water acidified with ortho-phosphoric acid to reach pH 2.6 (solvent A) and acetonitrile (solvent B). The following gradient was used for elution: 7% B for 1 min, 7–30% B for 6 min, 30–90% B for 2 min, 90% B for 2 min, 90-7% B for 1 min, and 6 min post-run equilibration with initial conditions. The flow was kept at 0.7 mL min-1 for a total run time of 18 min. The injection volume was 0.5 µL. The UV-Vis spectra were recorded from 220 to 550 nm and peak areas were measured at 230 nm. Quantification was performed using external calibration ranging from 6.25 to 100 µg/g prepared with standard solutions (Romer Labs, Austria).

Statistical analysis

All experiences were performed in triplicate. Data processing was carried out with Origin b9.3.226. The significant differences between mean values were analyzed by an ANOVA oneway with significant values at P < 0.05. The determination of IC50 and MIC was performed with dose–response curve with variable Hill slope at error probability ≤ 0.05 .

Results and discussion

Variability of the chemical composition of essential oils

The GC/MS analysis of the essential oils allowed the identification of 36 compounds, for both parts leaves and flowers (Fig. 1). These compounds are divided into four classes (Table 1), with varying percentages according to the month of plant collection. Mainly the temperature of the region (Holopainen et al. 2013), where the flowering period occurs between the months of April and May, could influence this

variability. As of June, the temperature increases. Thus, the percentages of the classes are high in the samples collected in May, where the average temperatures are between 21 and 24 °C. Monoterpene hydrocarbons form the main class of compounds in the extracts. As for the oxygenated compounds, their rates are at their maximum in the samples collected in May, especially in the flowers extract.

Compounds known as important antimicrobials (Bajpai et al. 2013; Dorman and Deans 2000) are present in the extracts with more or less high concentrations, such as: α-Pinene (11.54%: leaves, 15.64%: flowers), β-Myrcene (21.59%: leaves, 12.81%: flowers), α-Thujene (0.33%: leaves, 0.22%: flowers), β-Pinene (13.91%: leaves, 9.92%: flowers), δ-Cadinene (1.16%: leaves, 1.20%: flowers), Linalool (6.04%: leaves, 6.07%: flowers), Geraniol (1.02%: leaves, 1.19%: flowers), α-Eudesmol (2.64%: leaves, 3.01%: flowers) (Dorman and Deans 2000; Özek et al. 2008; Kim et al. 1995; Böhme et al. 2014). Antimicrobial activity is influenced even more by the high percentages of oxygenated compounds (Bajpai et al. 2013). Extracts from June showed a good antifungal activity, compared to the extracts of May and April, where the percentage of compounds is lower (Fig. 2).

Kinetics of fungal growth

The kinetics of the fungal growth of the selected strains (Fig. 3) in the presence of different concentrations of the EOs showed variable susceptibilities ($P \leq 0.05$). The effect of leaves essential oil on mycelial growth is observed from a concentration of 2 μ L/mL. The strains INRA 349 and INRA 812 of *Fusarium graminearum* were less affected than the *Fusarium culmorum* strains.

A remarkable sensitivity of all strains to the EO of flowers was observed. Starting from the concentration of 1 $\mu L/$ mL, the inhibition of growth was very important. As for leaves extract, the inhibition was at its maximum at the concentration of 10 $\mu L/mL$, and a total inhibition was recorded at 20 $\mu L/mL$. On the other hand, the extract of the flowers inhibited totally the growth of all strains at 10 and 20 $\mu L/$ mL, while the concentration of 4 $\mu L/mL$ induced a strong inhibition of mycelial growth.

The two strains of F. graminearum appeared to be much more sensitive to the flowers extract, particularly the INRA 812 strain, where the concentration of 4 μ L/ mL showed a very similar effect to those obtained with 10 and 20 μ L/mL. Some of the results of Velluti et al. (2004), on the effect of essential oils of five plants on the growth of F. graminearum, showed a more or less significant effect at the concentration of 1 μ L/mL. Similarly,

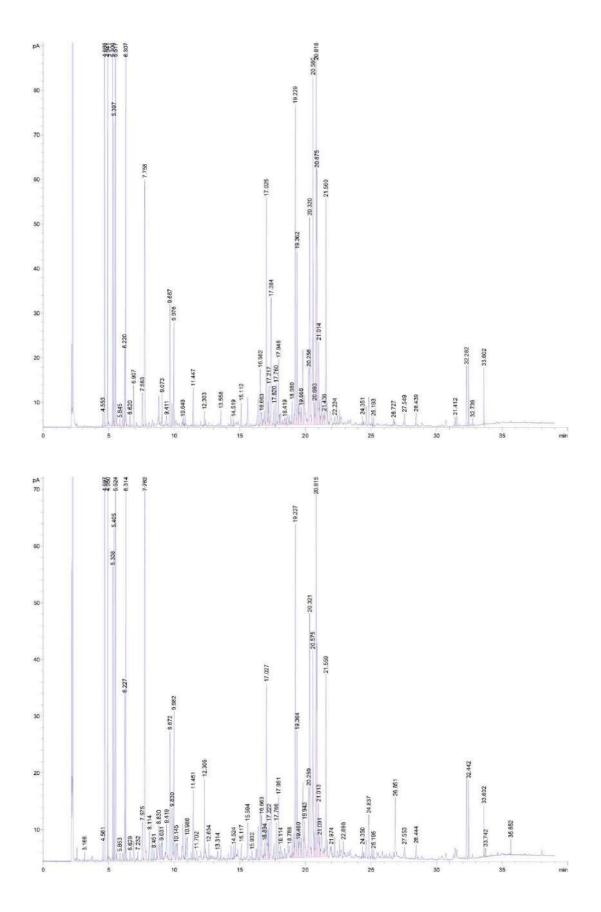


Fig. 1 Chromatogram of *Rhanterium adpressum* Coss. & Durieu essential oil using a HP-5 capillary column (leaves, above and flowers, below)

Table 1 The variation of the percentages of the chemical compounds classes according to the month of extraction for the two parts of the plant (leaves or flowers)

	Ap 11	Ma 11	Ju 11	Ap 12	Ma 12	Ju 12	Ma 13	Ju 13
Leaves								
Monoterpene hydrocarbons	54.49	63.77	67.17	57.77	69.71	64.21	44.35	22.50
Oxygenated monoterpenes	13.32	6.25	6.06	4.24	5.04	7.42	6.32	7.12
Total monoterpenes	67.80	70.01	73.23	62.01	74.75	71.63	50.67	29.62
Sesquiterpene hydrocarbons	3.70	4.10	2.61	7.29	5.14	1.58	5.50	5.30
Oxygenated sesquiterpenes	6.42	5.09	4.91	5.30	2.42	4.66	1.97	2.38
Total sesquiterpenes	10.12	9.20	7.52	12.58	7.56	6.24	7.47	7.68
Flowers								
Monoterpene hydrocarbons	44.69	49.28	39.85	44.80	43.21	39.78	34.11	36.21
Oxygenated monoterpenes	10.82	10.20	11.74	4.05	8.36	12.64	10.12	7.66
Total monoterpenes	55.51	59.48	51.59	48.84	51.58	52.43	44.23	43.87
Sesquiterpene hydrocarbons	3.96	3.95	4.98	2.54	3.37	1.46	2.55	3.14
Oxygenated sesquiterpenes	7.06	6.53	8.57	6.30	7.93	6.01	2.93	1.64
Total sesquiterpenes	11.02	10.48	13.55	8.83	11.30	7.47	5.49	4.79

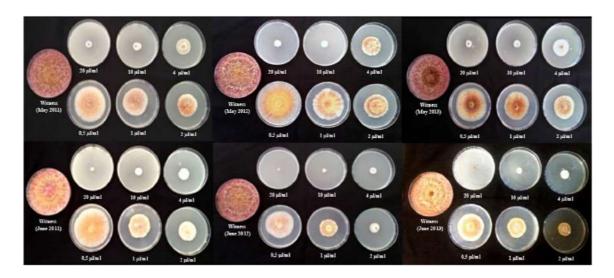


Fig. 2 Examples of the effect of *Rhanterium adpressum* essential oils from different plant samples on the growth of *Fusarium culmorum* (T5 strain)

the results of Singh et al. (2005), with the essential oils of *Foeniculum vulgare*, revealed that *F. graminearum* was very sensitive to the concentrations of 4 and 6 μ L/mL.

The two strains of F. culmorum also exhibited a high sensitivity towards the flowers extract starting from the concentration of 4 μ L/mL. In previous studies, Terzi et al. (2007) also observed a higinhibition level at the concentration of 5 μ L/mL with tea tree essential oil, terpinen-4-ol, 1.8-cineole and γ -terpinen. On the other hand, at the concentration of 2 μ L/mL, the essential oil of Cinnamomum zeylanicum exhibited an important inhibition of the growth of F. culmorum (Sumalan et al. 2013). Kordali et al. (2009) reported low susceptibility of F. graminearum and F. culmorum towards essential oils of Achillea gypsicola and Achillea biebersteinii, despite the

richness of these oils in oxygenated monoterpenes (94.42 and 83.98%).

Antifungal activity

Solid medium culture

The analysis of the antifungal activity of the extracts on solid medium revealed a variability between the effect of the EOs of the leaves and those of the flowers (Fig. 4). The concentration of 20 μ L/mL inhibited completely fungal growth for both extracts, if it exceeds the MIC (Table 2). However, the significant difference ($P \le 0.05$) between the two EOs started from the concentration of 0.5–10 μ L/mL. The concentration of 10 μ L/mL of

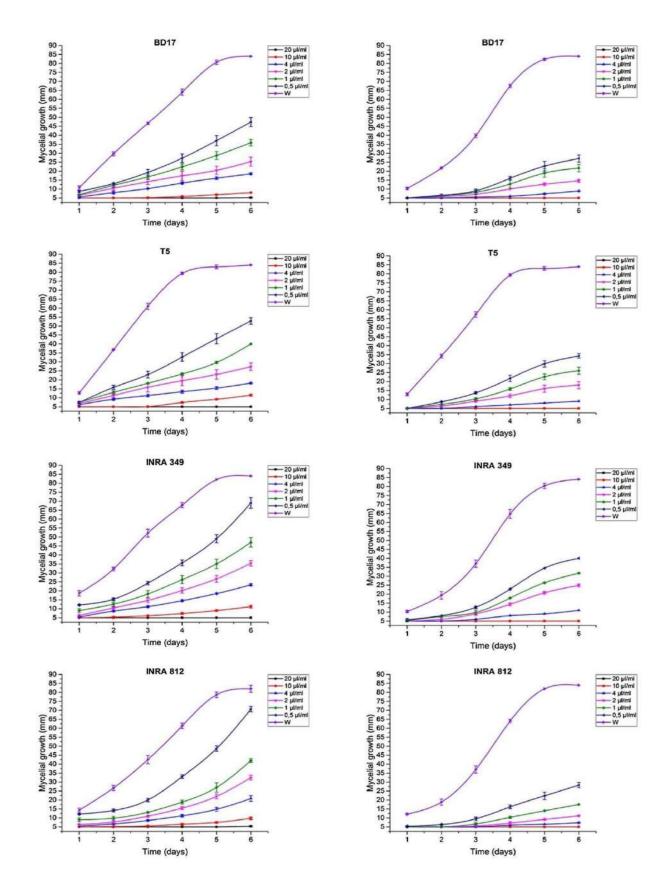


Fig. 3 The mycelial growth kinetics of the four fungal strains in the presence of different concentrations of the two extracts (leaves, on the *left*, and flowers, on the *right*)

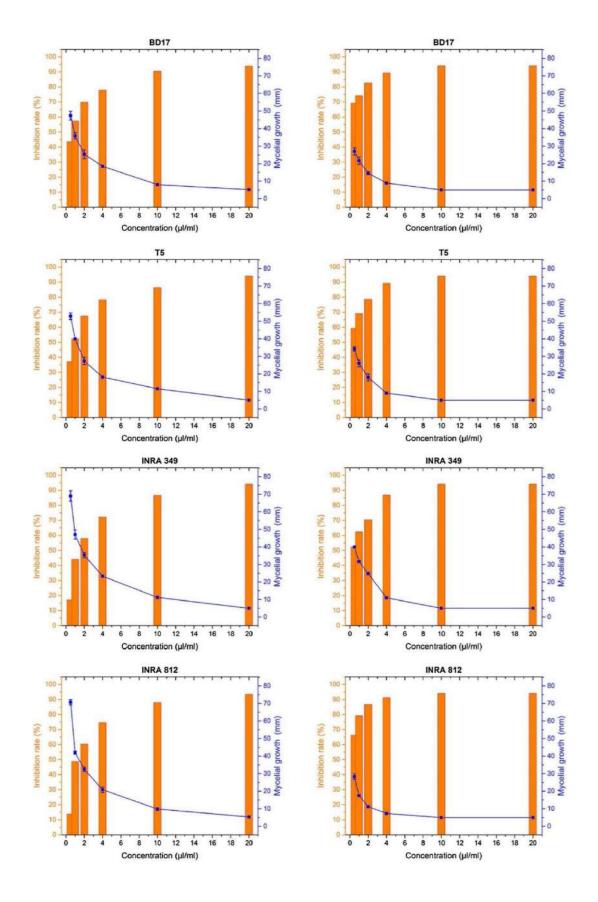


Fig. 4 The antifungal activity on solid medium in the presence of different concentrations of essential oils (leaves, on the *left*, and flowers, on the *right*)

Table 2 The IC50 and MIC values in the presence of different concentrations of the two extracts for the strains of *F. culmorum* and *F. graminearum*

	Lea	ves	Flowers	
	IC50	$MIC(\mu L/$	IC50	MIC (μL/
	$(\mu L/mL)$	mL)	(μL/mL)	mL)
Solid cultur	e medium			
BD17	0.70	12.81	0.27	9.30
T5	0.90	13.41	0.32	6.71
INRA 349	1.54	12.73	0.49	9.17
INRA 812	1.42	10.41	0.28	5.23
Liquid cultu	re medium			
BD17	0.27	7.79	0.23	10.3
T5	0.24	6.69	0.20	8.84
INRA 349	0.26	8.05	0.24	5.85
INRA 812	0.37	10.40	0.22	5.90

as additional stressors that rather stimulate the production of mycotoxins (Magan et al. 2002; D'mello et al.1998; Milus and Parsons 1994). flowers extract presented the same effect as the concentration 20 μ L/mL, against all strains, regarding the inhibition rate (94.04%). This was not the case with leaves extract, whose inhibition rate was less important than the previous one, and varied between strains. The effect of concentrations 0.5, 1, 2 and 4 μ L/mL differed significantly between the two extracts. As in the case of flow- ers extract, the lowest concentration (0.5 μ L/mL) generated high levels of inhibition, varying between 52 and 67%, for all strains. However, the inhibition levels of the same concentration for leaves extract did not exceed 50% (13–47%).

Liquid culture medium

The antifungal activity in liquid medium also allowed to note the variability of the inhibitory effect of the extracts (Fig. 5). The strains were more sensitive to the EO of flowers than the EO of leaves. The lowest concentration of the EO derived from flowers (0.25 $\mu L/mL)$ was capable of inhibiting more than 70% of the fungal growth. However, the effect of this concentration was about half as much effective as the leaves essential oil. The concentration of 10 $\mu L/mL$ for all extracts was found sufficient to inhibit completely the growth of the tested strains.

In both culture media, the T5 and INRA 812 strains showed great sensitivity towards the essential oil of flowers (inhibition rate >60% in solid medium, >70% in liquid medium from lower concentration).

The variability of antifungal potency of EOs on solid and liquid medium, and their effects on mycelial growth, depended on the used concentrations, and on the variation in the chemical composition of the tested extracts.

IC50 and MIC of the extracts

The susceptibility of the strains INRA 349 and 812 of *F. graminearum* to the extract of flowers is also visible by

the calculation of IC50 and MIC (Table 2). The values of these two parameters are significantly different ($P \le 0.05$), between extracts of leaves and flowers on solid medium.

The IC50 and MIC presented interesting values in liquid medium with the extract of flowers, but not with a significant difference compared to those of the extract of leaves. According to Dobre and Niculita (2012), *F. culmorum* and *F. graminearum* were highly sensitive to essential oils of clove, white thyme and oregano at the concentrations of 1 and 1.5 μ L/mL PCMs. However, several studies discussed the ineffectiveness of fungicides in controlling the production of mycotoxins, where they are considered sometimes

Effect of essential oils on TCTBs trichothecenes production

The TCTBs trichothecenes are considered as major determinants in the aggressiveness of F. culmorum and F. graminearum (Wagacha and Muthomi 2007; Muthomi et al. 2000; Eudes et al. 2001). According to their production, the strains of F. culmorum and F. graminearum were divided into two chemotypes: the NIV chemotype, which includes isolates producing nivalenol and fusarenone X, and DON chemotype, including isolates producing DON and acetyldeoxynivalenol (Wagacha and Muthomi 2007; Bakan et al. 2001). Bakan et al. (2001) have found that total trichothecenes range from 0.052 to 68.1 mg/kg in sixty strains of F. culmorum. Specimens of Polish wheat ears infected with F. culmorum and F. graminearum were contaminated with DON (100%) and 3-ADON (80%) at very high concentrations (30.4 and 29.54 mg/kg, respectively (Visconti et al. 1986; Bottalico and Perrone 2002). However, 140 specimens of Bulgarian wheat ears, infected with F. graminearum 3-ADON and 15-ADON, contaminated 2.1 and 0.7% of the total with concentrations in excess of 0.1 mg/kg (Bottalico and Perrone 2002; Vrabcheva et al. 1996). Another study conducted by Touati-Hattab et al. (2016), on Algerian populations of Oued Smar and Rouiba, revealed a correlation between the level of F. cul- morum invasion and the amount of accumulated TCTB tox- ins. These authors recorded a production of DON varying between 89 and 340.5 μ g/g and 3-ADON between 52.6 and

In our study, the inhibition of the production of the mycotoxins was analyzed in the presence of $0.25~\mu\text{L/mL}$ of each of our extracts (Fig. 6), where it was the average

284.2 μg/g.

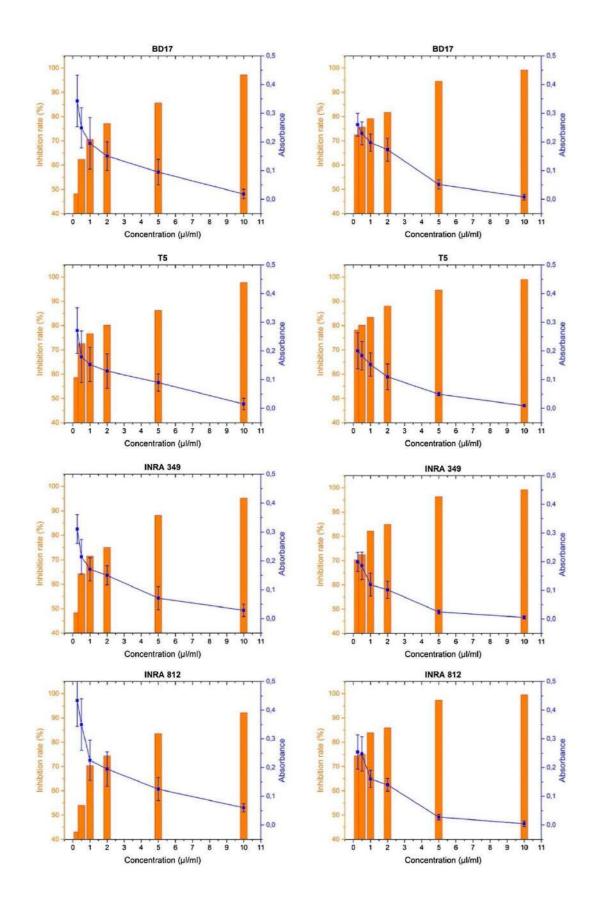


Fig. 5 Antifungal activity in liquid medium in the presence of different concentrations of the two extracts (leaves, on the left, and flowers, on the right)

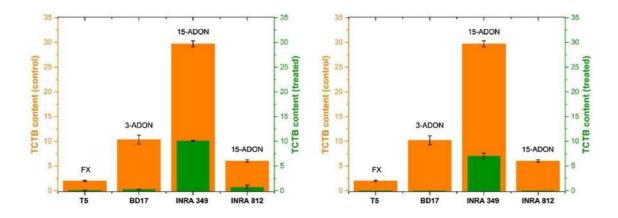


Fig. 6 The production of TCTBs in $\mu g/mg$ of mycelium in the absence (control) and in the presence (treated) of 0.25 $\mu L/mL$ of the EOsof leaves and flowers

concentration of the means, deduced from the results of the inhibition in liquid medium between the two extracts. In the case of leaves extract, production of mycotoxins was more sensitive to the presence of essential oil in *F. culmorum* strains, where the rate of change between control and post-treatment is between 95–97% inhibition for FX and 3-ADON. The same result has been noticed for the strains of *F. graminearum* (INRA 812), with a small resistance noticed in INRA 349, whose inhibition was only 66%. On the other hand, the inhibition of the production of mycotoxins FX, 3-ADON and 15-ADON with the flowers extract was total (100%) in T5, BD17 and INRA 812. However, 15-ADON of INRA 349 showed a low resistance with 76% inhibition.

Conclusion

In the present study, the variation of the composition of the essential oils of leaves and flowers of Rhanterium adpressum was noticed, as it was shown in the results of the composition. This variability could have been influenced by, among other elements, the edaphoclimatic factors (drought and rainfall). This difference has also been shown to be important in the antifungal activity against the four studied mycotoxigenic strains of the genus Fusarium. In addition, the activity of the flowers essential oil is evident in the results of the tests on solid and liquid media accord- ing to its very interesting concentrations of IC50 and MIC. The two extracts exhibited a remarkable inhibition on the production of mycotoxins, where a 100% inhibition was recorded for the flowers extract on the three strains: F. culmorum T5, BD17 and F. graminearum INRA 812. In conclusion, the results of the antifungal power of the essential oils of Rhanterium adpressum and their inhibitory effect on the production of mycotoxins are very interesting. Other complementary work must be carried out on the different

chemotypes characterizing the populations of this plant. In addition, the inhibitory compounds should be characterized, and their action levels localized, thus mechanisms of action for these essential oils could be proposed.

Acknowledgements The authors would like to thank Touati Hat- tab S., Fleurat-Lessard, F. and all the members of the research team of MycSA unit, UR1264, National Institute of Agronomic Research, INRA, Bordeaux, France for their assistance in the realization of this study.

References

Adams RP (2007) Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry, 4th edn. Allured Publ. Corp, Carol Stream

Amvam Zollo PH, Biyiti L, Tchoumbougnang F, Menut C, Lamaty G, Bouchet P (1998) Aromatic plants of tropical Central Africa. Part XXXII. Chemical composition and antifungal activity of thirteen essential oils from aromatic plants of cameroon. Flavour Fragr J 13:107–114

Bajpai VK, Shukla S, Sharma A (2013) Essential oils as antimicrobial agents. In: Rramawat KG, Merillon JM (eds) Natural products. Springer, Berlin, Heidelberg, p 3975–3988

Bakan B, Pinson L, Cahagnier B, Melcion D et al (2001) Toxigenic potential of *Fusarium culmorum* strains isolated from French wheat. Food Addit Contam 18(11):998–1003

Benzo M, Gilardoni G, Gandini C et al (2007) Determination of the threshold odor concentration of main odorants in essential oils using gas chromatography–olfactometry incremental dilution technique. J Chromatogr A 1150(1–2):131–135

Böhme K, Barros-Velázquez J, Calo-Mata P, Aubourg SP (2014) Antibacterial, antiviral and antifungal activity of essential oils: mechanisms and applications. In: Villa T, Veiga-Crespo P (eds) Antimicrobial compounds. Springer, Berlin, Heidelberg

Bottalico A, Perrone G (2002) Toxigenic *Fusarium* species and mycotoxins associated with head blight in small-grain cereals in Europe. Eur J Plant Pathol 108(7):611–624

Bouaziz M, Dhouib A, Loukil S et al (2009) Polyphenols content antioxidant and antimicrobial activities of extracts of some wild plants collected from the south of Tunisia. Afr J Biotechnol 8(24):7017–7110

- Bouheroum M, Benayache SF, Benayache L, Zaiter J, Barrera M, Francisco L (2007) Terpenoids and triynepoxide from the aerial part of *Rhantherium adpressum*. Chem Nat Compd 43:110–111
- Boussoussa H, Hamia C, Djeridande A et al (2014) Effect of different solvent polarity on extraction of phenolic compounds from Algerian *Rhanterium adpressum* flowers and their antimicrobial and antioxidant activities. Curr Chem Biol 8:1–7
- Chehma A (2006) Catalogue des plantes spontanées du Sahara septentrional Algérien. Laboratoire de « Protection des écosystèmes en zones arides et semi aride ». Edition Dar El Houda. ISBN:9947-0-1312-X
- Collin GJ, Lord D, Allaire J, Gagnon D (1989) Huiles essentielles et extraits 'micro-ondes'. Parfums Cosmétiques Arômes 97:105–112
- D'mello JF, Macdonald AM, Postel D et al (1998) Pesticide use and mycotoxin production in *Fusarium* and *Aspergillus* phytopathogens. Eur J Plant Pathol 104(8):741–751
- Dobre AA, Niculita P (2012) Preliminary research to develop active packaging for bakery products using essential oils. Sci Bull Ser F Biotechnol XVI:139–144
- Dorman HJD, Deans SG (2000) Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. J Appl Microbiol 88(2):308-316
- El Ajjouri M, Satrani B, Ghanmi M et al (2008) Activité antifongique des huiles essentielles de *Thymus bleicherianus* Pomel et *Thymus capitatus* (L.) Hoffm. & Link contre les champignons de pourriture du bois d'œuvre. Biotechnol Agron Soc Environ 12:345–351
- El Houiti F, Tahri D, Seba M et al (2016) Inhibition of *Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis* by essential oils of flowers and stems of *Rhanterium adpressum*. PhOL PharmacologyOnLine 3(22):141–150
- Eudes F, Comeau A, Rioux S, Collin J (2001) Impact of trichothecenes on *Fusarium* head blight [*Fusarium graminearum*] development in spring wheat (*Triticum aestivum*). Can J Plant Pathol 23(3):318–322
- Fleurat-Lessard F, Bergougnoux M, Debourdeau G, Barreau C (2015)
 In vitro large screening of bioactive compounds of botanical origin for antifungal activity against two mycotoxigenic fungi of wheat: Aspergillus westerdijkiae and Fusarium graminearum.
 In: Arthur FH, Kengkanpanich R, Chayaprasert W, Suthisut D (Eds.) Actes de la 11e Conférence internationale de travail sur la protection stockée produit 24–28 November 2014 Chiang Mai, p 1045–1060
- Hamia C, Gourine N, Boussoussa H et al (2013) Chemical composition and antioxidant activity of the essential oil and fatty acids of the flowers of *Rhanterium adpressum*. Nat Prod Commun 8(8):1171–1173
- Holopainen JK, Himanen SJ, Yuan JS, Chen F, Stewart, CN Jr (2013)
 Ecological functions of terpenoids and climate changes. In:
 Ramawat KG, Merillon JM (eds) Handbook of natural products.
 Springer, p 2913–2940
- Kala A, Gherraf N, Belkacemi D et al (2009) Composition of the essential oil of *Rhanterium adpressum* Coss. and Durieu from Algeria. Arch Appl Sci Res 1:115–118
- Kim JM, Marshall MR, Cornell JA et al (1995) Antibacterial activity of carvacrol, citral, and geraniol against *Salmonella typhimurium* in culture medium and on fish cubes. J Food Sci 60(6):1364–1368

- Kordali S, Cakir A, Akcin TA et al (2009) Antifungal and herbicidal properties of essential oils and n-hexane extracts of *Achillea gypsicola* Hub-Mor. and *Achillea biebersteinii* Afan. (Asteraceae). Ind Crops Prod 29(2):562–570
- Magan N, Hope R, Colleate A, Baxter ES (2002) Relationship between growth and mycotoxin production by *Fusarium* species, biocides and environment. Eur J Plant Pathol 108:685–690
- Merhej J, Richard-Forget F, Barreau C (2011) The pH regulatory factor Pac1 regulates Tri gene expression and trichothecene production in *Fusarium graminearum*. Fungal Genet Biol 48:275–284
- Milus EA, Parsons CE (1994) Evaluation of foliar fungicides for controlling *Fusarium* head blight of wheat. Plant Dis 78:697–699
- Muthomi JW, Schütze A, Dehne HW et al (2000) Characterization of *Fusarium culmorum* isolates by mycotoxin production and aggressiveness to winter wheat. J Plant Dis Prot 107:113–123
- Özek G, Özek T, Işcan G et al (2008) Composition and antimicrobial activity of the oils of *Ferula szowitsiana* DC. from Turkey. J Essent Oil Res 20(2):186–190
- Pirgozliev VR, Birch CL, Rose CP et al (2003) Chemical composition and the nutritive quality of different wheat cultivars for broiler chickens. Br Poult Sci 44:464–475
- Remmal A, T-elaraki A, Bouchikhi T et al (1993) Improved method for the determination of antimicrobial activity of essential oils in Agar medium. Essent Oil Res 5:179–184
- Satrani B, farah A, fechtal M et al (2001) Composition chimique et activité antimicrobienne des huiles essentielles de *Satureja calamintha* et *Saturija alpina* du Maroc. Ann Fals Exp Chim 956:241–250
- Singh G, Maurya S, De Lampasona MP, Catalan C (2005) Studies on essential oils, Part 44: chemical, antifungal, antioxidant activity of *Foeniculum vulgare* volatile oil and its oleoresins. Food Control 20(1):1–6
- Sumalan RM, Alexa E, Poiana MA (2013) Assessment of inhibitory potential of essential oils on natural mycoflora and *Fusarium* mycotoxins production in wheat. Chem Cent J 7(1):1
- Terzi V, Morcia C, Faccioli P et al (2007) In vitro antifungal activity of the tea tree (*Melaleuca alternifolia*) essential oil and its major components against plant pathogens. Lett Appl Microbiol 44(6):613–618
- Touati-Hattab S, Barreau C, Verdal-Bonnin MN et al (2016) Pathogenicity and trichothecenes production of *Fusarium culmo- rum* strains causing head blight on wheat and evaluation of resistance of the varieties cultivated in Algeria. J Plant Pathol 145(4):797–814
- Velluti A, Sanchis V, Ramos AJ et al (2004) Impact of essential oils on growth rate, zearalenone and deoxynivalenol production by *Fusarium graminearum* under different temperature and water activity conditions in maize grain. J Appl Microbiol 96(4):716–724
- Visconti A, Chelkowski J, Bottalico A (1986) Deoxynivalenol and 3-acetyldeoxynivalenol—mycotoxins associated with wheat head fusariosis in Poland. Mycotoxin Res 2(2):59–64
- Vrabcheva T, Geßler R, Usleber E, Märtlbauer E (1996) First survey on the natural occurrence of *Fusarium* mycotoxins in Bulgarian wheat. Mycopathologia 136(1):47–52
- Wagacha JM, Muthomi JW (2007) Fusarium culmorum: infection process, mechanisms of mycotoxin production and their role in pathogenesis in wheat. Crop Prot 26(7):877–885





December 30, 2016

Archives • 2016 • vol.3 • 141-150

INHIBITION OF FUSARIUM OXYSPORUM F. SP. ALBEDINIS BY ESSENTIAL OILS OF FLOWERS AND STEMS OF RHANTERIUM ADPRESSUM

El Houiti, F.1*; Tahri, D.2; Seba, M.2; Ouinten, M.1; Gaydou, E. M.3; Yousfi, M.1

¹Laboratoire des Sciences Fondamentales à l'Université Amar TELIDJI de Laghouat, Route de Ghardaïa BP37G (03000), Laghouat, Algérie

²Université Amar TELIDJI, Département de Biologie, Laghouat, Algérie

³Laboratoire de Recherche en Systèmes Chimiques Complexes, Faculté des Sciences et Technique de Saint-Jérôme, Université Paul Cézanne,

Marseille, France

*f.elhouiti@lagh-univ.dz

Abstract

In the present study, we evaluated the antifungal activity of essential oils extracted from the stems and flowers of *Rhanterium adpressum*, a spontaneous plant growing in North Africa. The plant samples were collected from four regions in the Algerian desert. The antifungal activity of the essential oils was tested against *Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis*, the causal agent of the fungal vascular wilt of date palm.

The GC/MS analysis allowed the identification of forty-two chemical components in the essential oil samples. The results of the antifungal tests showed an inhibitory effect from the concentrations of 1.8 and 2 μ l/ml. The fungicidal concentration corresponds to 10 μ l/ml. In order to validate the results of the antifungal activity of the studied essential oils, a bioinformatics simulation was performed to compare the influence of the chemical composition of the oils on the antifungal activity.

Key words: Rhanterium adpressum, Fusarium oxysporum f. sp. albedinis, antifungal activity, bioinformatics simulation, GC/MS analysis.

http://pharmacologyonline.silae.it

33IV. 1027-0020

Introduction

Used by locals as antidiuretic and within tanning, Rhanterium adpressum Coss. & Durieu (Asteraceae) is a spontaneous plant; endemic in arid regions of North Africa. It is a subshrub, multicaulis, with alternate, small, whole and toothed leaves. The plant has many right twigs, tight in tufts, scales closely applied in pericline, obtuse, plan receptacle. It flowers from April to June. The Fruit is a narrow cylindrical achene with 4-5 ribs. Rhanterium adpressum is found in north algerian desert, starting from Aïn Sefra in the West, going through Mzab, Laghouat, Bou-Saâda, arriving to Biskra in the East [1, 2]. Rhanterium adpressum shows a very interestingbiological potential: antimicrobial [3, 4] and antioxidant activities [4, 5]. However, the botanical and ecological characteristics of the plant are still poorly studied, as well as its biological and chemical properties. For over a century, the palm groves of Morocco and Algeria were devastated by an imperfect Ascomycete fungus commonly found in soils, Fusarium oxysporum f. sp. albedinis (F.o.a.). This fungus, which causes a rapid withering of the date palm, is a serious threat to grove palms of North Africa. It is the agent of the Fusarium wilt of palm trees, commonly called Bayoud.

The disease affects particularly the best producing varieties of dates. However, its impact goes beyond the economic aspect. Indeed, the date palm occupies a key position in the oasis ecosystem and in the social organization of the peoples of the Saharan regions. All chemical treatment trials have failed because of the deep location of the internal parasite, out of reach of even the systemic fungicides [6, 7, 8, 10].

F. o. a. is on the list of quarantine organisms. Indeed, only the felling of infected palms and their incineration currently helps fighting the spread of infection. Facing the growing threat of the infection, and the degrading health of palm groves, research was undertaken for the development of a method of control using natural product from plants, such as essential oils to uncover the extent of contamination and avoid the felling of palm trees [6.7, 8, 9] Valorization of the antifungal potential of *Rhanterium* adpressum against F. o. a. will be the subject of this study. We primarily aimed to quantify and know the whole essential oils components of Rhanterium adpressum extracts. Afterwards, we tested the inhibitory power and the antifungal activity of the extracts from this plant, which was not evaluated before.

Materials and Methods

Preparation of samples Vegetal material

The samples of *Rhanterium adpressum* were collected from four different locations in the Algerian desert:

- 1. Laghouat,400 Km south of Algiers(38°48'00.00"N, 2°52'00.00"E);
- 2. Zelfana, 670 Km south of Algiers (32°23'46.70"N, 4°13'34.40"E);
- 3. Ouargla, 800 Km south-east of Algiers (31°57'46.72"N, 5°20'31.17"E);
- 4. El-Goléa, 900 Km south-west of Algiers (30°35'45.99"N, 2°52'54.73"E).

The freshly collected samples were dried at room temperature and away from light and humidity. The plant was then divided into two parts: the flowers and the stems. Each part was manually ground with a mortar.

Preparation of the fungal strain

We isolated *Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis* from a palm infected with Bayoud in the region of Ghardaia (Regional Station of Plant Protection- Ghardaia, South of Algiers). The Isolates were grown on PDA medium for 5-8 days at 25 °C. We then performed a series of successive purifications to obtain a pure mycelial mat. The fungal species was re-identified based on macroscopic characteristics in a solid medium culture, and the mycelial structure by microscopic observation.

Extraction and quantification of essential oils

Hydrodistillation was performed for the extraction of volatile compounds from the dried plant samples using a Clevenger type apparatus. The extraction process lasted 7 hours. We dried the obtained oils with anhydrous sodium sulfate. Afterwards we stored them at +4 °C until use.

The content of the essential oil, in percentage, is defined as the ratio between the mass of the extracted oil and the biomass of the plant. It is calculated by the following formula [11]:

$$T\% = (m_1/m_0) \times 100$$

- m₁: the essential oil mass in grams;
- \triangleright m₀: the mass of the treated plant material in grams;
- T: is the content of EO.

The content of the essential oil, in ml/kg, is defined as the amount of the extracted EO (ml) from a Kilogram of plant. This content is calculated by the formula [12]:

- > v: volume of the extracted EO (ml);
- m: the mass of plant material subjected to extraction (Kg);
- T': the content in EO expressed in ml/kg.

GC/MS analysis

A Varian CP-3800 gas chromatograph was used to analyse the extracted essential oils. It was equipped with a UB-Wax fused capillary column (60m × 0,32mm, film thickness of 0.25 μm) and flame ionization detector. The oven temperature was programmed from 50 to 250°C at a rate of 3°C/min, then maintained on 250°C for 10 min. The carrier gas was Helium at a flow rate of 1ml/min (constant flow). The retention indices of constituents were calculated relative to C8-C25 alkane standards.

The analysis of the volatile constituents were run on an Agilent HP-6890 coupled to 5973 mass spectrometer. The fused-silica HP-5 MS capillary column (30 m 0.25 m; film thickness 0.25 μ m) was directly coupled to the MS, provided with quadrupole detector (70 eV). Helium as carrier gas (1ml/min), column temperature was programmed from 60°C for 2 min, then increased gradually to 125°C for 2 min, and finally carried to 220°C for 2 min. The transfer line and injector temperatures were fixed to 220 and 250°C, respectively. 1 μ l of diluted oil in ethanol solution (1:100, v/v) was injected manually in a splitless mode.

The identification of the EO components was based on comparison of their RI (calculated in relation with series of linear alkanes) and mass spectra with those of authentic samples and/or the Wiley and NIST libraries spectra.

Antifungal activity assay

1/10th to 1/1500th dilutions of EO were prepared in an agar solution (2%). In tubes each containing

13.5 ml of sterile PDA medium (45° C), we added 1.5 ml of each dilution to obtain final concentrations ranging from 1/100 to 1/150000 (v/v). The tubes were then shacked and poured in petri plates. Witnesses, containing the medium and agar solution without EO, are prepared and used as a control. We inoculated the petri plates by putting an agar disc containing mycelium taken from the periphery of the thallus derived from a Fusarium culture of 7 days on PDA. A culture on PDA media without extract served as a control.

We incubated the cultures in the dark at 25 \pm 2 °C for 7 days. We determined the antifungal activity by comparing the mycelial growth after treatment, with the mycelial growth of the control, using the following equation [13]: I (%) = $(D_k-D_0/D_k) \times 100$

Where:

- D_k: diameter (mm) of the mycelial growth in the witness;
- > D₀: diameter of the mycelial growth in experience;
- > I: The rate of inhibition of mycelium growth (percentage).

Bioinformatics simulation

We performed the Simulation of the inhibitory activity with SimBiology of Matlab MathWorks. We created a model according to Nielsen et al. [14], modified and arranged with the overall conditions of this study. It is a sigmoid E_{max} PK/PD model, where E_{max} is the maximum effect possible (which refers to the minimal fungicide concentration: MFC). The MIC is the concentration that causes 50% of E_{max} which are related as [15]:

Effect = $(E_{max}.C^{\gamma})/(MIC^{\gamma}.C^{\gamma})$ Where:

- \triangleright C: the variation of extract concentrations from 0.5 to 10 µl/ml,
- > γ: the sigmoidicity factor, which defines the shape of the concentration-effect relationship.

The inhibition effect was included in this model as an additive part to the natural death rate of the fungi. Growth progress curves in the presence of different extracts concentrations were fitted to Boltzmann sigmoid function with Origin 8 Fit Sigmoidal Analysis, with which we can check the model results by obtaining parameters Stats. This model describes the concentration-effect relationship over a range of concentrations. With this model, we can establish and evaluate dose-concentration-response relationship, describe and predict the effect time courses resulting from extract dose.

Results and Discussion

Quantification and identification of extracted essential oils

After the extraction of EO from different samples, quantification of these obtained oils (Table 01) enabled analysis of different yields between regions and extraction parts. More or less close contents between extraction parts (1.5 to 4 ml/kg) were influenced by environmental parameters of the collection regions. The average value of the highest content of EO is that of the region of Zelfana (4.00 ml/kg for the flowers), while this region has the same contents in the stems with the region of El-Goléa to which the contents of Ouargla samples are morecloser, Moreover, we found

a distinct difference in

the content of EO_from the stems and flowers for the sample of Laghouat. The dependence between flowers yields with those of stems has not been reported, so this difference or similarity is highly variable from one species to another [16, 17].

Chemical composition of essential oils of *Rhanterium adpressum* has been determined using gas chromatography coupled to mass spectrometry GC/MS. This analytical method has allowed us to identify a total of forty-two chemical components (Table 2).

The EO Samples are qualitatively close to each other (Table 02), insofar as they are all characterized by the same dominant compounds. Components present in the majority percentages of *Rhanterium adpressum* EO are: α -Pinene (3.99 to 14%), Camphene (from 3.18 to 11.75%), β -Myrcene

(3.55 to 13.4%), Linalool (from 3.96 to 11.12%), α -Terpinene (3,48 to 13.5%), bicyclo-germacrene (1.47 to 6.69%), α -cadinol (1.12 to 7.96%), α -eudesmol (1.02 to 5.78%) and β -Eudesmol (from 3,12 to 7.71%). Other components present in lesser amounts have been identified, namely; β -pinene (1.88 to 3.66%), sabinene (1.62 to 4.7%), limonene (1.47 to 2, 73%), terpinen-4-ol (1.79 to 4.79%),

geraniol (1.71 to 4.34%) and Spathulenol (1.01 to 2.06%). Significant recorded levels differ, more or less, with the results of other studies reflecting a remarkable variability influenced by region environment and the season of collection [5, 18, 19].

Overall, we can divide our essential oil to four classes of compounds (Figure 01):

- 1. Monoterpene hydrocarbons (10.8 to 43.72%) presented the highest percentages;
- 2. Oxygenated monoterpenes (12.11 to 30.32%) are less represented;
- 3. The lowest percentages are those of oxygenated sesquiterpenes (5.42 to 19.22%);
- 4. Sesquiterpene hydrocarbons (from 3.29 to 12.91%).

All of these compounds give this oil a strong odor, and characterized by a pleasant and yellowish- green color. The histogram shows that the samples are qualitatively close, regardless of the sampling site. However, the proportions of dominant components vary considerably from one region to

another and from one organ to another for the same region. This variation could be due to exogenous factors such as sunlight (climatic conditions of the sample collection season), photoperiod, temperature, nature and components of the soil, water, altitude, as well as endogenous factors such as the physiology of the plant and the insects and microorganisms may also influence the composition of EO [20].

Antifungal activity results

From the results (Figure 02), we can notice that Fusarium oxysporum f. sp. albedinis is sensitive towards Rhanterium adpressum EO, for all tested samples. We can also notice that with the increase of the concentration of EO, colony diameter decreases up to a lack of germination disk (MIC). Moreover, the MIC will vary slightly between EO samples especially for stems extracts. They seem to have the same tendency. It is noteworthy, that the essential oil acts on the mycelial growth. Figure 02 clearly elucidates the activity of essential oils at different doses on Fusarium oxysporum f. sp. albedinis. We noticed that the antifungal potency of the different samples of EO varies little according to the sampling area. The same observation was made for extracts of stems and flowers. The inhibition percentages of our oils vary from 84.5 to 92.4%. We noticed in the case of Laghouat and Zelfana, flowers EO of Zelfana showed low activity compared to those of Ouargla. While the sample of Laghouat showed significant activity despite its chemical components percentages is fairly low compared to other EO samples, a fact which recalls the very important biologic role of minority chemical compounds in essential oils which might act synergistically [21, 22, 23]. However, by comparing the activity of EO of Laghouat and Zelfana, we found that extracts from Laghouat have shown more important activities than those of Zelfana, despite the fact that the chemical components percentages of these are larger than those of Laghouat. The difference in activities between extracts from these two regions and even from the others reveals the presence of chemotypes in populations of R. adpressum [24, 25, 26]. Our results of antifungal activity showed a great antifungal power with low inhibitory and fungicide concentrations compared to other studies [27, 28, 29, 30, 31] on the same fungus. These studies tested other chemical components extracts from other plants, essential oils from various plant parts and/or regions. It is important to note that despite the variability in percentage of the chemical compounds and the differences in the samples inhibitory actions, this antifungal activity remains high.

Bioinformatics simulation results

With the results of fungal growth model in the presence of different extracts concentrations, we were able assess several parameters affecting the genetic composition of individuals. The attacks of growth rate, such as the growth constant (0,23 h⁻¹), The death constant (0,088 h^{-1}) and F_{max} (8 1014 CFU/ml) which is the fungal concentration in the system at stationary phase. Growth simulation Results of Fusarium oxysporum f. sp. albedinis in the presence of different extracts concentrations validated the results of the antifungal activity (Figure 03). In the case of stems extracts, we can notice a similar inhibitory effects ranging from concentrations of 1.8 to 2 μl/ml for the MIC (reducing the population to 3-1.5 107 according to simulation results) and Rates from 10 µl/ml for MFC for all the samples. In the case of floral extracts (Figure 03), we noticed a difference of inhibition action for the region and for the extracts part. The greatest inhibitions were recorded for the sample from the region of Ouargla, followed by El-Goléa, Laghouat and Zelfana. The interval of the CMIs is a little wider ranging from 0.5 to 2 µl/ml (reducing the fungal population to 6-2 107, noticing an accelerated decline starting from the CMIs for all regions). Fungicidal concentrations do not differ greatly from CMF of stems extracts.

The significant decrease of the growth of Fusarium oxysporum f. sp. albedinis with the increase of concentrations added to the culture media is completely dependent (Figure 04). Analysis of this figure confirms the previous results. We also noticed, in the case of the stem samples, a remarkable dependency between samples from all regions, which refers to slight differences previously shown. The significant inhibition of EO flowers samples was confirmed too, especially with the samples of Ouargla and Laghouat. The curves were perfectly fitted with Boltzmann function. Coefficients as R squared and adjusted R2 (0.99 for each) indicate that the regression line fits perfectly the data. This allows us to conclude that the predictive power of the model is strong. Starting from a concentration of 2 µl/ml, it appears that the antifungal activity differs less and less while approaching the concentration of 10 μl/ml in function of time. Indeed, with concentrations, the fungal population gets closer to a stationary phase where it gradually touches its limits. Testing the effect of other concentrations, such as 7 and 8

µl/ml, would be very important in studying the

behavior of *Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis* towards concentrations, only in this phase and according to time.

Conclusion

The study of essential oils from the aerial part of *Rhanterium adpressum* collected in four different composition and to evaluate their antifungal potential. This allowed us to make a comparative study. Our experimental results show that the difference in the composition of essential oils is probably related to bioclimatic zones from which the plant samples were collected (altitude, longitude, latitude and climate).

The bioactivity of our essential oils could be attributed to only majority compound, or to a synergy between the various components of the oil. Finally, we can say that the variable chemical composition of essential oils of *Rhanterium adpressum* could induce the observed antifungal properties. Moreover, this variation affects directly the antifungal activity of oils given the different percentages of chemical compounds it contains. Despite the composition variation, most extracts showed high percentages of inhibition.

A bioinformatics simulation confirmed the *Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis* sensitiveness toward the essential oils of this plant. According to our results, it would be very interesting to know the action mode of our oils and the molecular level at which they operate. It would also be interesting to study the synergistic mechanism of their minority components.

References

- Foureau F. Essai de catalogue des noms arabes et berbères de quelques plantes, arbustes et arbres algériens et sahariens, Challamel A. Paris. 1896; P43.
- Battandier J. A. & Trabut L. C. Flore analytique et synoptique de l'Algérie et de la Tunisie, Vve Giralt, Imprimeur-Editeur. Rue des Colons, 17, Mustapha, Alger. 1905; P175.
- 3. Boussoussa H., Khacheba I., Djeridane A., Mellah N. & Yousfi
- M. Antibacterial activity from Rhanterium adpressum flowers extracts, depending on seasonal variations. Ind Crops and Prod 2016;83: 44-47.
- Boussoussa H., Hamia C., Djeridane A., Boudjeniba M. & Yousfi M. Effect of different Solvent Polarity on Extraction of Phenolic Compounds from Algerian *Rhanterium adpressum* Flowers and their Antimicrobial and Antioxidant Activities. Cur Chem Biol 2014;8(1):43-50.
- Hamia C., Gourine N., Boussoussa H., Saidi M., Gaydou E. M. & Yousfi M. Chemical composition and antioxidant activity of the essential oil and fatty acids of the flowers of *Rhanterium adpressum*. Nat prod comm 2013; 8:1171-1174.
- Fernandez D., Lourd M., Ouinten M., Tantaoui A. & Geiger J.P. Le Bayoud du palmier dattier; une maladie qui menace la phaeniciculture. Phytoma: La Défense des végétaux 1995; N° 469.
- Kettout T. A. A. & Rahmania F. Contribution à l'étude de l'activité toxique de Fusarium Oxysporum f. sp. Albedinis, agent causal du Bayoud. Alg J Arid Env 2013;3(1):68-81.
- 8. Tantaoui A., Ouinten M., Geiger J. P. & Fernandez D. Characterization of a single clonal lineage of *Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis* causing Bayoud disease of date palm in Morocco. Phytopathology 1996;86(7):787-792.
- Fernandez D., Ouinten M., Tantaoui A., Geiger J. P., Daboussi M.
 J. & Langin T. Fot 1 insertions in the Fusarium oxysporum f. sp. albedinis genome provide diagnostic PCR targets for detection of the date palm pathogen. App env microb 1998;64(2):633-636.
- 10. Djerbi M. Bayoudh disease in North Africa: history distribution, diagnosis and control. Date Palm Journal 1982; 1:153-197.
- 11. Carré P. précis de technologie et de chimie industrielle. Tome 3. Ed. Ballière J.B. et fils. France. Paris 1953.
- 12. Hilan C., Sfeir R., Jawish D. & Aitour S. Huiles essentielles de certaines Plantes médicinales libanaises de la Famille des lamiaceae. Leb Sci J 2005;7(2):13.
- 13. Chang S. T., Wang S. Y., Wu C. L., Su Y. C., & Kuo Y. H. Antifungal compounds in the ethyl acetate soluble fraction of the extractives of Taiwania (*Taiwania cryptomerioides* Hayata) heartwood. Holzforschung 1999;53(5), 487-490.
- 14. Nielsen E. I., Viberg A., Löwdin E., Cars O., Karlsson M. O. & Sandström M. Semimechanistic pharmacokinetic/pharmacodynamic model for assessment of activity of antibacterial agents from time-kill curve experiments. Antim agents chemoth 2007;51(1):128-136.
- Meibohm B. & Derendorf H. Basic concepts of pharmacokinetic/pharmacodynamic (PK/PD) modelling. Intern j clin pharmac therap 1997; 35:401-13.
- 16. Baser K. H. C. & Buchbauer G. Handbook of essential oils: science, technology, and applications. CRC Press. NW 2009; P65.
- 17. Manhães A. P., Veiga-Júnior V. F. D., Wiedemann L. S. M., Fernandes K. S. & Sampaio, P. D. T. B. Biomass production and essential oil yield from leaves, fine stems and resprouts using pruning the crown of *Aniba canelilla* (HBK)(Lauraceae) in the Central Amazon. Acta Amazonica 2012;42(3):355-362.
- Bouheroum M., Benayache S. F., Benayache L., Zaiter J., Barrera M. & Francisco1 L. Terpenoids and triynepoxide from theaerial part of Rhantherium adpressum. Chem Nat Comp

- 2007; 43:110-111.
- 19. Kala A., Gherraf N., Belkacemi D. & Ladjel S. Composition of the essential oil of *Rhanterium adpressum* Coss. and Durieu. from Algeria. Sch Res Lib 2009; 1:115-118.
- 20. Hüsnü Can Baser K. & Buchbauer G. Handbook of essential oils science, technology, and applications. CRC Press 2010; P994.
- 21. Lahlou M. Methods to study the phytochemistry and bioactivity of essential oils. Phytother. Res 2004; 18:435-448.
- 22. Burt S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. Intern j food microb 2004;94(3):223-253.
- 23. Kheyar N., Meridja D. & Belhamel K. Etude de l'activité antibactérienne des huiles essentielles de *inula viscosa*, *Salvia officinalis* et *Laurus nobilis* de la région de Bejaia. Alg j nat prod 2014;2(1):18-26.
- 24. Zhang X. R., Wang J. B., Xiao X. H., Liu T. S., Chu X. H., Zhou C. P. & Jin C. Antimicrobial activity and chemical differences between the two chemotypes of rhubarbs. Yao xue xue bao, Acta pharmaceutica Sinica 2010;45(9):1144-1148.
- Matsuzaki Y., Tsujisawa T., Nishihara T., Nakamura M. & Kakinoki Y. Antifungal activity of chemotype essential oils from rosemary against *Candida albicans*. Op J Stom 2013;3: 176-182.
- Schmidt E., Wanner J., Hiiferl M., Jirovetz L., Buchbauer G., Gochev V., Girova T., Stoyanova A. & Geissler M. Chemical composition, olfactory analysis and antibacterial activity of *Thymus vulgaris* chemotypes geraniol, 4-thujanol/terpinen- 4-ol, thymol and linalool cultivated in southern France. Nat prod comm 2012;7(8):1095-1098.
- 27. Boulenouar N., Marouf A., Cheriti A. & Belboukhari N. Medicinal Plants Extracts as Source of Antifungal Agents against *Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis*. J Agr Sci Tech 2012;14(3):659-669.
- 28. Zebboudj N., Yezli W., Hamini-Kadar N., Kihal M. & Henni J.
- E. Antifungal activity of lactic acid bacteria against *Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis* isolated from diseased date palm in South Algeria. Intern J Biosci (IJB) 2014;5(9):99-106.
- 29. Loth M., Meddah B., Tir Touil A., Len C. & Verstraete W. Antifungal activity of synthesized dithiocarbamate derivatives on *Fusarium oxysporum* f sp. *albedinis* in Algeria. J Chem Pharm Res 2015;7(10):49-54.
- Kettout T. A. A., Gaceb-Terrak R. & Rahmania F. The Effect in vitro of Flavonoid Aglycones Extracts from Roots of Date Palm Cultivars on *Fusarium oxysporum* F. Sp. *Albedinis*. Intern J Biol Biom Agric Food and Biotech Eng 2013;7(9):906-908.
- 31. Boulenouar N., Marouf A. & Cheriti A. Effect of some poisonous plants extracts on *Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis*. J Biol Sci 2009;9(6):594-600.

Table 1. The variation of essential oils content for different samples.

Content in % (m/m) Content (ml/Kg) Stems 0,22 Laghouat 2,50 0,11 1,25 Flowers Ouargla Stems 0,18 2,00 Flowers 0,20 2,25 Zelfana Stems 0,28 3,25 0,35 4,00 Flowers El-Goléa 0,29 3,25 Stems 0,20 2,25 Flowers

Table 2. Chemical composition of essential oils of *Rhanterium adpressum* in the regions of Laghouat, Ouargla, Zelfana and El-Goléa.

Composition (%)										
Ν°	Constitute		Laghouat Ouarg					El-Goléa		LRI*
		Stems	Flowers	Stems	Flower	Stems	Flowers	Stems	Flowers	
1	α-pinene	3,99	3,3	6,06	6,64	4,54	7,47	9,05	6,92	1033
2	Camphene	3,18	0,75	7,59	5,71	4,31	6,55	1,8	0,49	1074
3	β- pinene	1,17	0,57	2,82	1,67	1,19	2,08	3,15	1,88	1117
4	Sabinene	1,62	0,51	3,02	0,82	0,88	0,59	4,47	2,14	1131
5	β- myrcene	4,25	3,23	3,98	4,17	10,49	3,04	13,38	11,37	1179
6	α-Terpinene	0,15	0,08	0,37	0,23	-	0,4	0,53	0,21	1202
7	Limonene	0,89	0,56	1,67	1,63	1,5	2,63	1,9	1,47	1220
8	γ- terpinene	0,34	0,21	0,75	0,55	-	0,76	1,04	0,13	1264
9	p-Cymene	0,16	0,21	1,3	1,52	-	0,6	0,71	0,9	1292
10	α- terpinolene	0,24	0,19	0,38	0,29	-	-	0,53	0,46	1302
11	Linalool	9,06	4,28	11,12	4,95	10	6,94	3,96	1,02	1577
12	β- caryophyllene	0,36	0,88	-	0,59	-	0,44	0,43	1,42	1625
13	Terpinene-4-ol	2,35	2,44	0,2	3,14	1,79	4,09	4	4,8	1638
14	α- humulene	0,68	1,27	0,5	1,63	-	0,63	0,22	0,49	1658
15	α- amorphene	0,23	0,26	-	0,33	-	0,2	0,22	0,16	1675
16	1,8 menthadien-4,ol	0,23	0,5	-	0,24	-	0,14	0,1	0,77	1718
17	Gérmacrene D	0,49	0,57	0,4	1,24	0,66	1,32	0,47	0,49	1726
18	α-Terpineol	7,33	4,36	6,11	4,29	13,5	7,76	7,08	3,48	1737
19	Bicyclo-germacrene	2,76	5,51	0,53	1,47	1,17	2,83	1,68	6,69	1741
20	δ- cadinene	1,15	1,18	0,45	0,65	1,63	2,19	0,4	1,09	1766
21	Nerol	0,3	0,27	0,32	0,6	0,69	0,2	0,13	0,16	1822
22	Germacrene B	0,75	0,65	1,47	-	1,29	0,76	0,57	0,38	1840
23	Trans-carveol	0,3	0,38	´ -	0,31	´ -	0,13	0,1	0,14	1864
24	p-cymene 8 ol	0,35	0,53	-	0,65	-	0,74	0,23	0,41	1878
25	Geraniol	4,02	2,01	-	2,41	4,34	2,09	1,71	0,78	1888
26	Napthalene	0,63	0,62	-	0,59	0,68	0,78	0,72	0,57	1894
27	Trans β- ocimene	0,28	0,31	-	0,4	´ -	0,22	0,14	0,18	1959
28	Caryophyllene oxide	0,37	0,39	0,23	0,68	_	0,41	0,56	0,19	2031
29	Trans-2-carene	0,73	0,88	0,19	0,29	_	0,46	0,12	0,36	2041
30	Methyl eugenol	0,26	0,14	0,41	0,78	_	0,69	0,53	1,66	2061
31	Globulol	0,49	0,43	0,24	0,24	-	-	0,61	0,31	2090
32	Viridiflorole	0,6	0,41	0,26	0,43	_	0,28	0,43	0,63	2104
33	p-cymene α- ol	0,32	0,46	-	-	_	-	0,2	0,55	2111
34	Spathulenol	1,01	1,97	0,89	_	1,69	0,14	0,77	1,56	2123
35	Bisabolol oxyde	-,01		0,27	_		1,61	-	-	2126
36	Dihydro-cis -α- 8, ol	0,25	0,48	0,19	0,35	_	0,41	0,2	0,5	2153
37	α- cadinol	-	3,53	7,19	5,31	7,96	[,	5,06	2,24	2173
38	Isospathulenol	0,41	0,43	0,28	0,3	- ,50	0,23	0,15	0,74	2247
39	α- eudesmol	0,41	0,43	5,78	5,14	5,02	0,23	0,24	0,74	2275
40	β- eudesmol	4,97	5,25	4,56	6,34	3,53	2,9	0,24	5,33	2284
41	Myristic acid	0,73	0,2	0,73	0,54	0,81	0,32	0,20	0,38	2764
42	Palmitic acid	0,73	3,86	0,73	1,36	0,81	0,32	0,32	1,93	2962

Compositions percentages were obtained by FID peak-area normalization.

^{*}LRI: is the linear retention indices relating to homologous series of n-alkanes C8-C30 obtained on UB-Wax column.

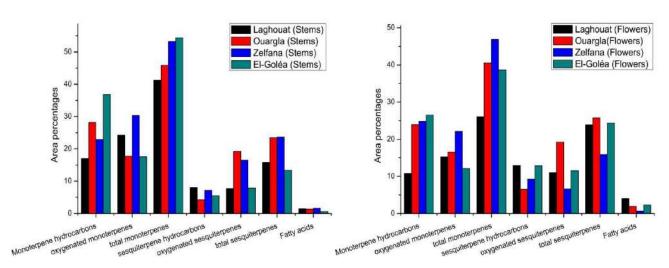


Figure 1. The variation of contents of different chemical classes by region and extraction part.

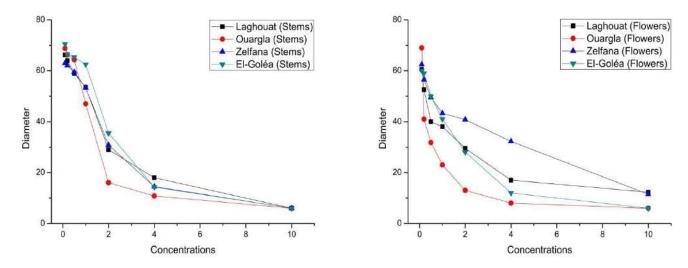


Figure 2. Presentation of *Rhanterium adpressum* EO effect on diameter (mm) of the mycelial colonies of *Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis*.

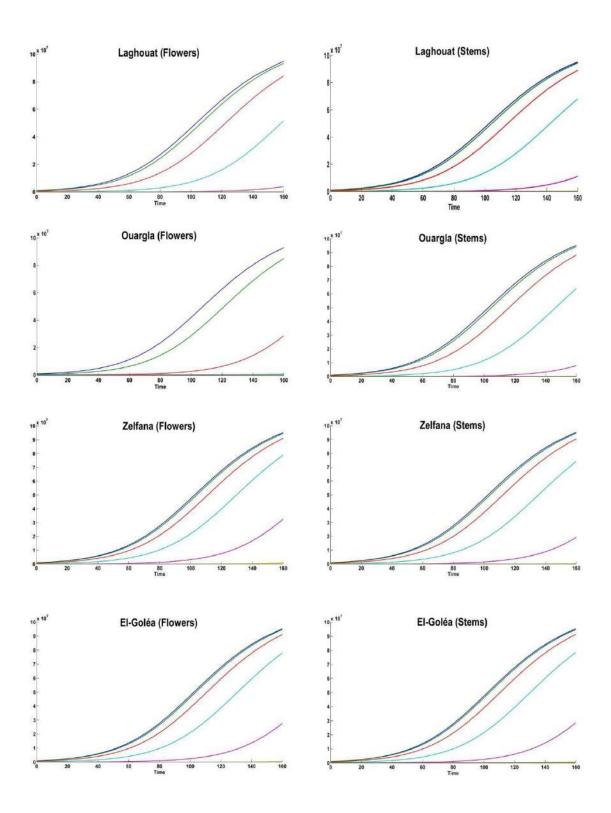


Figure 3. Growth simulation progress of Fusarium oxysporum f. sp. albedinis in the presence of different extracts concentrations (0.1 μ l/ml).

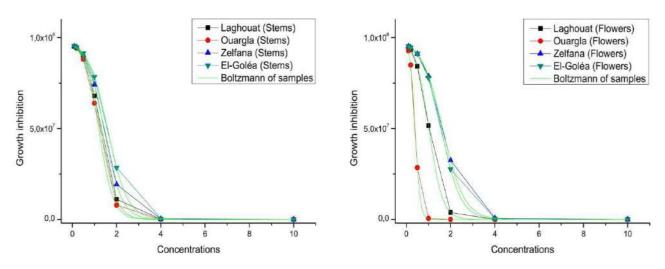


Figure 4. Representation of the growth inhibition of *Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis* following increased concentrations depending the region and the extracts parts.