UNIVERSITE DE KISANGANI

FACULTE DES SCIENCES

DEPARTEMENT DE CHIMIE

B.P.2012

KISANGANI

CONTRIBUTION A L'ETUDE CHIMIQUE DE PLANTES A ACTIVITES PHYTOPATHOGENES ET ZOOPATHOGENES UTILISEES DANS LA REGION DE KISANGANI (R.D. CONGO).

Cas de *Croton hirtus* et *Cymbopogon giganteus*.

Par

Albert TADIMANDJA NDJEKA

Travail de fin d'étude, Présenté en vue de l'obtention de grade de Licencié en Sciences

Option : CHIMIE

Orientation : CHIMIE ANALYTIQUE

Directeur : P. O. Pius M'PIANA T.

Co-directeur : Dr. Jean-Trésor KWEMBE K.

Encadreur : Ass. Martin ASUMANI K.

Année académique : 2020-2021

DEDICACE

Je dédie ce travail à DIEU Tout Puissant.

Albert TADIMANDJA NDJEKA

REMERCIEMENTS

Au terme de ce travail de fin d'études qui a connu toutes sortes des difficultés le long de son parcours, nous resplendissons nos sourires comme pour chanter une parfaite victoire, car est-il dit « le plaisir de réussir sans peine vaut la peine de vivre sans plaisir », ainsi dit les principes de la vie. Néanmoins, l'honneur nous revient de présenter nos remerciements à Dieu le Père Tout Puissant car il est écrit « dans toutes les circonstances qui nous arrivent il faut Le remercier ».

Que nos sincères remerciements atteignent au Professeur Pius MPIANA (UNIKIN) et Docteur Jean-Trésor KWEMBE pour la direction de ce travail et à l'Assistant Martin ASUMANI pour son encadrement.

Je remercie également le chef de Département des Sciences Biotechnologiques, le Professeur Didy ONAUTSHU, pour m'avoir accepté au sein de leur laboratoire, qui m'a permis de réaliser certaines analyses de ce mémoire.

Notre remerciement s'adresse également à nos parents Albert TADIMANDJA NDJEKA et Marie-Claire ANKOSO LOMAME pour leurs sacrifices, moyens financiers et matériels mis à notre disposition, pour tous les efforts consentis depuis notre conception jusqu'à ces jours, qu'ils trouvent à travers cette œuvre les sentiments les plus différents. A nos tentes et oncles Rosie DJONGOMANGA, Bibiche SOMBO, Mamie ANEKOMBA NDJEKA, André LOMAME, Robert OMANDJI et les autres dont les noms ne sont pas repris en marge pour leurs soutiens.

Ainsi, je tiens à remercier les autorités Académiques et Administratives de l'université de Kisangani en général et celles de la faculté des Sciences en particulier de qui vient notre épanouissement. Notre remerciement s'adresse aux autorités et enseignants du département de chimie de qui vient en grande partie notre formation et leurs sages conseils qui nous ont fait prospérer. Je dis grand merci à tous nos camarades nos collègues de deuxième licence chimie organique et analytique avec qui nous formons cette promotion, BAHIZIRE, BANGATE, BONGINDA, ENESE, KASITU, LOLEKONDA, MOLISHO KATEMBO, NDARALE, SIFAYAO et SUMAILI. En fin nos remerciements s'adressent aussi à nos connaissances, CHANEL FUMBA, WANKANA WASOLA, RAMAZANI KUMINGA, SEMBAITO.

Albert TADIMANDJA NDJEKA

RESUME

Cette étude a porté sur l'évaluation de l'activité antifongique des huiles essentielles de *Croton hirtus* et *Cymbopogon giganteus*, vis-à-vis de souches fongiques phytopathogènes (*Lasiodiplodia theobromae* et *Paracercospora fijiensis*) et une souche zoopathogène (*Candida albicans*).

Ainsi la présence des groupes phytochimiques majeurs en occurrence les terpènes et stérols a été remarquée.

Après avoir confirmé la présence des terpènes et stérols, nous avons procédé à l'hydrodistillation afin d'extraire les huiles essentielles de nos deux plantes cités ci-dessus. Les feuilles séchées de *C. hirtus* et celles de *C. giganteus* ont donné des rendements différents en huile essentielle de l'ordre de 0,041 % pour les feuilles séchées de *C. hirtus* et 0,19 % pour les feuilles séchées de *C. giganteus*.

La chromatographie sur couche mince a été la méthode utilisée pour séparer les différentes fractions des huiles essentielles en utilisant une série de cinq systèmes d'éluants. L'hexane et le mélange d'hexane et d'acétate d'éthyle (1:1) ainsi que le mélange d'hexane et d'acétate d'éthyle (7:3) se sont révélés meilleurs éluants pour la séparation des différentes fractions des huiles essentielles de *C. hirtus* car ces trois systèmes ont donné comme spots des valeurs de rapport frontal 0,063 ; 0,198 ; 0,791 et 0,088 ; 0,265 ; 0,405 ; 0,822 et 0,196 ; 0,613 ; 0,810 et le mélange d'hexane et d'acétate d'éthyle (1:1) et acétate d'éthyle seul se sont révélés meilleurs éluants pour la séparation des différentes fractions de les huiles essentielles de *C. giganteus* car ces deux systèmes ont donné pour chacun deux spots des valeurs de rapport frontal 0,050 ; 0,303 et 0,215 ; 0,240.

Les huiles essentielles de *C. hirtus* et celles de *C. giganteus* ont présenté des capacités différentes à inhiber la croissance mycélienne des souches de *L. theobromae* et *P. fijiensis*.

L'huile essentielles de *C. hirtus* a été peu efficace sur la souche de *L. theobromae* soient 5 et 24,3 mm pendant 24 et 48 heures d'incubation, alors que celle de *C. giganteus* a montré une efficacité énorme à inhiber la croissance mycélienne soit 0 mm de diamètre sur cette souche après 48 heures d'observation. Cependant la croissance mycélienne sur la souche de *P. fijiensis* était de 0 ; 0,8 et 1 mm sur l'huile de *C. hirtus* respectivement après 24, 48 et 72 heures

d'incubation, tandis qu'il n'y avait aucune croissance mycélienne sur la souche de *P. fijiensis* sur l'huile essentielle de *C. giganteus* soit 0 mm après 72 heures d'observation.

En terme de PI, pour la souche de *L. theobromae* sur l'huile essentielle de *C. hirtus* a présenté un faible PI par rapport à celle de *C. giganteus* soient 64,28 et 51,4 % respectivement après 24 et 48 heures d'incubation alors que 100 et 100 % pour *C. giganteus.* Par ailleurs pour la souche de *P. fijensis* le PI était de 75 % après 72h d'incubation pour les huiles essentielles de *C. hirtus* et 100% pour les huiles essentielles de *C. giganteus*.

Les huiles essentielles de *C. hirtus* et de *C. giganteus* ont présentées aussi des actions inhibitrices différentes sur la souche de *C. albicans*.

Il y a eu un peu de résistance de la souche de *C. albicans* sur nos deux huiles essentielles avec des diamètres d'inhibitions allant de 3,33 et 8,16 mm respectivement sur *C. hirtus* et *C. giganteus*.

.

ABSTRACT

This study evaluated the antifungal activity of essential oils of *Croton hirtus* and *Cymbopogon* giganteus, against phytopathogenic fungal strains (*Lasiodiplodia theobromae* and *Paracercospora fijiensis*) and a zoopathogenic strain (*Candida albicans*).

Thus the presence of the major phytochemical groups, in this case the terpenes and sterols, has been noted.

After confirming the presence of terpenes and sterols, we proceeded to hydrodistillation in order to extract the essential oils from our two plants mentioned above. Dried leaves of *C. hirtus* and those of *C. giganteus* gave different essential oil yields of around 0.041% for dried leaves of *C. hirtus* and 0.19% for dried leaves of *C. giganteus.*

Thin layer chromatography was the method used to separate the different fractions of essential oils using a series of five eluent systems. Hexane and the mixture of hexane and ethyl acetate (1: 1) as well as the mixture of hexane and ethyl acetate (7: 3) were found to be the best eluents for the separation of the different C. hirtus essential oil fractions because these three systems gave as spots values of frontal ratio 0.063; 0.198; 0.791 and 0.088; 0.265; 0.405; 0.822 and 0.196; 0.613; 0.810 and the mixture of hexane and ethyl acetate (1: 1) and ethyl acetate alone proved to be better eluents for the separation of the different fractions of the essential oils of C. giganteus because these two systems gave for each two spots, frontal ratio values 0.050; 0.303 and 0.215; 0.240.

The essential oils of *C. hirtus* and those of *C. giganteus* showed different abilities to inhibit mycelial growth of strains of L. theobromae and P. fijiensis.

The essential oil of *C. hirtus* was not very effective on the strain of *L. theobromae*, namely 5 and 24.3 mm during 24 and 48 hours of incubation, while that of *C. giganteus* showed enormous effectiveness in inhibiting the mycelial growth, ie 0 mm in diameter on this strain after 48 hours of observation. However the mycelial growth on the *P. fijiensis* strain was 0; 0.8 and 1 mm on the oil of *C. hirtus* after 24, 48 and 72 hours of incubation, respectively, while there was no mycelial growth on the strain of *P. fijiensis* on the essential oil of *C. giganteus* or 0 mm after 72 hours of observation.

In terms of PI, for the strain of *L. theobromae* on the essential oil of *C. hirtus* presented a low PI compared to that of *C. giganteus*, i.e. 64.28 and 51.4% respectively after 24 and 48 hours

of incubation while 100 and 100% for *C. giganteus*. Furthermore, for the *P. fijensis* strain, the PI was 75% after 72 hours of incubation for the essential oils of *C. hirtus* and 100% for the essential oils of *C. giganteus*.

The essential oils of *C. hirtus* and *C. giganteus* also exhibited different inhibitory actions on the strain of *C. albicans*.

There was some resistance from the *C. albicans* strain on our two essential oils with inhibition diameters ranging from 3.33 and 8.16 mm respectively on *C. hirtus* and *C. giganteus*.

LISTE DES SIGLES ET ABREVIATIONS

AFNOR : Association Française De Normalisation ;

C.C.M : chromatographie sur couche mince ;

C. giganteus : *cymbopogon giganteus* ;

C. hirtus: *croton hirtus* ;

C.P.G: chromatographie en phase gazeuse ;

DM : diamètre d'inhibition ;

L. theobromae: *Lasiodiplodia theobromae;*

MRN: maladie de rein noire

PDA: Potato dextrose agar;

P. fijiensis : *paracercospora fijiensis* ;

PI : pourcentage d'inhibition.

Rf: rapport front ;

Rdt : rendement.

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Structure de l'acide gallique ...……. 6

Figure 2 : Structure de l'isoprène …….. 6

Figure 3 : Structure du cholestérol ……...…..…….. 7

Figure 4 : Structure de flavonoïde ……. 7

Figure 5 : Structure de 1,2-Benzol quinone ...…….……. 9

Figure 6 : Structure chimique de la 1,4-naphtol quinone …….……. 9

Figure 7 : Image de la plante de *C. hirtus* …….…….…….…….. 9

Figure 8 : Image de la plante de *C. giganteus* ……..…….……. 10

Figure 9 : Carte géographique de la ville de Kisangani …….…… 16

Figure 10 : Montage de l'hydrodistillation …….……...……. 20

Figure 11 : Souche de *L. theobromae* sur une boite Pétri, face inférieure (A) et face supérieure (B) .. 24

Figure 12 : Souche de *P. fijensis* sur une boite Pétri, face inférieur (A) et face supérieure (B) 25

Figure 13 : Rendements en huile essentielle des feuilles des plantes étudiées …...……..…….. 28

Figure 14 : Huile essentielle de *C. hirtus* à gauche et de *C. giganteus* à droite ...……... 29

Figure 15 : Croissance mycélienne des souches de *L. theobromae* sur l'huile essentielle de *C. giganteus* …..... 32

Figure 16: Croissance mycélienne de souche de *L. theobromae* sur huile essentielle de *C. giganteus* …… 33

Figure 17 : Croissance mycélienne de souche de *P. fijiensis* sur huile essentielle de *C. hirtus* …….. 34

Figure 18 : Croissance mycélienne de souche de *P. fijiensis* sur huile essentielle de *C. giganteus* … 35

Figure 19 Diamètres d'inhibition des huile essentielle de *C. hirtus* et *C. giganteus* sur la souche de *C. albicans* …… 36

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 :	Détection des groupes phytochimiques …….……	27
Tableau 2:	Qualités organoleptiques des huiles essentielles ……	29
Tableau 3 :	Quelques propriétés de l'acétate d'éthyle synthétisé ……	29
Tableau 4 :	Valeurs Rf obtenues de la CCM avec l'éluant acétate d'éthyle 100 % ……	30
Tableau 5 :	Valeurs Rf obtenues de la CCM avec l'éluant éthanol 100 % ……	30
Tableau 6 :	Valeurs Rf obtenues de la CCM avec l'éluant hexane 100 % ……	30
Tableau 7 :	Valeurs Rf obtenues de la CCM avec l'éluant hexane et acétate d'éthyle (1:1) …	31
Tableau 8:	Valeurs Rf obtenues de la CCM avec l'éluant hexane et acétate d'éthyle (7:3) …	31

TABLE DES MATIERES

DEDICACE……...i
REMERCIEMENTS……....ii
RESUME……....iii
ABSTRACT……v
LISTE DES SIGLES ET ABREVIATIONS…….....vii
LISTE DES FIGURES…….....viii
LISTE DES TABLEAUX…….....ix
INTRODUCTION……1
CHAPITRE I: REVUE DE LA LITTERATURE 4
I.1. PLANTES MÉDICINALES 4
I. 2. PHYTOTHÉRAPIE 4
I.3. PRINCIPES PHYTOCHIMIQUES 5
I.4. DESCRIPTIONS DES PLANTES ÉTUDIÉES..... 8
I.4.1. *CROTON HIRTUS*..... 8
I.4.1.1. Etude botanique..... 8
I.4.1.2. Distribution par Habitat..... 9
I.4.1.3. Utilisation thérapeutique en médecine traditionnelle..... 9
I.4.2. *CYMBOPOGON GIGANTEUS*..... 10
I.4.2.1. Etude botanique..... 10
I.4.2.2. Distribution par habitant..... 10
I.4.2.3. Utilisation thérapeutique en médecine traditionnelle..... 11
I.5. HUILES ESSENTIELLES..... 11
I.6. TYPE DES MICROORGANISMES CIBLES..... 13
I.6.1. Microorganisme zoopathogène 13
I.6.2. Microorganismes phytopathogènes..... 14
CHAPITRE II : MATERIEL ET METHODES……..16
II.1. MILIEU D'ETUDE 16
II.2. MATERIEL..... 17
II.2.1. Plantes utilisées 17
II.2.2. Souches fongiques utilisées..... 17
II.3. METHODES 17

II.3.2. Hydrodistillation 20
II.3.2.1. Principe d'hydrodistillation des plantes aromatiques 20
II.3.3. Chromatographie sur couche mince 21
II.3.4. Evaluation de l'activité antifongique des huiles essentielles 23
II.3.4.1. Evaluation de l'activité antifongique phytopathogène 23
II.3.4.2. Evaluation de l'activité antifongique zoopathogène 26
CHAPITRE III : RESULTATS ET DISCUSSION 27
III.1. SCREENING CHIMIQUE 27
III.2. Rendement en huile essentielle 28
III.3. Organoléptiques des huiles essentielles 29
Tableau 2 : Qualités organoleptiques des huiles essentielles 29
III.4. CHROMATOGRAPHIE SUR COUCHE MINCE 30
III.4.1. Les Rf des CCM des huiles essentielles 30
III.5. EVALUATION DE L'ACTIVITÉ ANTIFONGIQUE DES HUILES ESSENTIELLES 31
BIBLIOGRAPHIE 40
ANNEXES

INTRODUCTION

1. PROBLÉMATIQUE

Plusieurs données sur les plantes médicinales ont permis d'une part d'expliquer leur action thérapeutique et d'autre part de confirmer leurs utilisations en médicine traditionnelle. Comme les compostions chimiques des huiles essentielles de nombreuses plantes ont jusque-là été réalisées. Cependant, très peu de données existent sur leurs propriétés biologiques. Or, les huiles essentielles sont connues pour leurs nombreuses propriétés biologiques, plus particulièrement leurs activités antifongiques (Toure, 2015).

Les candidoses représentent les infections fongiques les plus fréquentes en pathologie humaine, et ont vu leur localisation se diversifier. *C. albicans* reste l'espèce la plus fréquemment rencontrée. Bien qu'on dispose aujourd'hui de médicaments antifongiques, le traitement des mycoses reste difficile d'une part du fait du nombre limité de principes actifs réellement efficaces et de leur coût très élevé et d'autre part lié à l'émergence de souches résistantes à certains antimycosiques usuels (Khalid, 2013).

La pourriture brune des cabosses est l'une des maladies la plus répandue chez les espèces *T. cacao.* Elle provoque des pertes des productions importantes estimées à 30 % à l'échelle mondiale (Lass, 1985). La pourriture brune des cabosses, curieusement dénommée «black pod» par les auteurs anglophones est la plus répandue de toutes les maladies du cacaoyer (Ploetz, 2016). Les agents responsables sont du genre Phytophthora, qui peuvent infecter tous les organes du cacaoyer (Acebo-Guerrero *et al*., 2011).

Dans la ville de Kisangani, la banane est le 3ème produit consommé après le riz et le manioc. Cependant la culture de bananiers plantains et autres bananiers (doux, textiles) est menacée par les attaques des champignons notamment la cercosporiose noire ou la maladie des raies noires(MRN) (Meredith et Lawrence, 1970 ; Jones, 2000) qui est causée par le champignon ascomycète appelé *P. fijiensis* (Carlier, 2000).

Ces différentes difficultés ont suscité notre intérêt d'utiliser les substances naturelles extraites des plantes aromatiques et médicinales, en l'occurrence les huiles essentielles pour évaluer leurs activités antifongiques.

Face à cette problématique, quelques questions méritent d'être posées :

a. Ces plantes Contiendraient-elles certains groupes phytochimiques majeurs tels que les terpènes et stérols ?
b. Quelles seraient les profils physico-chimiques des huiles essentielles de ces plantes ?
c. Les huiles essentielles de ces plantes, posséderaient-elles une activité antifongique ?

2. HYPOTHESES

- Etant donné que les plantes étudiées sont utilisées dans la médecine traditionnelle, nous supposons qu'elles contiendraient certains groupes phytochimiques majeurs notamment les terpènes et stérols ;
- Les huiles essentielles extraites de ces plantes auraient des qualités physico-chimiques différentes ;
- Ces huiles essentielles posséderaient des activités antifongiques phytopathogènes et zoopathogènes.

3. OBJECTIFS

❖ **Objectif général**

Le présent travail a pour objectif principal de contribuer à l'étude chimique des huiles essentielles de *Croton hirtus* et *Cymbopogon giganteus* plantes à activités antifongiques utilisées dans la région de Kisangani (R.D. CONGO).

❖ **Objectifs spécifiques**

Pour y parvenir tout au long de notre travail, les objectifs spécifiques suivants ont été assignés :

- Déterminer les groupes phytochimiques majeurs des plantes étudiées;
- Extraire et évaluer les paramètres physico-chimiques des huiles essentielles contenues dans ces plantes;
- Evaluer l'activité antifongique des huiles essentielles des plantes étudiées sur les souches phytopathogènes et zoopathogènes.

4. INTERET DU TRAVAIL

Ce présent travail trouve son intérêt :

- Sur le plan scientifique : approfondir les connaissances sur l'activité antifongique des huiles essentielles ;
- Sur le plan environnemental : valoriser les ressources de la biodiversité de la RDC ;
- Sur le plan industriel ou cosmétique : utilisation des arômes naturelles à base des plantes ;

- Sur le plan pharmaceutique : les résultats de notre recherche vont constituer une voie exploratoire pour les pharmaciens dans la découverte de nouvelles molécules aux vertus curatives pouvant lutter contre les maladies fongiques.

5. TRAVAUX ANTERIEURS

- LUKA (2000) : « Extraction et détermination de quelques paramètres physico- chimique et groupe physico-chimiques de l'huile essentielle de Cananga Odorata (Ylang-Ylang).
- M. TOURE Daouda (2014): Etudes chimique et biologique des huiles essentielles de quatre plantes aromatiques médicinales de côte d'ivoire.
- MOLISHO KATEMBO Merveil (2019): «Screening chimique, extraction et évaluation de l'activité antibactérienne de l'huile essentielle de Zingiber officinale vendu sur le marché de Kisangani».
- MWAMBALI (2020) : «Contribution A L'étude Chimique Et Evaluation De L'activité Antifongique Des Huiles Essentielles Sur La Souche De *Lasiodiplodia Theobromae.* Cas De *Ageratum Conyzoides Et Cymbopogon Citratus* Dans La Ville De Kisangani (Rd Congo) ».
- SIBATU (2020) : Evaluation *in vitro* de l'activité antifongique des huiles essentielles sur les souches de lasiodiplodia theobromae dans la région de Kisangani (R.D Congo)

6. SUBDIVIDISION DU TRAVAIL

A l'exception de l'introduction et conclusion, le présent travail comporte trois chapitres entre autres :

- Chapitre I : Revue de la littérature
- Chapitre II : Matériel et méthodes
- Chapitre III : Résultats et discussion.

CHAPITRE I: REVUE DE LA LITTERATURE

I.1. PLANTES MÉDICINALES

Depuis des siècles, l'homme a utilisé les plantes dans plusieurs domaines, tels que la parfumerie, la pharmacologie et l'agroalimentaire, grâce à leurs propriétés découvertes par hasard. Les plantes produisent un grand nombre de composés, dont, il n'y a pas très longtemps, on ne connaissait pas le rôle pour la plante. Ces composés ne sont pas produits directement lors de la photosynthèse mais résultent de réactions chimiques ultérieures, d'où le nom de métabolites secondaires.

C'est après le développement de la chimie que les huiles essentielles extraites de plantes commencent à livrer leurs secrets et leurs composants principaux ont été identifiés. Actuellement, plus de 100 000 substances sont connues. (N. Malo, 1991). Des recherches récentes ont montré que bon nombre d'entre elles ont un rôle défensif pour les plantes. (R. Anton et Al, 2005)

I. 2. PHYTOTHÉRAPIE

La phytothérapie désigne le traitement thérapeutique fondé sur les extraits de plantes et les principes actifs naturels dans le but de guérir, soulager ou prévenir une maladie.

Il existe différents types de phytothérapie dans lesquels on peut citer :

- Aromathérapie : est une thérapeutique qui utilise les extraits aromatiques de plantes (essences et ou huiles essentielles), ce sont des produits complexes à utiliser souvent à travers la peau.
- Gemmothérapie : est une thérapeutique qui utilise les extraits alcooliques des tissus embryonnaires végétaux en croissance tel que jeunes pousses, bourgeons et les radicelles.
- Herboristerie : consiste dans la préparation et la commercialisation de plantes médicinales ou de préparations dérivées. La préparation repose sur des méthodes simples, le plus souvent à base d'eau : décoction, infusion, macération.
- Phytothérapie pharmaceutique : utilise des produits d'origines végétales obtenus par extraction et qui sont dilués dans de l'alcool éthylique ou un autre solvant. Après transformation chimique, les plantes sont vendues sous forme de tisanes, de liquide, de sachets, ou de gélules (in Kadilu, 2019).

I.3. PRINCIPES PHYTOCHIMIQUES

I.3.1. Définition d'un principe actif

Le ou les principes actifs d'une plante sont des composants naturellement présents dans cette plante ; ils lui confèrent son activité thérapeutique. De nombreux médicaments renferment des principes actifs extraits des plantes (BOKOTA, 2012).

I.3.2. Types des principes actifs

Les groupes phytochimiques sont nombreux, mais on peut citer les principaux : les alcaloïdes, les anthocyanes, les bases puriques, les colorants, les coumarines, les enzymes, les flavonoïdes, les hétérosides anthracéniques (anthracénosides), les hétérosides cardiotoniques, huiles essentielles, les mucilages, les oligo-éléments, les pectines, les pigments, les polysaccharides, les saponosides, les stéroïdes, les tannins, les vitamines, (BOKOTA, 2012).

I.3.2.1. Alcaloïdes

Ce sont des substances d'origine biologique et le plus souvent végétale (il n'en existe que des rares représentants dans le règne animal), éventuellement reproductibles par synthèse, azotées, de réactions alcalines plus ou moins prononcées et douées à faible dose de propriétés pharmacodynamiques marquées. Leurs noms se terminent toujours par « ine » (Bruneton, 2009). Les alcaloïdes sont généralement extraits de plantes et appartiennent à quatre familles botaniques (Bruneton, 2009):

- Papavéracées
- Papilionacés
- Renonculacées
- Solanacées

I.3.2.2. Tanins

Ces sont des composés phénoliques hydrosolubles qui présentent, à cause de réaction classiques des phénols, la propriété de précipiter les alcaloïdes, la gélatine et d'autres protéines (Makambo, 2007). Le tanin est le nom générique des substances végétales de nature colloïdale, d'odeur spéciale, de saveur astringente, possédant la propriété de précipiter l'albumine de ses solutions, ainsi que divers alcaloïdes, de membre imputrescibles les peaux (tonnage, transformation en cuir).

Ils sont classiquement répartis en deux groupes :

- Les tanins condensés ou catéchiques. Ils sont très résistants à l'hydrolyse et forment un groupe important de composés phénoliques provenant de la condensation de molécules de flavonoïdes.
- Les tanins hydrolysables ou tanins de type pyrogallol est un type de tanin qui, lors d'un chauffage avec des acides chlorhydriques ou sulfuriques, donne des acides galliques (Makambo, 2007).

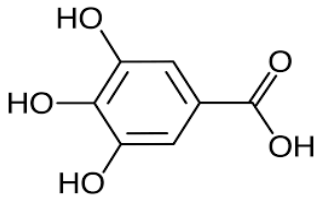


Figure 1. Structure de l'acide gallique

***II.3.2.3*. Terpènes**

Ils constituent entre autres le principe odoriférant des végétaux. Cette odeur est due à la libération des molécules très volatiles contenant 10, 15, 20 atomes de carbones. Extraites, ces molécules sont employées comme condiment (girofle) ou comme parfum (rose, lavande). Nombre d'entre eux possèdent des propriétés antiseptiques, d'où divers emplois dont l'embaument qui est resté dans le terme balsamique donné aux plantes et aux huiles qui en sont tirées (Bruneton, 2009).

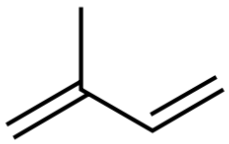


Figure 2. Structure de l'isoprène

***I.3.2.4*. Stéroïdes**.

Abondant dans les végétaux et les animaux, ils comportent généralement des méthyles en C-10 et C-13 et souvent une chaîne alkylée en C-17 dans leurs structures. Les Stérols comportent un hydroxyle en position C-3. Comme exemple on peut citer : Le cholestérol et les hormones stéroïdiques (testostérone, Progestérone, Estrone, Cortisone) (Bruneton, 2009).

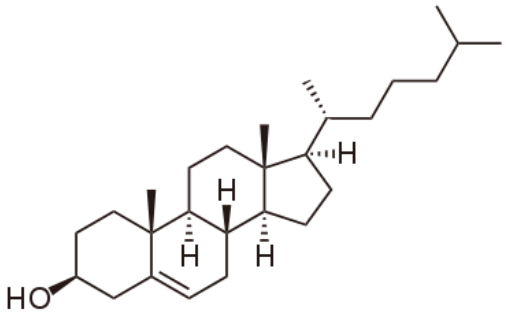


Figure 3. Structure du cholestérol.

I.3.2.5. Saponines

On entend par saponines ou saponosides (lat. sapon, savon -saponaire, l'herbe à savon ; le réglisse ; le bouillon blanc ; le modène), des hétérosides naturels dont la matière est un composé soluble à l'eau qui la rend moussante comme une eau de savon. Ils modifient la tension superficielle de l'eau. On les emploie pour la fabrication d'émulsions, dans lesquelles une substance insoluble est mise en dispersion (Bruneton, 2009).

I.3.2.6. Flavonoïdes

Ils entrent dans la composition de nombreux pigments végétaux et en particulier les pigments jaune et orange (calendula) et aussi dans les pigments bleus (le bleuet, grand antispasmodique de la face et surtout des yeux). Les plantes qui contiennent des flavonoïdes sont souvent liées à la fonction antispasmodique (Bruneton, 2009).

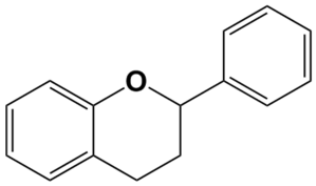


Figure 4. Structure de flavonoïde

I.3.2.7. Quinones

Ce sont des compositions oxygénées aromatiques obtenus par oxydation des diphénols aromatiques. Ici deux hydrogènes du noyau sont substitués par deux atomes d'oxygène. On distingue 2 types de quinones :

a) Quinone nono cyclique : qui se trouve à l'état stable que sous forme de para ou ortho – Benzol quinone.

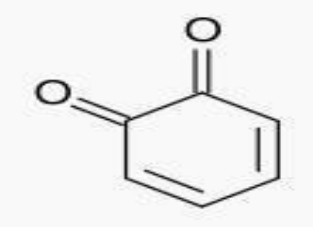


Figure 5. Structure de de 1,2-Benzol quinone

b) Quinone di cyclique qui porte souvent de groupements phénols et sont représentés par plusieurs types de principes actifs.

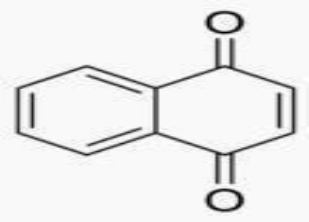


Figure 6. Structure chimique de la 1,4-naphtol quinone.

I.4. DESCRIPTIONS DES PLANTES ÉTUDIÉES

I.4.1. *CROTON HIRTUS*

Plusieurs espèces du genre Croton sont utilisées en médecine traditionnelle Africaine, Américaine et Sud-Américaine dans le traitement de nombreuses pathologies (Salatino et al, 2007). Contrairement à d'autres espèces du genre croton qui ont fait l'objet de nombreux travaux, Croton hirtus est l'une des espèces les moins étudiées.

I.4.1.1. Etude botanique

- Nom scientifique : *C. hirtus* ;
- Famille : Euphorbiaceae ;
- Ordre : Malpighiales ;
- Classe : Magnoliopsida ;
- Genre : *Croton* ;
- Espèce : *C. hirtus* ;

- Noms vernaculaires : mayani ya cowbell.

Le genre *Croton* appartient à la famille des Euphorbiaceae. Il est constitué d'environ 18.000 espèces variant des arbustes aux grands arbres et aux lianes qui se développent dans les écosystèmes les plus variables (Secco, 1992). *C. hirtus* est une herbacée, de croissance verticale jusqu'à 1 m de haut. La plante entière est recouverte de poils. Les feuilles sont à peu près en forme d'œuf dans les grandes lignes, de 2,5-7,5 cm de long et 1-5 cm de large et sont disposées en alternance. Les fleurs sont disposées en grappes spiciformes (grappes) de 4 cm de long à l'extrémité des rameaux (Henty & Pitchard , 1973; Waterhouse & Mitchell ,1998; Welzen & Chayamarit, 2007).



Figure 7 : Image de la plante de *C. hirtus*

*I.4.1.2.*Distribution par Habitat

Croton hirtus est originaire des Antilles, de l'Amérique centrale et du Sud. Elle est ensuite devenue une mauvaise herbe en Asie tropicale et en Afrique. En Inde, elle a été rapportée de Tirunelveli Hills de Ghâts occidentaux (Kottaimuthu et al, 2012).

*I.4.1.3.*Utilisation thérapeutique en médecine traditionnelle

Plusieurs espèces appartenant au genre *Croton* sont utilisées en médicine traditionnelle dans le traitement du diabète, de l'hyper cholestérolémie, de la diarrhée (Campos et al, 2002), des troubles hépatiques ou encore comme amaigrissant (Grassi-Kassisse et al., 2003), anti-inflammatoire et analgésique (Suárez et al., 2003). D'autres espèces sont utilisées dans le traitement de diverses maladies digestive, hypotensive, et sont utilisés pour traiter les bronchites,

les diarrhées et les dysenteries. De nombreuses autres espèces sont également utilisées comme fébrifuge et antipaludique (Vigor, 2001).

I.4.2. *CYMBOPOGON GIGANTEUS*

I.4.2.1. Etude botanique

- Nom scientifique : *C. giganteus* ;
- Famille : Poaceae ;
- Ordre : Cyperales ;
- Genre : *cymbopogon* ;
- Espèce : *C. giganteus* ;
- Nom vernaculaire : Mayani ya tshai.

C. giganteus appartient à la famille de Poaceae. *C. giganteus* est une plante qui a 1 à 3 m de hauteur, cette plante pérenne regroupée en touffe possède des feuilles en forme de fer de lance (lancéolées) de 15 à 60 cm de langueur et 8 à 30 mm de largeur.



Figure 8 : Image de la plante de *C. giganteus*

I.4.2.2. Distribution par habitant

On la trouve en Afrique notamment au Kenya, en Tanzanie et en Ouganda, en Madagascar mais aussi en Amérique du Nord, en Amérique du Sud.

I.4.2.3. Utilisation thérapeutique en médecine traditionnelle

C. giganteus est une plante tropicale de savane réputée dans la médecine traditionnelle pour ses activités antihypertensives et antifongiques. La tige et les feuilles sont utilisées contre la bronchite, pour traiter la stomatie vasculaire. Les racines soignent les maux de dents et les plaies buccales.

I.5. HUILES ESSENTIELLES

I.5.1. Définition

Les huiles essentielles sont les liquides concentrés et hydrophobes des composés aromatiques (odoriférants) volatils d'une plante. Elles se forment dans un grand nombre de plantes comme produits du métabolisme secondaire (A.Sanon et al, 2002). Les huiles essentielles sont des mélanges liquides très complexes. Elles ont des propriétés et des modes d'utilisation particuliers et ont donné naissance d'une branche nouvelle de la phytothérapie : l'aromathérapie (AFNOR 1986).

I.5.2. Intérêt thérapeutique, écologique et économique des huiles essentielles

Les huiles essentielles possèdent de nombreuses activités biologiques. En phytothérapie, elles sont utilisées pour leurs propriétés antiseptiques contre les maladies infectieuses d'origine bactérienne, par exemple contre les bactéries endocanalaires (J. Pellecuer et *al*., 1980) ou au niveau de la microflore vaginale (C. Viollon, J.P. et *al* 1993) et d'origine fongique contre les dermatophytes (J.P. Chaumont, et *al*., 1989).

Cependant, elles possèdent également des propriétés cytotoxiques (A. Sivropoulou, et *al*., 1996) qui les rapprochent donc des antiseptiques et désinfectants en tant qu'agents antimicrobiens à large spectre.

Dans les domaines phytosanitaires et agroalimentaires, huiles essentielles ou leurs composés actifs pourraient également être employés comme agents de protection contre les champignons phytopathogènes (A. Zambonelli, et *al*., 2004) et les microorganismes envahissant les denrées alimentaires (T. Mangena, 1999).

Les huiles essentielles jouent un rôle écologique dans les interactions végétales, végétale-animales et pourraient même constituer des supports de communication par des transferts de messages biologiques sélectifs (H. Robert et *al*., 1993).

En effet, elles contribuent à l'équilibre des écosystèmes, attirent les abeilles et des insectes responsables de la pollinisation, protègent les végétaux contre les herbivores et les rongeurs, possèdent des propriétés antifongiques, antibactériennes, allopathiques dans les régions arides et peuvent servir de solvants bioactifs des composés lipophiles. (B.G. Kurt Torssell, 1983 et R. Croteau, 1987).

I.5.3. Composition Chimique des huiles essentielles

Elles sont produites dans le cytoplasme des cellules sécrétrices et s'accumulent en général dans des cellules glandulaires spécialisées, situées en surface de la cellule et recouvertes d'une cuticule. Elles peuvent être stockées dans divers organes : fleurs, feuilles, écorces, bois, racines, rhizomes, fruits ou graines (J.Brunetton, 2009).

Les huiles essentielles sont constituées principalement de deux groupes de composés odorants distincts selon la voie métabolique empruntée ou utilisée. Il s'agit des terpènes (mono et sesquiterpènes), prépondérants dans la plupart des essences, et des composés aromatiques dérivés du phénylpropane (V. A. Kurkin, 2003).

I.5.4. Procédés d'extraction des huiles essentielles

Bien que plusieurs méthodes d'extraction peuvent être utilisées pour l'obtention d'huile essentielle notamment : l'extraction par les solvants organique, l'extraction par ultra-sons etc. dans ce travail, nous avons procédé par la méthode de l'hydrodistillation.

I.5.5. Identification et analyses chromatographiques

Comme pour les matières premières végétales, il est important d'identifier les constituants des huiles essentielles pour éviter les éventuelles falsifications.

L'évaluation de la qualité d'une huiles essentielles se fait par le biais de mesure d'indices et d'analyses chromatographiques tels que :

- Des indices physiques comme la densité relative, l'indice de réfraction, la solubilité dans l'alcool
- Des indices chimiques comme l'indice d'acide, l'indice d'esters ou de peroxydes
- Des analyses chromatographiques comme la chromatographie sur couche mince, la chromatographie en phase liquide à haute performance ou encore la chromatographie en phase gazeuse. Les méthodes chromatographiques permettent de détecter les différents composants d'une huile essentielle, d'établir la carte d'identité de celle-ci et donc de

garantir sa qualité ou non. C'est la chromatographie en phase gazeuse qui est celle dite de référence (V.Vangelder, 2017).

I.5.6. Caractères physiques des huiles essentielles

Les huiles essentielles sont solubles dans les solvants organiques comme l'alcool, l'éther et les huiles fixées elles sont insolubles dans l'eau. Elles sont généralement jaune pale. Les essences sont liquides à température ambiante. Elles ont une densité inferieur à celle de l'eau à l'exception de quelques cas (cannelle, sassafras et vétiver). Les huiles essentielles sont extrêmement volatiles et sensibles à l'oxydation. Elles ont tendance à se polymériser en donnant lieu à la formation de produits résineux ce qui conduit à la perte de leurs propriétés (Baser et Buchbauer, 2010).

I.6. TYPE DES MICROORGANISMES CIBLES

Un autre paramètre important déterminant l'activité antimicrobienne des huiles essentielles est le type des microorganismes ciblés. En général, les différents microorganismes n'ont pas une sensibilité similaire vis à vis des huiles essentielles. Parmi les microorganismes, *L. theobromae* et *P. fijiensis,* qui sont des champignons phytopathogènes et enfin *C. albicans* (Levures) est le champignon zoopathogène ont été les plus étudiés. Les champignons montrent généralement une sensibilité supérieure par rapport aux bactéries et parmi les bactéries, les Gram négatif apparaissent plus résistants que les Gram positif vis-à-vis des huiles essentielles (Cox et *al*., 2000 ; Amaral et *al*., 1998). De même, certains champignons sont plus résistants vis-à-vis de l'huile de genévrier que les bactéries (Chao et *al*., 2000). Enfin, une sensibilité supérieure des bactéries anaérobies a été observée quel que soit les huiles essentielles par rapport à celles vivant en aérobiose (Amaral et al.,1998 ; Juven et *al*., 1994).

I.6.1. Microorganisme zoopathogène

- ***Candida albicans***

1. Epidémiologie

Les candidoses sont les mycoses humaines les plus fréquentes. L'espèce la plus fréquente, *C. albicans*, est un saprophyte du tube digestif, alors qu'une dizaine d'autres espèces de *Candida* (*C. tropicalis, C. kefyr, C. guilliermondii, C. krusei*, etc.) peuvent se retrouver sur la peau ou dans le tube digestif. Devenant pathogènes sous l'influence de divers facteurs favorisants, leur dissémination est généralement d'origine endogène et se fait à partir du tube digestif par contiguïté

vers les voies génitales, respiratoires, ou la peau, ou par voie hématogène vers les organes profonds (DATRY, 1989).

2. Aspects cliniques

Les *Candida* sont des levures filamenteuses responsables de mycoses cutanées, mais aussi des mycoses des muqueuses, des mycoses unguéales, des mycoses digestives (candidoses oropharyngées et oesophagiennes au cours du SIDA), des mycoses broncho-pulmonaires, des mycoses viscérales (abcès, cérébraux, rénaux, pleuraux, etc.). On observe depuis quelques années un accroissement des infections à *Candida*, notamment des infections candidosiques profondes d'origine nosocomiale (SCHWAB, 1995 ; JOFFIN, 2003)

I.6.2. Microorganismes phytopathogènes

I.6.2.1. Lasiodiplodia theobromae

a. Origine et distribution

La pourriture brune ou simplement la pourriture des cabosses de cacao est une maladie qui se déclare fréquemment dans les cacaoyers. Elle sévit dans les régions de grande production. En Afrique de l'ouest, la Côte d'Ivoire et le Ghana, respectivement premier et second producteurs mondiaux, sont les plus touchés. Les pertes annuelles dues à la pourriture brune des cabosses sont estimées à 30 % de la récolte mondiale, ce qui représente une perte d'environ 3,8 milliards de dollar américains par an pour les producteurs de cacao du monde entier. (Guest, 2007 : Ploetz, 2016).

b. Symptômes et épidémiologie

Le premier symptôme pour toutes les espèces du genre *Phytophtora* sur les cabosses de cacaoyer est l'apparition de petites taches translucides.

Cette apparition des taches intervient entre deux et trois jours après l'infection pour se manifester. Les taches deviennent alors brunes et finissent par s'assombrir.

En période d'humidité, les taches se propagent rapidement pour couvrir toute la cabosse entre sept et quatorze jours après l'infection d'un feutrage de mycélium blanc qui révèle la présence du champignon. Après une dizaine de jours, les fruits affectés sont totalement détruits (Coulibaly et *al.*, 2017). En fin d'évolution, les fruits restent attachés sur l'arbre sous forme momifiée (Akrofi, 2015 ; Bailley et *al.*, 2016).

1.6.2.2. La cercosporiose noire

La cercosporiose noire (ou Sigatoka noir) est une maladie foliaire du bananier causée par le champignon ascomycète *Paracercospora* (*Mycosphaerella*) fijiensis. Les plantes ayant leurs feuilles endommagées par la maladie peuvent avoir un rendement atteignant 50 % en moins de fruits. Le Sigatoka noir, a été nommé ainsi pour sa ressemblance avec le Sigatoka jaune (cercosporiose jaune) causé par *paracercospora musicola* (Mulder), d'après le nom de la vallée de Sigatoka aux Fidji, où une éruption de cette maladie a atteint des proportions épidémiques de 1912 à 1923(Jones, 2000).

a. Origine et distribution

En République Démocratique du Congo (RDC), (Sebasigari et Stover, 1988) avaient signalé la présence de la MRN dans la région montagneuse de l'Est du pays. Classiquement, dans les zones de basses altitudes où est déjà présente l'espèce *P. fijiensis*.

b. Agent pathogène

Paracercospora fijiensis est un champignon hétérothallique qui se reproduit de façon sexuée et asexuée (Fahlesonet al, 2009). La forme asexuée (anamorphe) est appelée *P. fijiensis* (Crous et Mourichon, 2002 ; Crous et *al*., 2009). Le cycle sexuel joue un rôle épidémiologique important pour la survie et la dispersion des populations fongiques. Le gène Mat, déterminant le type de croisement de l'espèce, a été caractérisé récemment chez cette espèce (Conde-Ferráez et *al.*, 2007).

CHAPITRE II: MATERIEL ET METHODES

II.1. MILIEU D'ETUDE

Cette étude s'est effectuée dans la ville de Kisangani, chef-lieu de la province de la Tshopo (Figure 9). Elle est une ville, qui est située dans la cuvette centrale congolaise, à 0° 31′ 00″ Nord et 25° 11′ 00″ Est. Son altitude moyenne est de 396 m (Nyakabwa, 1982). Sur le plan administratif, Kisangani est constitué de 6 communes : Kisangani, Makiso, Mangobo, Kabondo, Tshopo et Lubunga, couvrant une superficie totale de 1.910 km^2 (Etobo, 2012).

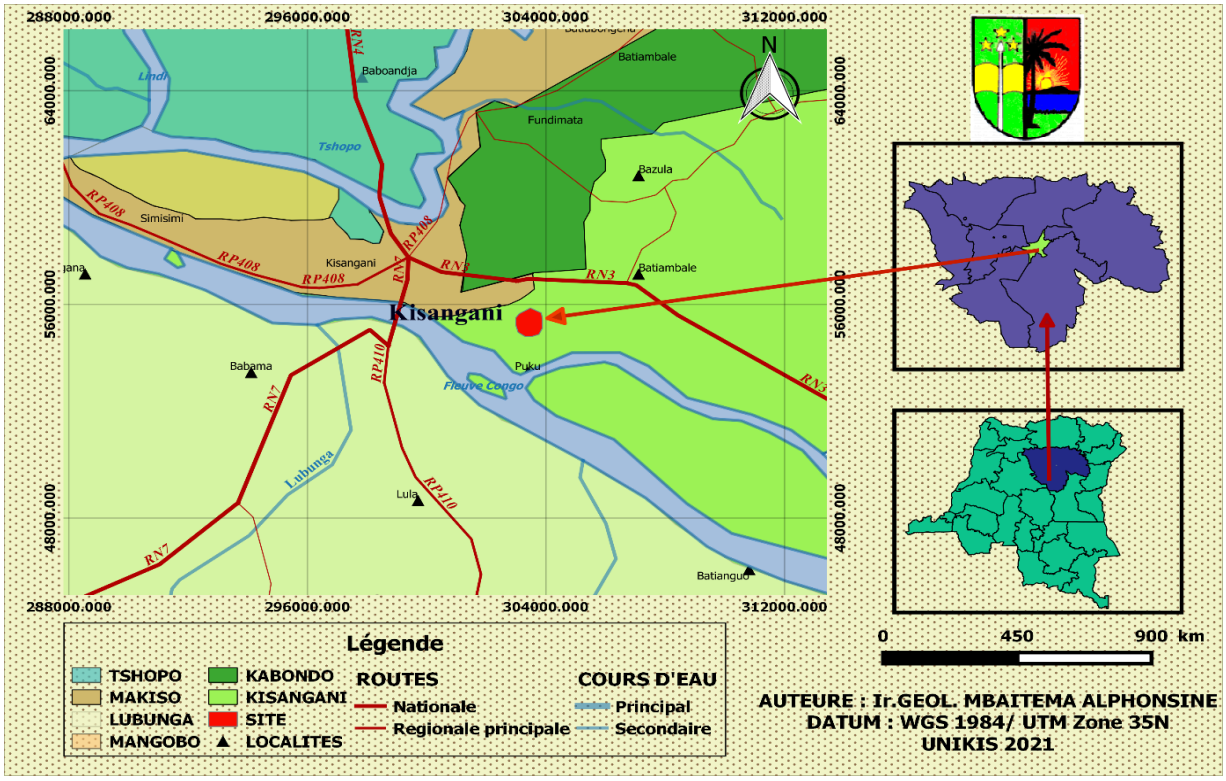


Figure 9. Carte géographique de la ville de Kisangani.

❖ Sites de récolte

Les plantes qui ont fait l'objet de notre étude ont été récoltées dans la ville de Kisangani plus précisément dans la commune Makiso, Kisangani et Kabondo. Les organes qui ont fait l'objet de notre étude sont constitués uniquement des feuilles.

II.2. MATERIEL

II.2.1. Plantes utilisées

Le matériel végétal qui fait l'objet de notre travail est constitué de *Croton hirtus* et *Cymbopogon giganteus*.

II.2.2. Souches fongiques utilisées

Deux natures des souches fongiques ont été utilisées à savoir souche fongique zoopathogène (*Candida albicans*) et souches fongiques phytopathogènes (*Lasiodiplodia theobromae* et Paracercospora fijiensis.

II.3. METHODES

II.3.1. Screening chimique

La détection des groupements phytochimiques était effectuée selon la méthode universellement connue, c'est ainsi que nous avons fait le screening chimique qui est une méthode d'analyse chimique qui consiste à mettre en évidence les groupes phytochimiques contenus dans une plante donnée.

II.3.1.1. Détection des alcaloïdes

a. **Réactifs** :

- HCl 1%
- Le Réactif de MAYER.

b. **Matériels** : Matériel : Bécher, tube à essai, seringue, entonnoir, papier-filtre.

c. **Mode opératoire**

1g de matière végétale sèche finement broyée laissé en macération dans 10 ml d'acide chlorhydrique 1% pendant 24heures. Le mélange filtré. A 3ml du filtrat auquel on a ajouté quelques gouttes de réactif de MAYER ou de DRAGENDORFF. La présence d'alcaloïdes se traduit par un précité blanc avec réactif de MEYER et rouge avec réactif de DRAGENDORFF. (Mabika, 1983).

II.3.1.2. Détection des saponines

a. **Matériels** : Tube à essai, bécher, entonnoir et papier filtre.

b. **Mode opératoire**

Faire une décoction de 1g de poudre végétale dans l'eau distillée et filtrée placée 10ml du filtrat dans un tube à essai, agiter et laisser reposer pendant 10minutes, une mousse persistante après ce temps indique la présence de saponine.

II.3. 1.3. Détection des flavonoïdes

a. Réactifs :

- Ethanol 95%;
- Eau distillée ;
- HCl concentré;
- Coupeaux de magnésium et
- Alcool isoamylique

b. Matériels : Tube à essai, pipettes graduées, seringue, bécher, entonnoir et papier filtre.

c. Mode opératoire :

5g de matériel végétal en morceaux ou grossement broyé sont infusés pendant 30minutes dans 50ml d'eau distillée bouillante. Après filtration à 5ml du filtrat, on ajoute 5ml d'éthanol 95%, 2ml d'eau distillée, 2ml d'acide chlorhydrique, 0.5 g de coupeaux de magnésium et 5 gouttes d'alcool isoamylique (Weast Et Robert, 1970).

II.3.1.4. Détection des anthocyanes

a. Réactifs :

- HCl concentré ;
- NH_4OH 25%

b. Matériels : tube à essai et verre de montre

Principe :

Les anthocyanes sont des pigments dérivés de l'ion flavinium. Ils sont mis en évidence par leur coloration qui varie sensiblement en fonction du pH:

Rouge à pH = 4, Bleu à pH compris entre 4 et 6, Incolore à pH = 7

c. Mode opératoire :

Dans un tube à essai, à 1mL de solution aqueuse présentant une coloration plus ou moins foncée, ajoutez 1ml de HCl concentré puis 1mL de NH_4OH 25%. Si la coloration s'accentue

par acidification puis vire au bleu violacé en milieu basique, on peut conclure à la présence d'anthocyanes.

II.3.1.5. Détection des tanins

a. Réactifs :

- FeCl3 1%
- Eau distillée.

b. Matériels : Tube à essai, pipettes graduées, seringue, bécher, entonnoir et papier filtre.

c. Mode opératoire :

A 5ml de l'infusé obtenu dans le test des flavonoïdes, on ajoute 5 gouttes d'une solution de FeCl3 1%. L'apparition d'un précipité montre que le test est positif (Weast Et Robert, 1982 In Folo, 2014)

***II.3.1.6*. Détection des quinones**

a. Réactifs

- HCl
- Chloroforme
- Ether diéthylique.

b. Matériels : fiole, papier filtre.

c. Mode opératoire

5 g de matière végétale grossièrement broyée, imbibée de quelques gouttes de HCl au sont mis en macération dans 30 ml du mélange chloroforme- éther (1/1) dans une fiole bouchée pendant 24 heures. Après filtration 2ml du filtrat sont agités avec 2ml de la solution de soude au 1/10. La présence de quinone est traduite par le virement de la coloration du rouge au violet de la phase aqueuse (Fournet, 1979).

***II.3.1.7*. Détection des stérols et terpènes**

a. Réactifs :

- Ether diéthylique [$(C_2H_5)_2O$];
- Anhydride acétique [$(CH_3CO)_2O$];
- Acide sulfurique concentré H_2SO_4.

b. Matériels : Fiole, pipette graduée, seringue et verre de montre.

c. Mode opératoire :

1g de matière végétale grossièrement broyé et mis en macération pendant 24 heures dans une fiole contenant 20 mL d'éther. Quelques gouttes de la solution en macération sont évaporées sur un verre de montre. Les résidus sont repris par deux gouttes d'anhydride acétique. L'addition d'une goutte d'acide sulfurique concentré donne en présence de composés stéroliques ou terpéniques, une coloration move virant au vert, si non le test est négatif. (Weast Et Robert, 1982).

II.3.2. Hydrodistillation

II.3.2.1. Principe d'hydrodistillation des plantes aromatiques

Pour cette étude, nous avons extrait les huiles essentielles par la technique d'hydrodistillation (Figure 10), selon le montage de type C levenger (Soumahoro, 2016). Cette technique consiste à chauffer le matériel végétal en présence de l'eau jusqu'à l'ébullition, ainsi, les cellules végétales éclatent et libèrent les molécules odorantes lesquelles sont entraînées par la vapeur d'eau vers le réfrigérant où elles se condensent. Puis, on recueille un liquide qui est formé de deux phases : la phase aqueuse (la plus abondante) et la phase organique constitué des huiles essentielles (Bruneton, 1999).

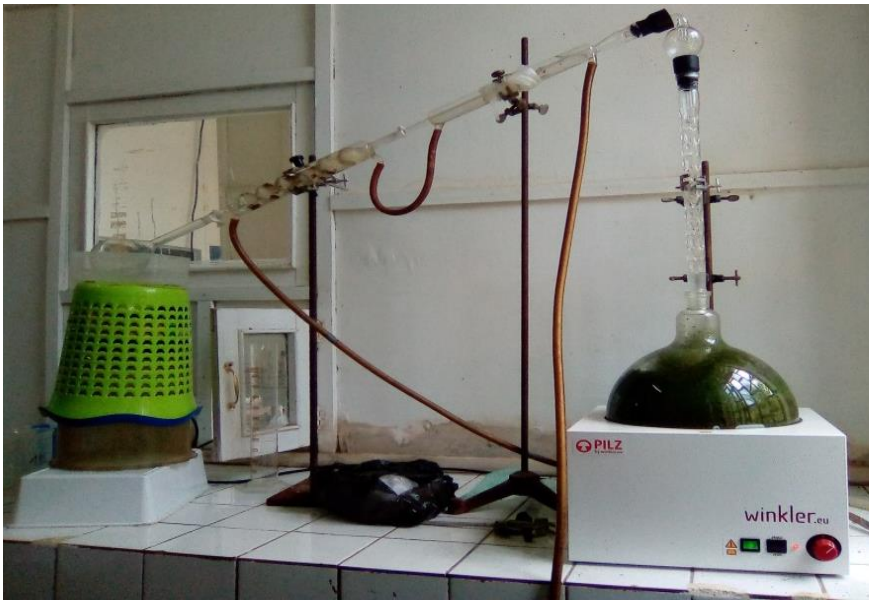


Figure 10. Dispositif de l'hydrodistillation.

De 1040 g de poudre d'échantillon de *C. giganteus* qui ont été obtenu, cette quantité a été divisée par deux pour l'hydrodistillation. Ainsi, 520 g ont été mis dans un ballon à fond rond, puis nous y avons ajouté 7 litres d'eau et l'ensemble a été porté à l'ébullition. Les vapeurs d'eau entrainant les molécules des huiles essentielles ont été ensuite condensées dans le réfrigérant fixé par un support approprié à position inclinée lié au ballon pour faciliter l'écoulement du distillat. L'extraction a duré environ 4 heures du temps.

Le distillat obtenu a été récupéré dans un petit ballon à fond rond. Le mélange a été laissé au repos pendant quelques minutes. Deux phases ont été observées : une phase organique et une phase aqueuse. L'huile essentielle obtenue a été gardée dans un flacon en verre hermétiquement fermé et gardés au réfrigérateur (Touré ,2015).

II.3.2.2. Détermination du rendement d'extraction

Selon (AFNOR ,1986), le rendement en huiles essentielles est défini comme étant le rapport entre la masse de l'huile essentielle obtenue après extraction (M') et la masse de la matière végétale utilisée (M). La relation permettant de calculer le rendement en huiles essentielles est :

$$\text{Rdt} = \frac{M'}{M} 100$$

Rdt : rendement en huiles essentielles s'exprimant en % ;

M' : masse de l'huile essentielle obtenue en gramme;

M : masse de la matière végétale utilisée en gramme.

II.2.3.3. Qualités organoleptiques des huiles essentielles

Les différentes caractéristiques organoleptiques des huiles essentielles ont été appréciées en termes d'aspect, couleur et odeur.

II.3.3. Chromatographie sur couche mince

Nous avons employé la méthode de chromatographie sur couche mince pour la séparation des composants majoritaires des huiles essentielles dans deux types de solvants dont un solvant apolaire, le hexane qui, disponible et l'autre polaire, l'acétate d'éthyle mais non disponible. Ainsi, vu l'indisponibilité de ce dernier, il a été nécessaire de procéder à sa synthèse organique au laboratoire.

II.3.3.1 Principe

L'huile essentielle est fixée sur un support appelé phase stationnaire (un gel de silice déposé en couche mince sur une plaque d'aluminium). Elle est entraînée par un solvant approprié (phase mobile ou éluant) qui migre par capillarité sur la plaque. Les composés majoritaires de l'huile essentielle se séparent par migration différentielle : chacun d'eux est d'autant plus entraîné par l'éluant qu'il est plus soluble dans celui-ci et moins adsorbé sur la phase stationnaire. Après élution, les spots ont été révélés par rayonnement UV à 230nm **(**Blogger, 2016).

II.3.3.2. Mode opératoire

a. Préparation de la cuve

La cuve a été bien fermée pendant l'expérience pour maintenir son atmosphère saturée en vapeur d'éluant.

b. Plaques de CCM

Repérer à l'avance l'emplacement où seront effectués les dépôts. Pour cela, tracer une ligne parallèle au bord inférieur de la plaque à une distance de 1Cm. Déposer une goutte d'échantillon d'huile sur cette ligne. Une autre ligne aussi a été tracée à l'extrémité supérieure de la plaque, pour servir de limite de séparation (correspond à la distance parcourue par l'éluant) et de signe pour arrêter l'élution.

❖ **Elution**

- Disposer la plaque dans la cuve, le dépôt doit être au-dessus du niveau de l'éluant.
- Éviter de déplacer la cuve ou de la faire vibrer pendant l'élution.
- Quand le front de l'éluant arrive à ligne supérieure, retirer doucement la plaque.
- Sécher la plaque à l'air ou éventuellement au sèche-cheveux pour évaporer entièrement l'éluant.

❖ **Présentation du matériel et éluant**

Les matériels suivants ont été utilisés : Cuve et couvercle ; Plaque de CCM,

❖ **Eluants :**

Premier type d'éluant : 100% en volume de l'acétate d'éthyle.

Deuxième type d'éluant: 100% en volume d'éthanol.

Troisième type d'éluant : 100% en volume d'exane.

Quatrième type d'éluant: Mélange de hexane et acétate d'éthyle (1:1).

Cinquième type d'éluant : Mélange de hexane et acétate d'éthyle (3:7).

- **Rapport frontal (RF)**

Mesurer les hauteurs (h) de migration des différents spots ainsi que la celle parcourue par l'éluant (H). Le calcul de RF est effectué par la formule ci-après :

$$Rf = \frac{h}{H}$$

- **Synthèse de l'acétate d'éthyle ou préparation de l'éthanoate d'éthyle**

Mode opératoire :

- Dans un ballon de 250 mL verser successivement 50 mL d'éthanol 60 mL d'acide acétique pur 5 mL d'acide sulfurique Adapter un réfrigérant à flux, et chauffer ainsi pendant au moins 30 minutes.
- Enlever le reflux et mettre le matériel nécessaire à une distillation fractionnée. Distiller et recueillir les fractions dont le point d'ébullition est inférieur à 100°C.
- Transvaser le distillat dans une ampoule à décanter. Ajouter 50 mL d'une solution saturée de chlorure de sodium, agiter, décanter. Eliminer la phase aqueuse.
- Laver la phase organique avec une solution d'hydrogénocarbonate de sodium à 50 $g.L^{-}$ jusqu'à neutralisation. Eliminer la phase aqueuse
- Recueillir la phase organique dans un erlenmeyer de 100 mL contenant du sulfate de sodium anhydre. Bien agiter, laisser reposer environ 20 minutes.
- Filtrer, peser ou mesurer le volume.

II.3.4. Evaluation de l'activité antifongique des huiles essentielles

II.3.4.1. Evaluation de l'activité antifongique phytopathogène

- ***a.*** **Obtention des souches de *L. theobromae***

L'isolement de souche a été fait à partir des fragments prélevés sur le cacao malade en provenance de Bengamisa, préalablement taillés avec une scarpelle et ensuite désinfectés à l'eau de javel pendant deux minutes puis rincer dans l'eau distillé stériles. A l'aide d'une pince les morceaux ont été ensemencés sur le milieu de culture Potato Dextrose Agar (PDA, 39g/l) déjà solidifiés dans les boites de Pétri. Ces boites ont été scotchés par le parafilm puis incubés) 25°.

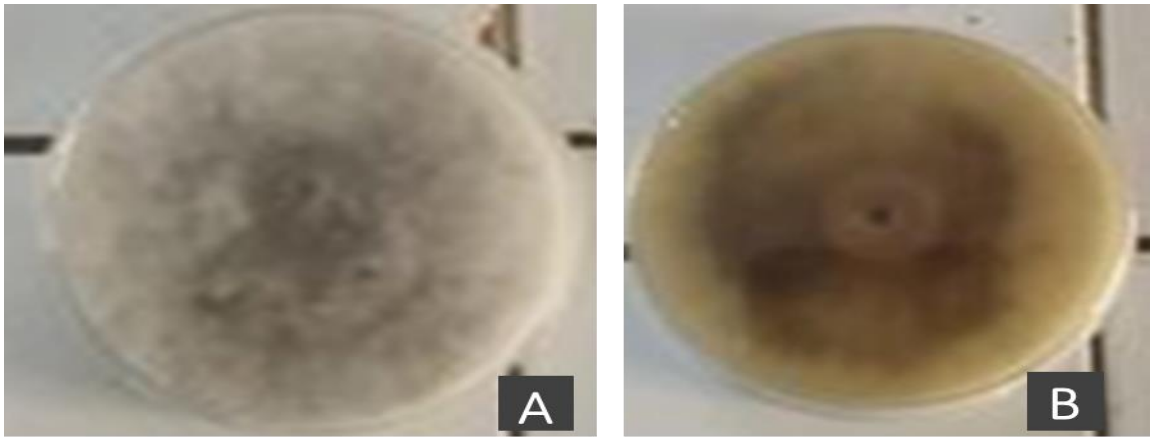


Fig. 11. Souche de *L. theobromae* sur une boite Pétri, face supérieure (A) et face inférieure (B).

b. Obtention des souches de *P. fijiensis*

Les souches de *P. fijensis* (Figure 12) utilisées ont été obtenues à partir de bananier récoltées à la Faculté des Sciences de l'Université de Kisangani en RD. Congo ; l'isolement a été réalisé par la technique de décharge des ascospores sur le milieu gélosé (H_2O), puis mise en culture déchargée sur le milieu PDA (Carlier *et al*., 2003).

Pour la mise en décharge, les morceaux des feuilles nécrosés ont été d'abord découpés, ensuite trempés dans l'eau distillée stérile pendant 20 minutes, puis déposés sur les couvercles de boites de Pétri inversés contenant un gel d'agar à 3%, la face inférieure de la feuille dirigée vers le milieu de culture. Les boites ont été incubées à 25°C sous l'obscurité et les ascospores étaient déchargées pendant la nuit, puis repiquées sur le milieu PDA (39g/1L).

Le repiquage mono ascospore s'est fait par observation au microscope inversé, marque MOTIC AE21. Les souches mono ascospores ont été conservées à 25°C sous la lumière blanche permanente (Onautshu, 2013)

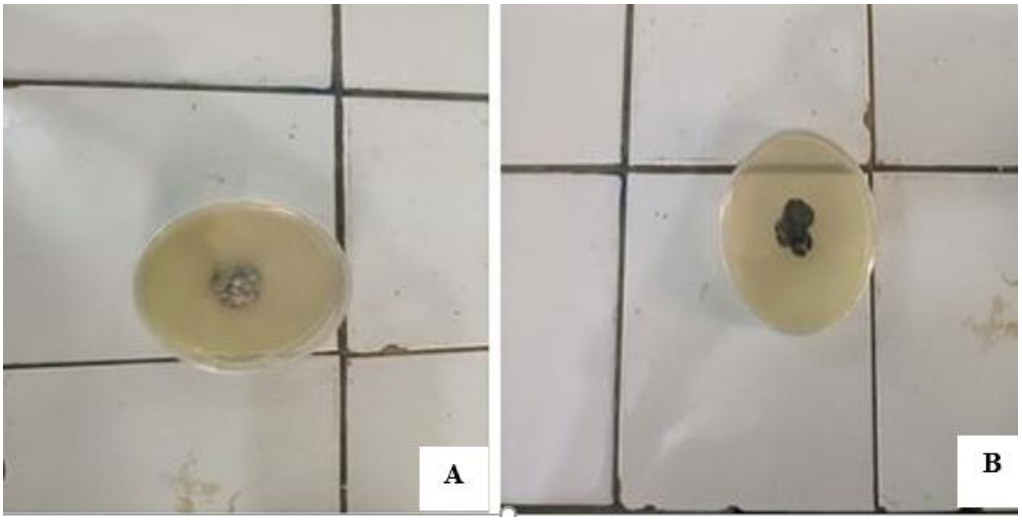


Figure 12. Souche de *P. fijensis* sur une boite Pétri, face supérieure (A) et face inférieure (B).

❖ **Interprétation de la sensibilité aux huiles essentielles**

L'évaluation de l'activité antifongique *in vitro* des huiles essentielles a été réalisée en six répétitions. La croissance mycélienne des souches est exprimée sur base de pourcentage d'inhibition (PI). En effet, 420 µL (0.42 ml) du mélange constitué des huiles essentielles et de la solution à 5 % de Tween 80 (de proportion 1 :1), ajouté 41580 µL (41.58 ml) de PDA refroidi à 45 °C après stérilisation.

Ainsi 7000 µL (7 mL) de ce mélange homogénéisé ont été coulés dans chaque boite de Pétri de 50 mm de diamètre. Un explantant mycélien de 5 mm de diamètre obtenu après perforation à l'aide d'un emporte-pièce a été posé sur le milieu de culture dans chaque boite de Pétri. Le diamètre mycélien (DM) été mesuré après 24, 48 et 72 heures. Le témoin été réalisé dans les mêmes conditions, mais sans huile essentielle et Tween 80 (Burt, 2004).

La formule suivante a servi pour le calcul de PI :

$$\mathrm{PI} = \frac{(\mathrm{DM\ Témoin} - \mathrm{DM\ Huile\ essentielle})\mathrm{X}\ 100}{\mathrm{DM\ Témoin}}$$

Le Tween 80 ($C_{64}H_{124}O_{26}$) ou monolaurate de polyoxyéthylène (80) sorbitan est un tensioactif qui permet de solubiliser les huiles essentielles dans l'eau.

Nous avions ensemencé au total 24 boîtes de pétri avec la souche de *L. theobromae* dont 6 boites avec *C. hirtus ;* 6 boites avec *C. giganteus* ; 6 boites avec Tween 80 et 6 boites pour témoin négatif. L'incubation a été faite à 25 °C. Cette même procédure a été répétée pour la souche de *P. fijensis*.

***II.3.4.2*. Evaluation de l'activité antifongique zoopathogène**

❖ **Obtention de souche de *C. albicans***

La souche de *C. albicans* nous a été fournie par le laboratoire provincial de santé publique.

Il existe plusieurs protocoles pour l'évaluation de l'activité antimicrobienne mais nous avons utilisé la méthode de diffusion sur disque parce qu'elle est relativement rapide, peu coûteuse et n'exige pas l'équipement de laboratoire sophistiqué.

a. Principe

La méthode d'aromatogramme repose sur le pouvoir migratoire des huiles essentielles dont on imprègne les disques de papier, sur un milieu solide, inoculé de la souche microbienne, à l'intérieur d'une boîte de Pétri. Elle permet de mettre en évidence l'effet antibactérien de l'huile essentielle.

b. Protocole

La souche de *C. albicans* à tester est ensemencée dans des tubes à essai contenant la gélose nutritive et incubées pendant 24 heures, afin d'obtenir une culture jeune de la levure. Les disques sont fabriqués à partir du Wattman N°40, avec un diamètre de 7 mm par un perforateur. Après stérilisation, les disques sont placés dans un tube à essai contant 0,5 ml d'huile essentielle (le tube à essai est hermétiquement fermé).

Dans des conditions aseptiques, vingt-cinq millilitres de l'agar de Mueller Hinton (38g/L) en surfusion sont coulés dans des boîtes de pétri. Après solidification du milieu de culture, 100 µL de la suspension à tester sont étalés en surface à l'aide d'un écouvillon. A l'aide d'une pince stérile, des disques de papier imbibés des huiles sont déposés sur l'agar, précédemment inoculé avec le microorganisme choisi.

Les boites sont maintenues à 4°C pendant 1 heure pour que l'huile essentielle puisse diffuser ensuite elles sont incubées à l'étuve à 37°C pendant 24 heures.

c. Expressions des résultats

A la sortie de l'étuve, l'absence de la croissance mycélienne se traduit par un halo translucide autour du disque, identique à la gélose stérile, dont le diamètre d'inhibition est mesuré à l'aide d'une latte graduée en mm.

CHAPITRE III : RESULTATS ET DISCUSSION

III.1. SCREENING CHIMIQUE

Le tableau ci-dessous illustre les résultats de la détection des groupes phytochimiques de nos deux échantillons.

Tableau 1. Détection des groupes phytochimiques de nos deux échantillons.

	Alcaloides	Terpènes et stérols	Quinones	Saponines	Tanins	Flavonoides
C. hirtus	-	+	+	+	+	-
C. giganteus	-	+	+	+	+	+

Légende :

+ : Présence

- : Absence

Il ressort de ce tableau que certains groupes phytochimiques en l'occurrence terpènes et stérols sont présents dans nos deux plantes étudiées. Une absence des alcaloïdes dans *C. hirtus* et *C. giganteus*. Mais aussi l'absence des flavonoïdes remarquée dans l'espèce *C. hirtus*.

En comparant nos résultats de *C. giganteus* avec ceux trouvés par Tika Achaotema C. en 2018, il est à remarque que du point de vu phytochimique, il n'y a pas une différence significative. Cette ressemblance pourrait être justifiée par le fait que c'est une même espèce de la plante étudiée et dans une même région.

III.2. Rendement en huile essentielle

Le rendement en huile essentielle des feuilles des plantes étudiées est illustré par la figure 13 ci-dessous

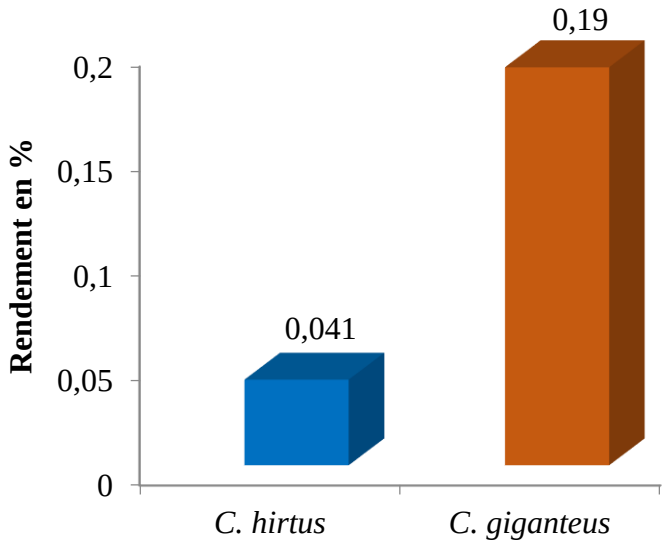


Figure 13. Rendements en huile essentielle des feuilles des plantes étudiées.

Il ressort de ce graphique que le rendement en huile essentielle est plus élevé pour les feuilles séchées de *C. giganteus*, soit 0,19% et le plus faible est celui de *C. hirtus* avec un rendement de 0,041%.

Les résultats de Daouda ont montré que les feuilles de *C. hirtus* de Cote d'Ivoire ont présenté le rendement en huile essentielle avec une valeur de 0,60%. Cette différence avec notre échantillon pourrait être due par plusieurs facteurs : situation géographique, méthode d'extraction, de la période de récolte mais aussi préparation de l'échantillon.

Comparativement aux résultats trouvés par Kadilu (2019), cet auteur a eu le rendement en huile essentielle de 0,2% pour *Ageratum conyzoides* et 0,8% pour *Newbouldia*. Cette divergence se justifierait du fait qu'on a utilisé les plantes différentes.

III.3. Organoléptiques des huiles essentielles

Les Caractéristiques organoleptiques des huile essentielle sont données par le tableau 2 et fig. 14 ci-dessous

Tableau 2 : Qualités organoleptiques des huiles essentielles

Plantes	Aspect	Couleur	Odeur
C. hirtus	Liquide	Jaune pale	Caractéristique
C. giganteus	Liquide	Jaune verdâtre	Caractéristique

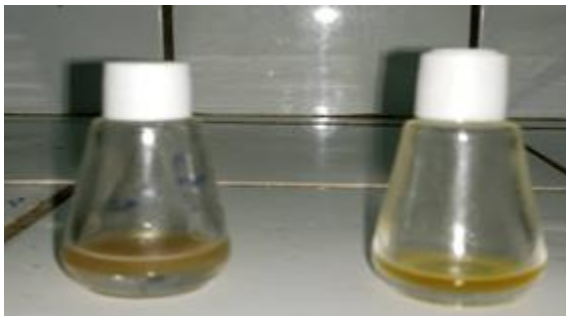


Figure 14 : huile essentielle de *C. hirtus* à gauche et de *C. giganteus* à droite.

Les extractions par hydrodistillation des feuilles des plantes médicinales ont fourni des huiles essentielles ayant des colorations variables allant du jaune pale (*C. hirtus)* au jaune verdâtre (*C. giganteus*) avec de fortes odeurs.

- **Caractérisation de l'acétate d'éthyle synthétisé pour la CCM**

L'acétate d'éthyle synthétisé a révélé des quelques caractéristiques repris par le Tableau 3 ci-dessous :

Tableau 3: Quelques propriétés de l'acétate d'éthyle synthétisé

Résultat	Densité	T° ébullition (°C)	pH
Acétate d'éthyle synthétisé	0,936	77	5,74
Acétate d'éthyle standard	0,925	77,1	-

Comparativement au standard qui est d'aspect liquide incolore, de densité de 0,925 (à 20°C) et de température d'ébullition 77,1°C, l'acétate d'éthyle synthétisé au laboratoire de chimie a présenté les valeurs de densité et température d'ébullition beaucoup plus proches que celles du standard, soit 0,936 et 77°C. Cela nous confirme que la synthèse a abouti à un résultat favorable.

III.4. CHROMATOGRAPHIE SUR COUCHE MINCE

III.4.1. Les Rf des CCM des huiles essentielles

Les différentes valeurs de RF obtenues sont présentées dans les tableaux 4, 5, 6, 7 et 9 suivants:

- **Eluant : acétate d'éthyle 100%**

Tableau 4 : Valeurs Rf obtenues de la CCM avec l'éluant acétate d'éthyle 100%

	C. hirtus		***C. giganteus***	
Spot	**I**	**II**	**I**	**II**
Rf	0,139	0,189	0,215	0,240

- **Eluant : éthanol 100%**

Tableau 5 : Valeurs Rf obtenues de la CCM avec l'éluant éthanol 100%

C. hirtus		***C. giganteus***
Spot	**I**	**I**
Rf	0,708	0,873

- **Eluant : hexane 100%**

Tableau 6 : Valeurs Rf obtenues de la CCM avec l'éluant hexane 100%

	C. hirtus			***C. giganteus***
Spot	**I**	**II**	**III**	**I**
Rf	0,063	0,198	0,791	0,189

- **Eluant** : hexane et acétate d'éthyle (1:1)

Tableau 7: Valeurs Rf obtenues de la CCM avec l'éluant hexane et acétate d'éthyle (1:1)

C. hirtus		***C. giganteus***
Spot	**I**	**I**
Rf	0,050	0,303

- **Eluant** : hexane et acétate (7:3)

Tableau 8 : Valeurs Rf obtenues de la CCM avec l'éluant hexane et acétate d'éthyle (7:3)

C. hirtus				***C. giganteus***
Spot	**I**	**II**	**III**	**I**
Rf	0,196	0,613	0,810	0,272

En comparant les résultats des Rf dans les tableaux ci-haut, on peut déduire que :

- L'hexane 100% et le mélange d'hexane et acétate d'éthyle (1:1) ainsi que le mélange d'hexane et acétate d'éthyle (7:3) sont des solvants appropriés pour l'huile essentielle des feuilles séchées de *C. hirtus* en raison de plusieurs spots qui apparaissent pour les trois éluants dans cette huile ayant respectivement des Rf : 0,063 ; 0,198 ; 0,791 et 0,088 ; 0,265 ; 0,405 ; 0,822 et 0,196 ; 0,613 ; 0,810.
- L'acétate d'éthyle et le mélange d'hexane et acétate d'éthyle (1:1) sont des solvants appropriés pour l'huile essentielles de *C. giganteus* en raison de nombre de spots qui apparaissent pour les deux éluants ayant respectivement des Rf : 0,215 ; 0,240 et 0,050 ; 0,303.

III.5. EVALUATION DE L'ACTIVITÉ ANTIFONGIQUE DES HUILES ESSENTIELLES

Les résultats de notre recherche portant sur la sensibilité des souches de *L. Theobromae*, *P. fijiensis* ainsi que *C. albicans* aux huiles essentielles de deux plantes médicinales (*C. hirtus* et *C. giganteus*) sont illustrés respectivement par les figures 15, 16, 17 et 18 :

La croissance mycélienne des souches de *L. theobromae* sur le milieu de culture PDA incorporé d'huile essentielle de *C. hirtus* est illustrée par la figure 16 ci-dessous.

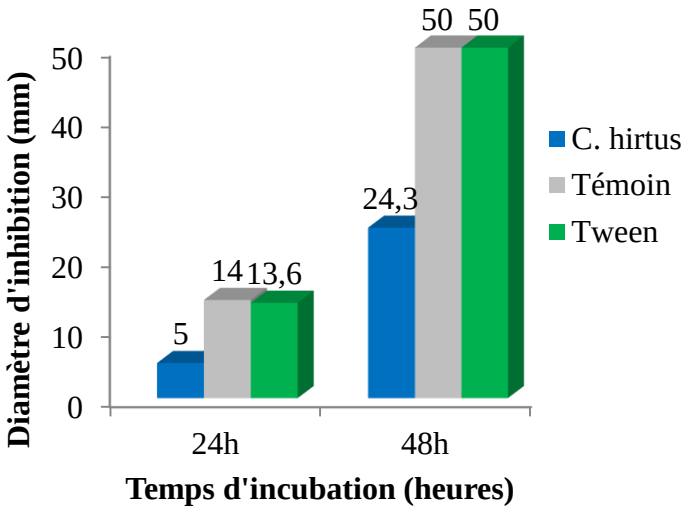


Figure 15 : Croissance mycélienne des souches de *L. theobromae* sur l'huile essentielle de *C. hirtus*. Les valeurs contenues dans le graphique ne tiennent pas compte du diamètre initial de l'explantant mycélien (5 mm).

Il ressort de cette figure qu'après 24 h d'incubation, la croissance mycélienne des souches de *L. theobromae* sur l'huile essentielle a augmenté de 5 mm de diamètre tandis qu'après 28 h, la croissance mycélienne des souches sur l'huile essentielle a augmenté de 24,3 mm diamètre.

Au premier jour d'incubation PI égale 64,28% et au deuxième jour PI égale à 51,4%.

La croissance mycélienne des souches de *L. theobromae* sur le milieu de culture PDA incorporé d'huile essentielle de *C. giganteus* est illustrée par la figure 16 ci-dessous.

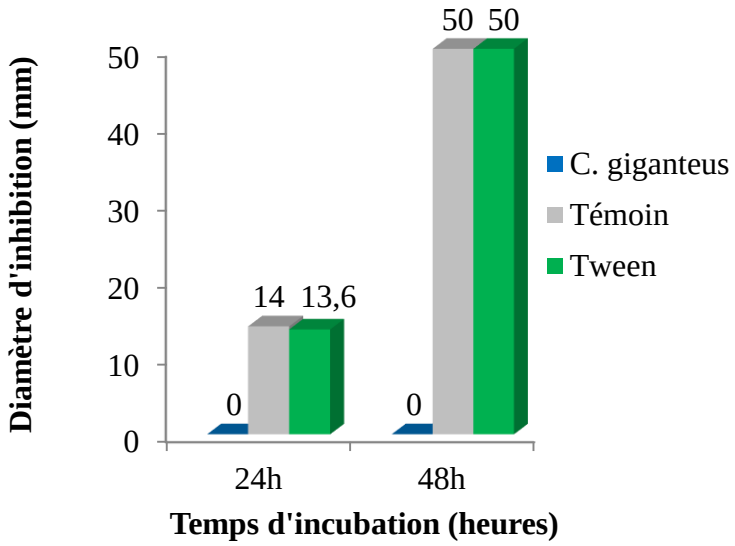


Figure 16 : Croissance mycélienne des souches de *L. theobromae* sur l'huile essentielle de *C. giganteus*. Les valeurs contenues dans le graphique ne tiennent pas compte du diamètre initial de l'explantant mycélien (5 mm).

Il ressort de cette figure qu'après 48 h d'incubation, la croissance mycélienne de souche de *L. theobromae* sur l'huile essentielle de *C. giganteus* n'a pas augmenté (0 mm) de diamètre.

Nos résultats renforcent ceux de Sibatu (2020) qui a testé l'efficacité des huiles essentielles de C. citratus sur les souches de *L. theobromae*. Cet auteur a mesuré le diamètre mycélien et a trouvé 0 mm de diamètre

Le PI donne 100% après 48h d'incubation.

La croissance mycélienne des souches de *P. fijiensis* sur le milieu de culture PDA incorporé d'huile essentielle de *C. hirtus* est illustrée par la figure 17 ci-dessous.

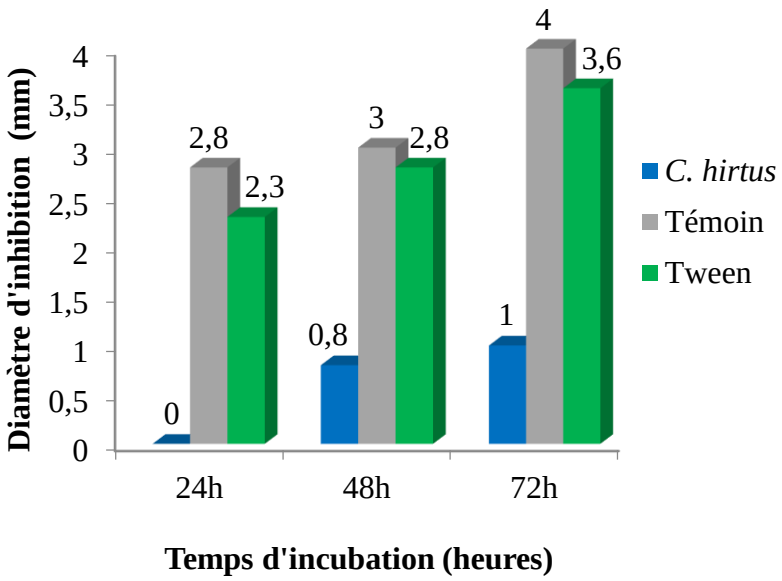


Figure 17 : Croissance mycélienne des souches de *P. fijiensis* sur l'huile essentielle de *C. hirtus*. Les valeurs contenues dans le graphique ne tiennent pas compte du diamètre initial de l'explantant mycélien (5 mm).

Il ressort de cette figure qu'après 24 h d'incubation, la croissance mycélienne de la souche de *P. fijiensis* sur l'huile essentielle n'a pas augmenté (0 mm) de diamètre tandis que alors qu'après 48 h d'incubation, la croissance mycélienne de souche de *P. fijiensis* sur l'huile essentielle a augmenté de 0,8 mm de diamètre et après 72 h d'incubation, la croissance mycélienne de souche de *P. fijiensis* sur l'huile essentielle a augmenté de 1 mm de diamètre.

Après 72h d'incubation, le PI égale à 75%.

La croissance mycélienne des souches de *P. fijiensis* sur le milieu de culture PDA incorporé d'huile essentielle de *C. giganteus* est illustrée par la figure 18 ci-dessous.

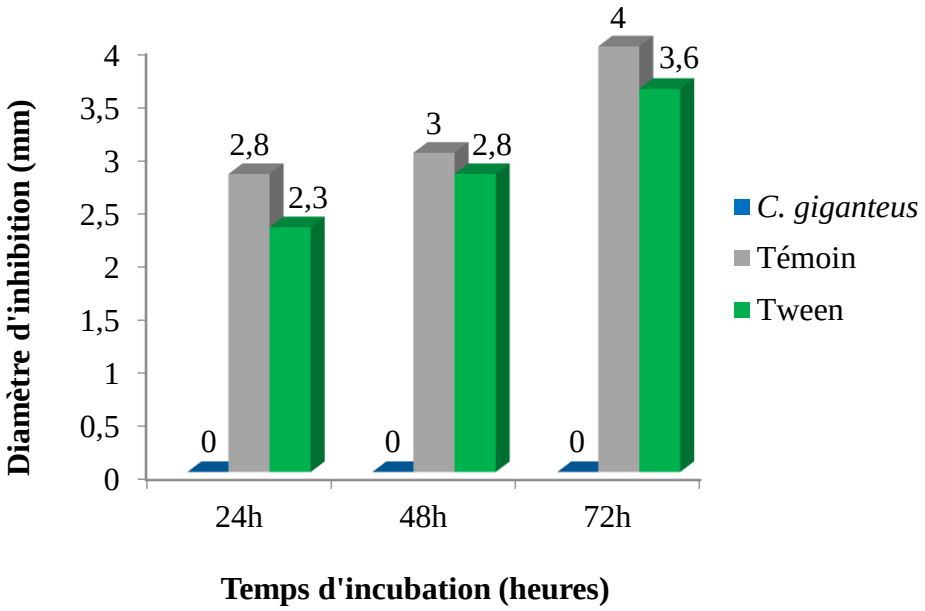


Figure 18 : Croissance mycélienne des souches de *P. fijiensis* sur l'huile essentielle de *C. giganteus*. Les valeurs contenues dans le graphique ne tiennent pas compte du diamètre initial de l'explantant mycélien (5 mm).

Il ressort de cette figure qu'après 72 h d'incubation, pour la souche de *P. fijiensis*, nos extraits ont montré une croissance mycélienne nulle comme montre la figure 18 ci-haut.

En comparant nos résultats avec ceux trouvés par Mukendi (2011), qui a travaillé avec les extraits de deux plantes (*Zingiber officinale et Tephrosia vogelii*) séparément plus le mélange de deux plantes avec PDA avait trouvé après deux semaines une croissance mycélienne des souches de *P. fijensis* soient 0 cm et 1,2 cm pour première et deuxième plante. Cette différence pourrait s'expliquer par les extraits des plantes utilisées.

Après 72h d'incubation, le PI égale à 100%.

Diamètre d'inhibition des huiles essentielles de *C. hirtus* et *C. giganteus* sur la souche de *C. albicans* est illustré par la figure 19 ci-dessous.

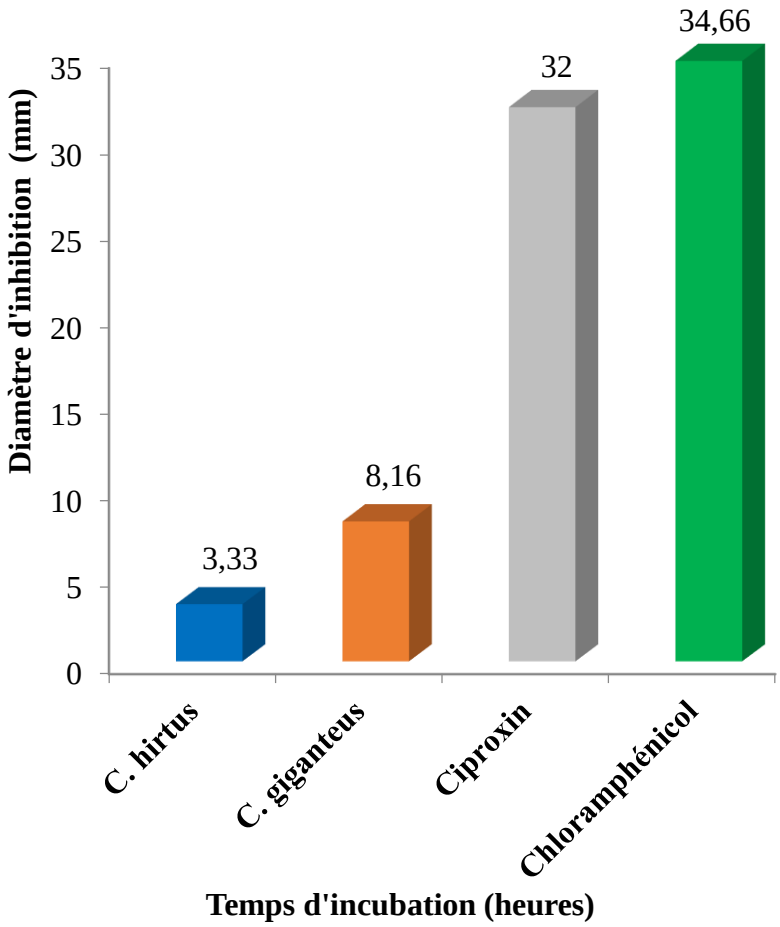


Figure 19 : Diamètre d'inhibition des huiles essentielles de *C. hirtus* et *C. giganteus* sur la souche de *C. albicans*. Les valeurs contenues dans le graphique ne tiennent pas compte du diamètre initial de l'explantant mycélien (7 mm).

Il ressort dans cette figure que la souche de *C. albicans* montre un peu de résistance sur nos huiles essentielles de *C. hirtus* et *C. giganteus*, elles ont montré le diamètre d'inhibition des valeurs respectives de 3,33 et 8,16 mm. Il est à noter que les activités de nos huiles varient selon la composition chimique (Kouamé Raphaël Oussou *at al.,* 2004). Mais signalons que cette valeur est de loin inférieure que la force qu'a présenté les antibiotiques, soient 32 mm et 34.6 mm de diamètre d'inhibition respectivement pour Ciproxin et Chloramphénicol.

Comparativement aux résultats obtenus par Touré (2015), en Côte d'ivoire qui a testé la sensibilité de 14 souches bactériennes sur l'huile essentielle de la même plante dont *C. hirtus*. Cet auteur a mesuré le diamètre d'inhibition allant respectivement de 7,71 à 10,0 mm de diamètre en moyenne pour toutes les souches utilisées. Cette différence serait due aux souches utilisées.

Nos résultats sont aussi comparés avec ceux trouvés par Kwiva (2020). Cet auteur a utilisé l'huile essentielle de *C. citratus* sur les souches bactériennes (*S. typhi, E. coli*, et *S. aureus*) et a trouvé les diamètres d'inhibition suivants 6,5 ; 0,5 et 17,5 mm de diamètre respectivement pour les souches de *Salmonella typhi, Escherichia coli* et *Staphylococcus aureus* après incubation. Cette différence pourrait être due aux espèces et souches utilisées.

CONLCUSION ET SUGGESTIONS

Cette étude a porté sur l'évaluation de l'activité antifongique des huiles essentielles de *Croton hirtus* et *Cymbopogon giganteus*, vis-à-vis de souches fongiques phytopathogènes (*Lasiodiplodia theobromae* et *Paracercospora fijiensis*) et une souche zoopathogène (*Candida albicans*).

Ainsi la présence des groupes phytochimiques majeurs en occurrence les terpènes et stérols a été remarquée

Après avoir confirmé la présence des terpènes et stérols, il a été nécessaire de procéder à l'hydrodistillation afin d'extraire les huiles essentielles de nos deux plantes. Les feuilles séchées de *C. hirtus* et celles de *C. giganteus* ont donné des rendements différents en huile essentielle de l'ordre de 0,041 % pour les feuilles séchées de *C. hirtus* et 0,19 % pour les feuilles séchées de *C. giganteus*.

La chromatographie sur couche mince a été la méthode utilisée pour séparer les différentes fractions des huiles essentielles en utilisant une série de cinq systèmes d'éluants. L'hexane et le mélange d'hexane et d'acétate d'éthyle (1:1) ainsi que le mélange d'hexane et d'acétate d'éthyle (7:3) se sont révélés meilleurs éluants pour la séparation des différentes fractions des huiles essentielles de *C. hirtus* car ces trois systèmes ont donné comme spots des valeurs de rapport frontal 0,063 ; 0,198 ; 0,791 et 0,088 ; 0,265 ; 0,405 ; 0,822 et 0,196 ; 0,613 ; 0,810 et le mélange d'hexane et d'acétate d'éthyle (1:1) et acétate d'éthyle seul se sont révélés meilleurs éluants pour la séparation des différentes fractions de les huiles essentielles de *C. giganteus* car ces deux systèmes ont donné pour chacun deux spots des valeurs de rapport frontal 0,050 ; 0,303 et 0,215 ; 0,240.

L'activité antifongique des huiles essentielles sur les souches *L. theobromae* et *P. fijiensis* a été réalisée par la méthode d'inhibition de la croissance mycélienne sur boite de Pétri en milieu solide PDA. Les huiles essentielles de *C. hirtus* et celles de *C. giganteus* ont présenté des capacités différentes à inhiber la croissance mycélienne des souches de *L. theobromae* et *P. fijiensis*.

L'huile essentielle de *C. hirtus* a été peu efficace sur la souche de *L. theobromae* soient 5 et 24,3 mm pendant 24 et 48 heures d'incubation, alors que celle de *C. giganteus* a montré une efficacité énorme à inhiber la croissance mycélienne soit 0 mm de diamètre sur cette souche après

48 heures d'observation. Cependant la croissance mycélienne sur la souche de *P. fijiensis* était de 0 ; 0,8 et 1 mm de diamètre sur l' huile essentielle de *C. hirtus* respectivement après 24, 48 et 72 heures d'incubation, tandis qu'il n'y avait aucune croissance mycélienne sur la souche de *P. fijiensis* sur l'huile essentielle de *C. giganteus* soit 0 mm de diamètre après 72 heures d'observation.

En termes de PI, pour la souche de *L. theobromae* sur l'huile essentielle de *C. hirtus* a présenté un faible PI par rapport à celle de *C. giganteus* soient 64,28 % et 51,4 % après respectivement 24 et 48 heures d'incubation (*C. hirtus*) alors que 100 % et 100 % après 24 et 48 heures d'incubation (*C. giganteus*); Par ailleurs pour la souche de *P. fijensis* le PI était de 100 % après 72h d'incubation pour les huiles essentielles des deux plantes utilisées.

Les huiles essentielles de *C. hirtus* et de *C. giganteus* ont présentées aussi des actions inhibitrices différentes sur la souche de *C. albicans*.

Il y a eu un peu de résistance de la souche de *C. albicans* sur nos deux huiles essentielles avec des diamètres d'inhibitions allant de 3,33 et 8,16 mm respectivement sur *C. hirtus* et *C. giganteus*.

D'après les résultats obtenus in vitro, on peut conclure que les huiles essentielles des feuilles séchées *C. hirtus* et *C. giganteus* ont une forte activité à inhiber la croissance des souches fongiques du côté phytopathogènes que zoopathogène.

Par conséquent, toutes nos hypothèses émises au motif de notre étude sont confirmées suite aux résultats obtenus.

Loin de prétendre que nous avons épuisé les études sur ce domaine, nous suggérons aux futurs chercheurs de:

- Continuer les études sur l'activité antifongique des huiles essentielles d'autres plantes sur les souches de *L. theobromae* et *P. fijiensis* ;
- Déterminer d'autres propriétés physicochimiques de ces huiles essentielles telles l'indice de réfraction, température de fusion et d'ébullition, viscosité, le pouvoir rotatoire, pH et les différentes spectroscopies ;
- Déterminer la composition chimique de ces huiles essentielles et la structure des molécules responsables de leur activité antifongique ;
- Déterminer la concentration minimale inhibitrice de chaque fraction.

BIBLIOGRAPHIE

Acebo-Guerrero Y., Hernandez-Rodriguez A., Heydrich M., EJJazirl M. &Hernadez Lauzardo A. N. 2011. Management of black pod rot in cacao (*Theobromae cacao* L.): a review. Fruits, 67:41-48p.

Ackah Jacques Auguste Alfred Bognan M., 2009. Evaluation et essai d'optimisation de l'activité antifongique de terminaliacatappalinne une combretaceae de la pharmacopée Ivoirienne sur la croissance in vitro de aspergillus fumigatus, candida albicans et trichophyton mentagrophytes.

Akrofi A. Y., Terlabie J. L., Amoako-Attah I &Asare E. K., 2015. Isolation and characterization of bacteria from different cacao progenies and their antagonistic activity against the black pod disease pathogen, *Phytophthora palmivora*. *Journal of Plant Diseases and Protection,* 124: 143152.

Amaral J.A., Ekins A., Richards S.R. & Knowles R., 1998. - Effect of Selected Monoterpenes on Methane Oxidation, Denitrification, and Aerobic Metabolism by Bacteria in Pure Culture. Applied and Environmental Microbiology, 64 : 520-525.

Anklam E., Berg H., MathiassonL.Sharman M. ET Ulberth F., 1998**:** Supercritical Fluid Extraction (Sfe) In Food Analysis: A Review. Food Addit. Contam., 1998, Vol. 15, Pp : 729 – 750.

Anton R., Lobstein A. Plantes Aromatiques. Epices, Aromates, Condiments Et Huiles Essentielles. 2005. Tec & Doc, Paris, 522.

Association Française De Normalisation (AFNOR), 1986, "Huiles Essentielles", AFNOR, Paris. NF T 75-006.

Bailey B. A., Ali. S. S. & Meinhardt L.W., 2016. *Phytophthora megakarya*, a Causal Agent of

Blogger, 2016. Huiles essentielles : Analyse par chromatographie sur couche mince et évaluation de leur pouvoir antioxydant.

Bokota, 2012. «Etude de l'activité antifalcemiante et de la stabilité physicochimique des anthocyanes de quelques espèces des genres J usticia, Ficus et Annona récoltées dans les Districts de la Tshopo et de l'Ituri en RD CONGO.

Braser K. et Buchbauer G., 2010: Handbook of essential oil: Science, Technology and applications, CRC Press. UK.

Bruneton J., 2009. Pharmacognosie : Phytochimie Des Plantes Médicinales, 4ème Ed. Lavoisier, Paris. Pp.423-440.

Burt S., 2004: Essential oil their antibacterial proprieties and potential applications in foods-a review. International journal of foods and Microbiology. 94: 223-253.

Campos A.R., Albuquerque F.A.A., Rao V.S.N., Maciel M.A.M & Pinto A.C. 2002.Investigations on the antinociceptive activity of crude extracts from Croton cajucara leaves in mice. Fitoterapia.73(2): 116-120.

Carlier, J. ; De Waele, D. et Escalant, J.V., 2003. Evaluation globale de la résistance des bananiers à la fusariose, aux maladies foliaires causées par les *Mycosphaerella spp.* et aux nématodes. Evaluation de la performance (A. Vézina et C. Picq, eds). Guides techniques INBAP 7. Réseau international pour l'amélioration de la banane plantain, Montpellier, France, 62p.

Carlier, J. 2000 : Etude des populations de M.fijiensis et amélioration génétique du bananier pour la résistance à la maladie des raies noires ; Réunion annuelle.

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: 639-649.

Chemat F., Tomao V. ET Virot M., 2008:Ultrasound-Assisted Extraction in Food Analysis. In Handbook of Food Analysis Instruments by SemithÖtles (Pp. 85 – 103). Boca Raton, Florida, Usa: Crc Press.

Chemat S., Lagha A., Ait Amar H. ET Chemat F., 2003:Ultrasound Assisted Microwave Digestion. Ultrasoni. Sonochemi. Vol. 11, Pp: 5-8.

Chemat S., Lagha A., Ait Amar H., Bartels P.V. Et Chemat F., 2004a :Comparison Of Conventional And Ultrasound-Assisted Extraction Of Carvone And Limonene From Caraway Seeds. Flavour and Fragrance Journal, Vol. 19, Pp: 188 – 195.

Conde-Ferraez L., Waalwijk C., Canto-Canché B.B., Kema G.H.J., Crous P.W., James A.C. and Abeln E.C.A. 2007. Isolation and characterization of the mating type locus of

Mycosphaerellafijiensis, the causal agent of black leaf streak disease of banana. Molecular Plant Pathology 8(1): 111-120.

Coulibaly K., Kébé B.I., Aka A.R., Kouakou K., N'Guessan W.P., Tahi G.M., Kassin K.E., Guiraud S.B., Assi M.E., Koné B. &N'Guessan K.F., 2017: Bien luttercontre la pourriturebrune des cabosses du cacaoyeren Côte d'Ivoire. Fiche technique cacaoyer n° 6. Centre National De Recherche Agronomique (CNRA), 2p.

Cox S.D., Mann C.M., Markham J.L., Bell H.C., Gustafson J. E., Warmington J. R., & Wyllie S.G., 2000.- The mode of antimicrobial action of the essential oil of Melaleuca alternifolia (tea tree oil). Journal of Applied Microbiology 88 : 170-175.

Croteau R., *Chem. Rev.*, 1987, *87***,** 929p.

Crous, P.W. and Mourichon, X., 2002. *Mycosphaerellaeumusae*and its anamorphe*Pseudocercosporaeumusae*spp. nov.: causal agent of eumusae leaf spot disease of banana. *Sydowia*, 54, 35–43

Crous, P.W., Schoch, C.L., Hyde, K.D., Wood, A.R., Gueidan, C., de Hoog, G.S. and D.L. Pavida. G.M. Lampman. G.S. Kriz, 2009. *Introduction to Organic Laboratory Techniques,*

Datry A., 1989. Etude comparative entre le fluconazole et les kétoconazoles dans la candidose oropharynée des patients VIH. Communication faite au symposium *pfizer* international : Montreal, Candida. 4p.

Duarte C., Moldao-Martins M., Gouveia A.F., Beirao Da Costa S., Leitao A.E. ET Bernardo-Gil M.G., 2004**:** Supercritical Fluid Extraction of Red Pepper (*Capsicum Frutescens*L.). J. Supercrit. Fluids, 2004, Vol., 30, Pp: 155 – 161 F.

Etobo, K. ; 2012 : Etude de l'activité antibactérienne des extraits de quelques plantes médicinales sur des souches bactérienne résistantes aux antibiotiques courants à Kisangani. Thèse, Inédit, Faculté des Sciences, Université de Kisangani, 141p.

Fahleson, J., Nakyanzi, M., Okori, P., Seal, S., Kenyon, L. and Dixelius, C., 2009. Genetic analysis of *Mycosphaerellafijiensis* in the Uganda Lake Victoria region. Plant Pathology. 58p.

Folo J. : 2014. « Screening chimique et extraction des principes actifs majeurs dans Carica papaya, Nicotiana tabacum, Vermonia senegalensis et Rauwolfia vomitoria : utilisées contre les infections cutané » mémoire inédit, UNIKIS Fac. Sc., 12p.

Founet A., 1979 : plantes médicinales Congolaises ; Meiocarpidium, limaciopsis… Travaux et documents de l'office des recherches scientifiques et techniques outre-mer (ORSTOM) n° 111, Paris, 187p.

Fouré, E. et Lescot, T., 1998. Variabilité génétique des Mycosphaerella inféodé au genre *Musa*. Mise en évidence de la présence au Cameroun sur Bananier et plantain d'une *cercosporiose* (*Mycosphaerellamusicola*) au comportement pathogène atypique. Fruits 43: 407p.

Grassi-Kassisse D.M., Wolf-Nunes V., Miotto A.M., FariasSilva E., Souza-Brito A.R.M., Nunes D.S. &SpadariBratfisch R.C.J. 2003.- Sensitivity to b-adrenoceptor agonists of adipocytes from rats treated with an aqueous extract of Croton cajucaraBenth. Journal of Pharmacy and Pharmacology. 55(2): 253-257

Groenewald, J.Z., 2009. Phylogenetic lineages in the Capnodiales. *Stud. Mycol.* 64, 17–47.

Guest D., 2007: Black Pod: Diverse pathogens with a global impact on cocoa yield. Phytopathology, 1650-1653p.

Henty E.E. &Pitchard G.H., 1973.- Weeds of New Guinea and their control.Papua New Guinea Botany Bulletin 7.

Joffina J.N. 2003. Les cours de mycoses. 109 P.

Jones, D.R., 1980: Diseases of banana Abacat and Enset ;Londre, CABI publishing. 4p.

Juven B.J., Kanner J., Schved F., &Weisslowicz H., 1994.- Factors That Interact with the Antibacterial Action of Thyme Essential Oil and Its Active Constituents. Journal of AppliedBacteriology, 76 : 626-631.

Kadilu, 2019 : Extraction d'huiles essentielles et évaluation de l'activité antioxydante, antifalcemiante et antimicrobienne de quelques plantes aromatiques dans la région de Kisangani Cas de : «*Newbouldia et Ageratum conizoid*.

Khalid EL MANSOUR, 2013. Recherche et évaluation de l'activité antifongique des extraits de plantes médicinales.

King J.W., 2004:Critical Fluid Technology for the Processing Of Lipid-Related Natural Products. Comptes Rendus Chimie, Vol. 7, Pp : 647 – 659.

Kottaimuthu R. & Vasudevan N., 2012.- Identity and distribution of Croton hirtusL'Herit (Euphorbiaceae) - A fast naturalizing invasive species in Tamil Nadu. Elixir Bio Diversity. 50: 10462-10464.

Kouamé Raphaël Oussou at al, 2004. Activités antibactériennes des huiles essentielles de trois plantes aromatiques de Côte-d'Ivoire, C. R. Chimie 7, p 1081–1086.

Kurkin V. A., *Chem. Nat. Compd*. 2003, *39*,123.

Kurt Torssell B.G., Natural Products Chemistry. *John Willy & Sons Limited*. 1983, 401 P.

Kwiva M., 2020. Evaluation de l'activité in vitro des huiles essentielles et des antibiotiques modernes sur les souches bactériennes dans la région de Kisangani

Lass, J.; 1985: Phytophtora pod rot often called black pod in: Cocoa GRAAR Wood, RA lass, Eds. Loengmanlondes royaume uni, 267-282p.

Luka (2000) : « Extraction et détermination de quelques paramètres physico- chimique et groupe physico-chimiques de l'huile essentielle de CanangaOdorata (Ylang-Ylang).

Makambo, 2007, Cours de chimie des substances naturelles pp 79.

Malo N., 10ième Journées Internationales, Digne-Les-Bains 5-6-7 Sept. 1991 ; P. 28

Mangena T., N.Y.O. Muyima, *Lett. Appli. Microbiol.* 1999, *28*, 291.

Martini M. C., Seiller M., Editions Tec & Doc, Editions Médicales Internationales Paris. Lavoisier, 1999, 563.

Mate, M., J.P. ; 2001 : Phytomasse et minéralomasse des Haies des légumineuses améliorantes en cultures en allées à Kisangani (République Démocratique du Congo), Thèse, Faculté des Sciences, Université Libre de Bruxelles, 235p.

Meredith, D.; Lawrence, J.1970: Black leafs treat disease of (M.fijiensis) suscetilility of cultivars tropical agriculture, 275p.

Molisho Katembo M. 2019: «Screening chimique, extraction et évaluation de l'activité antibactérienne de l'huile essentielle de Zingiber officinale vendu sur le marché de Kisangani».

Mukendi, J. ; 2011 : Efficacité biocide de deux extraits des plantes à action biocide (*Tephrosia vogelii et zingiber officinale*) sur la croissance in vitro de *mycosphaerellafijiensis*, agent causal de la maladie des raies noires du bananier, Mémoire inedit, Fac d'agronomie, UNIKIN, 48p.

Mwambali. 2020 : «Contribution A L'étude Chimique Et Evaluation De L'activité Antifongique Des Huiles Essentielles Sur La Souche De *LasiodiplodiaTheobromae.* Cas De *Ageratum Conyzoides Et CymbopogonCitratus*Dans La Ville De Kisangani (Rd Congo) ».

Nyakabwa, M. ; 1982 : Phytocénose de l'écosystème urbain de Kisangani. Thèse de doctorat, Unikis, Fac. Sciences, Tome 1, 481 p.

Onautshu, 2013. Caractérisation des populations de *Mycosphaerellafijiensis* et épidémiologie de la cercosporiose noire du bananier (*Musa*spp.) dans la région de Kisangani (RDC). Thèse de doctorat, UCL, 249p.

Padua L.S., N. Bunyapraphatsara, R.H.M.J. Lemmens, *Plant Resources Of South-East Asia*, 1999.

Page L. et Grume M. 2014 ''Source: Pourriture brune du cacao – Agroneo''

Pellerin P. 1991:Spercritical Fluid Extraction of Natural Raw Materials for the Flavor and Perfume Industry. Perfum. Flav., Vol. 16, Pp : 37 – 39.

Pellerin P., 2001 **:** Extraction Par Le Co2 A L'état Supercritique. Ann. Fals. Exp. Chim. V. 94, N°954 – Pp : 51-62.

Perrut M., 1999 :Extraction Par Fluide Supercritique. Les Techniques De L'ingénieur. J 2 770.

Ploetz R., 2016. The Impact of Diseases on Cacao Production: A Global Overview In: CacaoDiseases, Bailey B.A., Meinhardt L.W. (Editors), Springer International PublishingSwitzerland, Beltsville, USA, 33-59p.

Robert H., K.M. Waterman, G.Peter, Longman Scientific and Technical, 1993, U.K.

Salatino A., Salatino M.L.F., Negri G., 2007.-Traditional uses, chemistry and pharmacology of croton spices (Euphrobiaceae). Journal of the Brazilian chemical society. 1: 11-33.

Salatino A., Salatino M.L.F., Negri G., 2007.-Traditional uses, chemistry and pharmacology of croton spices (Euphrobiaceae). Journal of the Brazilian chemical society. 1: 11-33.

Salisova M., Toma S. ET Mason T.J., 1997:Comparison of Conventional and Ultrasonically Assisted Extractions of Pharmaceutically Active Compounds from Salvia Officinalis. Ultrasonics Sonochemistry, Vol. 4, Pp.: 131 – 134.

Sanon A., M.Garba**,** J. Auger, J. Huiganrt, *Journal of Stored Products Research*, 2002, 38, 129.

Sarrazin C., Le Quère J.-L., Gretsch C. ET Liardon R., 2000: Representativeness of Coffee Aroma Extracts: Comparison of Different Extraction Methods. Food Chem., 2000, Vol. 70, Pp: 99 – 106.

Schwab D., 1995. Candidiasis : Candidose et HIV. Project Infom Facts sheet, San Francisco. 8P. http://www.projinf.org/fs/ candida.html. Consulté le 09. 11. 2005.

Sebasigari, K. et Stover, R.H., 1988**.** Banana Diseases and Pests in East Africa.

Secco, R.S., 1992.- Notassobre as lianas do gênero Croton L. (Euphorbiaceae). Bol. Mus. Para. EmílioGoeldi. Sér. Bot. 8: 265-281.

Senorans F.J., Ruiz-Rodriguez A., Ibanez E., Tabera J. ET Reglero G., 2003: Isolation of Brandy Aroma by Countercurrent Supercritical Fluid Extraction. J. Supercrit. Fluids, 2003, Vol. 26, Pp: 129 – 135.

Sibatu, 2020 : Evaluation *in vitro* de l'activité antifongique des huiles essentielles sur les souches de lasiodiplodia theobromae dans la région de Kisangani (R.D Congo)

Sivropoulou A., E. Papanikolaou, C. Nikolaou, S. Kokkini, T. Lanaras And M. Arsenakis, *J. Agric. Food Chem*., 1996, *44*, 1202.

Suárez A.I.; Compagnone R.S.; Salazar-Bookaman M.M.; Tillet S.; Delle Monache F.; Di Giulio C.; Bruges G., 2003.- Antinociceptive and anti-inflammatory effects of Croton malambo bark aqueous extract. Journal of Ethnopharmacology, 1 : 11-4.

Tika Achaotema C. 2018 : Screening chimique, extraction d'huile essentielle et évaluation de l'activité antimoustique de deux variétés de cymbopogon ; giganteus et citratus rencontrées à Kisangani.

Turner C., 2006 **:** Modern Extraction Techniques. Food and Agricultural Samples. Acs Symposium Series 926. Edition, American Chemical Society, Washington, Dc.

Victoria Vangelder, 2017 l'aromatherapie dans la prise en charge des troubles de sante mineurs chez l'adulte a l'officine, thèse de doctorat, Université de Lille 2.

Vigor C., Fabre N., Fourasté I. & Moulis C., 2001.- Three clerodane diterpenoids from Croton Vinatoru M., 2001:An Overview of Ultrasonically Assisted Extraction of Bioactive Principles from Herbs. Ultrasonics Sonochemistry, Vol. 8, Pp: 303-313.

Vinatoru M., Toma M. ET Mason T.J., 1999**:** Ultrasound-Assisted Extraction of Bioactive Principles from Plants and Their Constituents. Adv. Sonochem., Vol. 5, Pp.: 209 – 247

Vinatoru M., Toma M., Radu O., Filip P.I., Lazurca D. ET Mason T.J., 1997:The Use of Ultrasound for the Extraction of Bioactive Principles from Plant Materials. Ultrasonics Sonochemistry, Vol. 4, Pp : 135 – 139.

Viollon C.**,** J.P. Chaumont, D. Leger, *Plant Méd Phytothér*1993, *26*, 17.

Waterhouse B.M. & Mitchell A.A. 1998.- Northern Australia Quarantine Strategy: weeds target list, Second Edition. Australian Quarantine & Inspection Service, Miscellaneous Publication No. 6/98.

Welzen P.C.V &Chayamarit K., 2007.- Euphorbiaceae, in Flora of Thailand.National Herbarium Nederland, Leiden; Forest Herbarium, National Park, Wildlife and Plant Conservation Department, Bangkok. Available at http://www. nationaalherbarium.nl /thaieuph/Th Cspecies / ThCrotonT.htm.

Zambonelli A., A.Z. D"Aurelio, A. Severi, E. Benvenuti, L. Maggi, A. Bianchi, *J. Essent. OilRes.* 2004, *16*, 69.

ANNEXES

Annexe 1 : Rendement

Plantes	Poudres (g)	d'huile essentielle (mL)	Rdt (%)	Masse d'huile essentielle (g)
C. hirtus	5000	2	0,041	2,04
C. giganteus	1040	1,98	0,19	1,98

Annexe 2 : Révélation aux UV



Annexe 3 : Les Rf des CCM des huiles essentielles

- **Les valeurs de Rf de la CCM avec éluant acétate d'éthyle 100%**

Premier système	*C. hirtus*		*C. giganteus*	
	Spot I	**Spot II**	**Spot I**	**Spot II**
Hauteur spot (cm)	11	15	17	19
Hauteur éluant (cm)	79	79	79	79
Rf	0,139	0,189	0,215	0,240

- **Les valeurs de Rf de la CCM avec éluant éthanol 100%**

Deuxième système	*C. hirtus*	*C. giganteus*
	Spot	**Spot**
Hauteur spot (cm)	56	69
Hauteur éluant (cm)	79	79
Rf	0,708	0,873

- **Les valeurs de Rf de la CCM avec éluant hexane100%**

Troisième système	***C. hirtus***			***C. giganteus***
	Spot I	**Spot II**	**Spot III**	**Spot**
Hauteur spot (cm)	5	15	62,5	15
Hauteur éluant (cm)	79	79	79	79
Rf	0,063	0,189	0,791	0,189

- **Les valeurs de Rf de la CCM avec mélange d'hexane et acétate d'éthyle (1:1)**

Quatrième système	***C. hirtus***				***C. giganteus***	
	Spot I	**Spot II**	**Spot III**	**Spot IV**	**Spot I**	**Spot II**
Hauteur spot (cm)	7	21	32	65		
Hauteur éluant (cm)	79	79	79	79	79	79
Rf	0,088	0,265	0,405	0,882	0,050	0,303

- **Les valeurs de Rf de la CCM avec mélange d'hexane et acétate d'éthyle (7:3)**

Troisième système	***C. hirtus***			***C. giganteus***
	Spot I	**Spot II**	**Spot III**	**Spot**
Hauteur spot (cm)	15,5	48,5	64	21,5
Hauteur éluant (cm)	79	79	79	79
Rf	0,196	0,613	0,810	0,272

Annexes 4 : Comportement de souche de *L. theobromae* après 24 heures d'incubation.

Nombre de répétition	***C. hirtus***	***C. giganteus***	**Témoin négatif**	**Témoin avec Tween 80**
1	5	0	15	12
2	5	0	13	15
3	5	0	15	15
4	5	0	15	15
5	2	0	12	11
6	8	0	14	14
Moyenne	5	0	14	13,6

Annexe 5 : Comportement de souche de *L. theobromae* après 48 heures d'incubation

Nombre de répétition	*C. hirtus*	*C. giganteus*	Témoin négatif	Témoin avec Tween 80
1	24	0	50	50
2	25	0	50	50
3	24	0	50	50
4	21	0	50	50
5	27	0	50	50
6	25	0	50	50
Moyenne	24,3	0	50	50

Annexes 6 : Comportement de souche de *P. fijensis* après 24 heures d'incubation

Nombre de répétition	*C. hirtus*	*C. giganteus*	Témoin négatif	Témoin avec Tween 80
1	0	0	3	3
2	0	0	3	2
3	0	0	3	2
4	0	0	3	2
5	0	0	3	3
6	0	0	2	2
Moyenne	0	0	2,8	2,3

Annexe 7 : Comportement de souche de *P. fijensis* après 48 heures d'incubation

Nombre de répétition	*C. hirtus*	*C. giganteus*	Témoin négatif	Témoin avec Tween 80
1	1	0	3	3
2	1	0	3	3
3	1	0	3	3
4	0,5	0	3	3
5	1	0	4	3
6	0,5	0	2	2
Moyenne	0,8	0	3	2,8

Annexe 8 : Comportement de souche de *P. fijensis* après 72 heures d'incubation

Nombre de répétition	*C. hirtus*	*C. giganteus*	Témoin négatif	Témoin avec Tween 80
1	1	0	4	4
2	1	0	4	4
3	1	0	4	4
4	1	0	4	3
5	1	0	4	3
6	1	0	4	4
Moyenne	1	0	4	3,6

Annexe 9 : Comportement de souche de *C. albicans* après 24 heures d'incubation

Souche	Huiles essentielles		CIPROXIN	CHRORAMPHÉNICOL
	C. hirtus	*C. giganteus*		
	4	7	32	38
	4	13	25	34
	4	5	33	36
C. albicans	2	8	34	34
	3	8	36	33
	3	8	32	33
Moyenne	3,33	8,16	32	34,66