

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE
UNIVERSITE SAAD DAHLEB DE BLIDA



FACULTE DES SCIENCES AGRO-VETERINAIRES
DEPARTEMENT D'AGRONOMIE

**Pouvoir antifongique des extraits de feuilles de (*Laurus nobilis L.*) vis-à-vis
(*Phytophthora infestans*) (Mont.)De Bary. Agent du mildiou de la pomme de
terre (*Solanum tuberosum*) en Algérie.**

Projet de fin d'étude en vue de l'obtention du
Diplôme de Master II en sciences de la nature et de la vie.

Filière d'Agronomie.

Option : Biotechnologie des plantes aromatiques, médicinales,
et produits naturels.

Présenté par : ARBIA Djenat.

Devant le jury composé de :

Mme Houmani Z.	Pr.	USDB	Présidente
Mme Moumene S.	MAA	USDB	Promotrice
Mr Ali Ossalah A.E.A	MAA	USDB	Examineur
Mme Chebata N.	MAA	USDB	Examinatrice

Promotion 2011- 2012

Remerciements

Je remercie Dieu de m'avoir donné, la force, la santé et le courage de pouvoir achever ce travail. Je tiens vivement à remercier tous ceux qui m'ont orientée et idée de près ou de loin à l'élaboration de ce mémoire.

*Mes vifs remerciements vont à ma promotrice **Mme Moumene S.** qui a suivi la progression de ce travail, avec ses conseils d'encouragement et surtout son aimable bienveillance, sa compréhension et sa gentilles. Ainsi Le degré de responsabilisation de son encadrement.*

*Mes profonds remerciements sont adressés à la présidente de jury, notre respectable professeur **Mme Houmani Z.** pour m'avoir fait l'honneur de présider le jury de soutenance. Ma reconnaissance est incommensurable et qui dépit de ses responsabilité a bien voulu me proposer ce sujet, pour sa disponibilité, malgré ses nombreuses occupations, elle arrivait à trouver du temps pour une rencontre, pour ses conseils. Qu'elle trouve ici l'expression de mes plus vifs remerciements.*

Je tiens à remercier mes examinateurs ;

***Mr ALI OUSSALAH A. E. H** qui en dépit de ses responsabilités a accepté avec gentillesse de jurer ce travail, qu'il trouve ici l'expression de mon plus vifs remerciements et respect.*

***Mme CHABATA N.** qui a accepté avec gentillesse de jurer ce travail, Qu'elle trouve ici l'expression de ma gratitude.*

***Mr BELLATRECHE M.** qui je dois une reconnaissance particulière pour sa précieuse contribution à la réalisation de la partie statistique, et l'intérêt qu'il a porté à ce travail.*

Je voudrai exprimer ma profonde gratitude à mes tantes mes oncles qui mon ont continuellement apporté un support indispensables à la réalisation de mes buts aussi pour leur soutien et tout ce qu'ils ont fait pour moi.

Je suis profondément reconnaissante aux ingénieurs de laboratoire de recherches (de biotechnologie des plantes médicinales de l'université de Blida) où s'est déroulée une partie de ce modeste travail, qui n'auraient jamais existés sans l'aide de ^{Melle} Feniche Sihame et ^{Mme} Marmouze Rabab et à qui j'adresse mes vifs remerciements.

Mon profond respect envers l'ensemble des ingénieures de la Station Régionale de la Protection des Végétaux Boufarik: ^{Melles} DOUNIA, SABRINA et KHADIDJA pour l'aide qu'elles m'ont apportée et pour leurs soutiens au cours de la partie expérimentale, qu'elles trouvent ici l'expression de ma reconnaissance.

Je tiens à remercier Mr le Directeur de SRPV de Boufarik qui m'accueillie au sein de son laboratoire en mettant à ma disposition les conditions et le matériel nécessaires pour la réalisation de ce travail.

Dédicaces

Je dédie cette thèse...

*Avec une attention particulière à la mémoire de mon cher frère **Youcef** que Dieu
le tout puissant l'accueille en son vaste paradis.*

*A ceux qui m'ont transmis l'éducation, le sérieux et beaucoup de valeurs
humaines à mes parents :*

***A ma mère**, pour sa gentillesse, son affection, sa douceur, sa tendresse, ses
encouragements éternels et qui sans elle rien n'aurait été possible.*

***A mon père**, pour son attachement, ses chaleureux encouragements.*

*A mon adorable sœur **ASMA** pour son soutien sa patience et son aide
,sa tendresse.*

*A mes chers frères **Mohamed** et **Adel** pour leur gentillesse et leur disponibilité*

*Et à mes deux familles **ARBIA** et **DEBOUZA***

A mes cousines, cousins et toutes mes amies

Enfin, à tous ceux que ma mémoire porte et mon mémoire ne peut supporter.

Pouvoir antifongique *in vitro* et *in vivo* des extraits de feuilles de *Laurus nobilis* L., à l'égard de *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary. agent responsable du mildiou de la pomme de terre en Algérie.

Résumé

Le Mildiou de la Pomme de terre connaît une recrudescence suite à l'apparition récente de souches agressives de *Phytophthora infestans* de type A2 résistantes aux fongicides du groupe des phénylalamides (dont la matière active est le métalaxyl). Dans le cadre de la lutte biologique contre cette maladie et suite à l'efficacité révélée des extraits de feuilles de *Laurus nobilis* L., du genre *Laurus* à l'encontre des champignons, nous avons opté pour l'étude de leurs pouvoir antifongique à l'égard de la souche de *P. Infestans* A2 par la technique de contact direct sur un milieu à base de petits pois Agar *in vitro* et *in vivo* sur les feuilles détachées de la variété de pomme de terre : *Spunta* pour lesquelles plusieurs modalités d'application des traitements ont été prises en considération. Deux modes de traitements ont été utilisés préventif par trempage des feuilles détachées dans les suspensions des extraits pure et à plusieurs dilutions, un mode curatif après inoculation par l'agent pathogène.

On observe une réduction importante de la maladie pour la souche A2, la réduction atteint 100% *in vitro* pour le traitement par l'extrait de l'huile essentielle de feuilles de *Laurus nobilis* L., et avoisine de 80 % pour l'extrait aqueux appliqué *in vitro*. Les dilutions les plus efficaces recommandés qui ont enregistré les pourcentages maximums de réduction de la maladie et de l'inhibition de la sporulation est la concentration minimale : 1/50 d'extrait aqueux. Les traitements *in vivo* au mode préventif par trempage, des deux extraits des feuilles de *Laurus nobilis* L., et leurs dilutions montrent un pouvoir antifongique très fort ainsi par le mode curatif par l'huile essentielle.

Ce travail confirme le pouvoir antifongique *in vivo* et *in vitro* vis-à-vis de *P.infestans*, ce qui laisse envisager leur application en plein champ et l'exploitation de leurs potentialités biofongicides dans la gestion du mildiou de la Pomme de terre.

Mots clés: *Laurus nobilis* L., *Phytophthora infestans*, *Solanum tuberosum*, huile essentielle, extrait aqueux, antifongique.

Liste des abréviations

A2 : Souche de *Phytophthora infestans* du type sexuel A2 isolée de la région de Meftah.

AFNOR : Association Française de Normalisation.

CMI : Concentration Minimale Inhibitrice.

Cm : Centimètres.

CPG : Chromatographie en Phase Gazeuse.

D1 : La première dose « pure » de l'huile essentielle et l'extrait aqueux.

D2 : La deuxième dose « 1/10^{ème} » de l'huile essentielle et l'extrait aqueux.

D3 : La troisième dose « 1/50^{ème} » de l'huile essentielle et l'extrait aqueux.

D4 : La quatrième dose « 1/100^{ème} » de l'huile essentielle et l'extrait aqueux.

DT : Diamètre de la croissance mycélienne du champignon témoin.

Dt : Diamètre de la croissance mycélienne du champignon traité.

EA: Extrait Aqueux.

FAO: Food and Agriculture Organisation.

GLM: General Linear Model.

(Gr x 100): Grossissement 10 du microscope photonique.

(Gr x 500): Grossissement 40 du microscope photonique.

g : Gramme.

h : Heure.

HU : Huile essentielle.

I : Inhibition de la croissance mycélienne du champignon.

Inf : Infection.

INPV : Institut National de Protection des Végétaux.

IS : Taux d'inhibition de la sporulation en %.

ITCMI : Institut Technique des Cultures Maraichères et Industrielles.

L : Litre.

MS : Matière sèche.

OGM : Organe Génétiquement Modifier.

PAL : Palissadique.

PPA : Milieu de culture à base de petits pois Agar.

PS : Poids sec.

PF : Poids Frais.

qx/ha : Quanto sur hectare.

Rdt : Rendement en huile essentielle en ml par apport à 100g de matière sèche.

ST : Concentration en sporanges de l'inoculum.

St : Concentration en sporanges de l'inoculum traité.

mm : Millimètres.

mn : Minutes.

ml : Millilitre.

V : Volume.

µl : Microlitre.

Liste des Tableaux

Tableau 1 : Classification botanique de <i>Laurus nobilis</i> L.,.....	6
Tableau 2 : Composition principale de l'huile essentielle de <i>Laurus nobilis</i> . L cultivé en Algérie (Yakhlef, 2010).....	11
Tableau 3 : Classification botanique de <i>Solanum tuberosum</i> L. (Cousin, 2011).....	15
Tableau 4 : Bilan global de production de la pomme de terre de consommation et de multiplication durant la campagne 2009/2010 (MADR, 2011).....	17
Tableau 5 : Principales maladies et principaux parasites limitant la culture de la pomme de terre (Anonyme, 2008).....	18
Tableau 6 : Classification de <i>Phytophthora infestans</i> (Legemble, 2008).....	19
Tableau 7 : Analyse de la variance de la croissance mycélienne des extraits testés.....	41
Tableau 8 : Variabilité de la croissance mycélienne de la souche A2 de <i>P.infestans</i> sous traitements des différentes dilutions des extraits de <i>Laurus nobilis</i> L., testées.....	42
Tableau 9 : Variabilité de l'inhibition de la sporulation de la souche A2 de <i>P.infestans</i> en fonction de la nature des deux extraits des feuilles de <i>Laurus nobilis</i> L., testées.....	44
Tableau 10 : Variabilité de l'inhibition de la sporulation de souche A2 de <i>P. infestans</i> sous traitements des différentes dilutions des extraits des feuilles de <i>Laurus nobilis</i> L.,.....	45
Tableau 11 : Effet des extraits des feuilles de <i>Laurus nobilis</i> L., sur la sporulation de la souche A2 de <i>P.infestan</i>	46
Tableau 12 : Analyse de la variance des taux d'infection <i>in vivo</i> en fonction de la nature des extraits, et le mode de traitement.....	48
Tableau 13 : Variabilité de taux d'incidence de la souche A2 de <i>P.infestans</i> sous traitements des extraits de <i>Laurus nobilis</i> L., testées par le mode préventif.....	49
Tableau 14 : Taux de l'incidence des Symptômes du mildiou sur les feuilles de pomme de terre traitées par les différentes doses d'extrait aqueux sur le <i>P.infestans</i> au mode curatif.....	50
Tableau 15 : Variabilité de taux d'incidence des symptômes de la maladie sur les feuilles sous traitements à base des extraits de <i>Laurus nobilis</i> L., testées selon le mode curatif à plusieurs dilutions.....	50

Liste des Figures

Figure 1 : Les feuilles de <i>Laurus nobilis</i> . L (plantes-et-jardins.com).....	4
Figure 2 : les fleurs de <i>Laurus nobilis</i> . L (Arbre-species.blogspot.com).....	5
Figure 3 : les fruits de <i>Laurus nobilis</i> L. (Beloued, 2005).....	3
Figure 4 : Localisation des cellules contenant les huiles essentielles <i>Laurus nobilis</i> .L (Teuscher et al., 2005).....	10
Figure 5 : Morphologie d'un sporange (A : structure asexuée) et d'une oospore (B : structure sexuée) de <i>P.infestans</i> (Legemble ,2008).....	19
Figure 6 : Symptômes du mildiou sur tiges, tubercules et feuilles de la Pomme de Terre (Al-Mughrabi, 2011).....	21
Figure 7 : Cycle biologique du <i>Phytophthora infestans</i> (Photo Originale).....	22
Figure 8 : Isolat de <i>Phytophthora infestans</i> (Souche A2) (Photo Originale).....	27
Figure 9 : Les feuilles récoltées du jardin d'essai d'El Hamma (Photo Originale).....	27
Figure 10 : Feuilles de la variété Spunta de pommes de terre (Photo Originale).....	28
Figure 11 : Feuilles de <i>Laurus nobilis</i> L., séchées. (Photo Originale).....	28
Figure 12 : Feuilles préparées pour le traitement et l'inoculation (Photo Originale).....	29
Figure 13 : Schéma de macération par l'eau distillée de la poudre de <i>Laurus nobilis</i> L.,.....	30
Figure 14 : Incubation des boites dans l'incubateur (Photo Originale).....	33
Figure 15 : Préparation des feuilles de Pomme de Terre (Photo Originale).....	35
Figure 16 : Inoculation des feuilles détache en mode curative. (Photo Originale).....	36
Figure 17 : Coupe transversale d'une feuille de <i>L. nobilis</i> . (Gr x 100)(Photo originale).....	39
Figure 18 : Variabilité de la croissance mycélienne en fonction de la nature des extraits (l'huile essentielle et extrait aqueux).des feuilles de <i>Laurus nobilis</i> L.....	41
Figure 19 : Taux d'inhibition de la croissance mycélienne de la souche A2 de <i>P.infestans</i> en modèle GLM en fonction de la nature des extraits et leurs dilutions.....	42
Figure 20 : Morphologie de l'isolat A2 de <i>P.infestans</i> témoin (Gr : x 500). (Photo originale).....	44
Figure 21 : Morphologie de l'isolat A2 de <i>P.infestans</i> traité par l'huile essentielle des feuilles de <i>Laurus nobilis</i> L., à dilution 1/100 (Gr : x 500). (Photo originale).....	44
Figure 22 : Morphologie d'isolat A2 de <i>P.infestans</i> traité par l'extrait aqueux des feuilles de <i>Laurus nobilis</i> L., à dilution 1/100 (Gr : x500) (Photo originale).....	45

Figure 23 : Variabilité de taux d'inhibition de la sporulation de l'extrait aqueux, l'huile essentielle et le témoin.....	46
Figure 24 : Taux d'inhibition de la sporulation de <i>P.infestans</i> sous l'effet des extraits des feuilles de <i>Laurus nobilis</i> L., à différentes dilutions.....	47
Figure 25 : Morphologie des sporanges de <i>P.infestans</i> observée au microscope photonique (Gr : x 500).....	47
Figure 26 : Analyse de la variance en modèle GLM de l'apparition des symptômes selon les modes d'application des traitements.....	49
Figure 27 : Taux d'incidence des symptômes de <i>P.infestans</i> sous l'effet des extraits de <i>Laurus nobilis</i> L., à différentes dilutions au traitement préventif par trempage.....	50
Figure 28 : Variabilité de taux d'incidence des symptômes du mildiou sous l'effet des extraits de <i>Laurus nobilis</i> L., à différentes dilutions au traitement curatif.....	51
Figure 29 : Pouvoir antifongique des extraits des feuilles de <i>Laurus nobilis</i> L. <i>in vivo</i> sur la souche A2 de <i>P.infestans</i> par traitement curatif.....	52
Figure 30 : Développement des symptômes du mildiou sur les disques foliaires témoins....	53

Introduction

Les extraits bruts des plantes commencent à avoir beaucoup d'intérêt comme source potentielle de molécules naturelles bioactives. Ils font l'objet d'étude pour leur éventuelle utilisation comme alternative pour le traitement des maladies infectieuses et pour la protection des aliments contre l'oxydation.

Les extraits bruts de la plante aromatique *Laurus nobilis* L., qui appartient à la famille des lauracées. Elle est parmi les plantes les plus utilisées comme source mondiale d'épices et d'extraits à qualité médicale intéressante, son utilisation fréquente par nos populations dans le domaine culinaire et celui de la médecine traditionnelle, à coté du fait que son huile essentielle est utilisées dans les industries alimentaires, pharmaceutique et cosmétique, leur efficacité dans le traitement symptomatique de troubles de l'appareil digestif supérieur reconnue traditionnellement, elle représente récemment un sujet de recherche scientifique intéressant. (Yakhlef, 2010).

La Pomme de Terre (*Solanum tuberosum* L.) occupe le 4ème rang mondial après le riz, le blé et le maïs. Elle est cultivée par plus de 150 pays sur une superficie de 20 millions d'hectares. Sa production mondiale est de 323 millions de tonnes. Elle est considérée comme le légume le plus consommé dans le monde. Elle présente en effet l'avantage de produire plus de nourriture nutritive que toute autre grande culture sur moins de terres et que 85% de la plante est comestible pour l'homme, contre environ 50% pour les céréales. En Algérie 100 000 ha sont réservés annuellement à la production de la pomme de terre, soit 27 % de la superficie totale consacrée aux cultures maraîchères (Revue Agricole, 2008).

Actuellement, plusieurs questions sont soulevées concernant l'incidence croissante des maladies phytopathogènes inféodées à cette culture, plus particulièrement les infections fongiques où le mildiou de la pomme de terre, causé par *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary. est l'une des maladies les plus redoutables et les plus préjudiciables de cette culture. Jusqu'à présent, la lutte chimique reste le moyen de contrôle le plus utilisé contre cette maladie. Cependant, l'utilisation des pesticides a trouvé plusieurs contraintes qui s'expliquent aussi bien par le coût élevé de ces fongicides, que par leurs effets néfastes sur l'environnement et sur la santé du consommateur (Rakotonindraina, 2008). Aussi, des souches agressives de cette maladie, la plupart résistantes aux fongicides synthétiques courants ont fait leur apparition ces dernières années, créant de nouveaux défis pour les producteurs de pommes de terre (Kuepper & Sullivan, 2004).

Afin de réduire les risques liés à l'utilisation massive des pesticides, la recherche agronomique s'est de plus en plus intéressée, au-delà des pratiques phytosanitaires alternatives à l'emploi de pesticides (Butault et *al.*, 2010). Ainsi, Différents essais ont déjà mis en évidence l'action de certains extraits végétaux et des huiles essentielles contre l'agent pathogène du mildiou de la pomme de terre (Latten, 1994; Blaeser, 1999; Wang et *al.*, 2001; Rashid et *al.*, 2004).

Dans ce contexte, nous nous sommes intéressés à :

- L'étude anatomique de la feuille de *Laurus nobilis* L.
- L'extraction de l'huile essentielle et l'extrait aqueux des feuilles de *Laurus nobilis* L.
- L'étude de l'évaluation de l'activité antifongique des huiles essentielles et des extraits aqueux purs et dilués de *Laurus nobilis* sur *Phytophthora infestans*. tout en déterminant le pouvoir antifongique *in vitro* sur la croissance mycélienne, la sporulation, la détermination des concentrations inhibitrices minimales et létales ainsi que l'inhibition de la survie après traitements. En outre, évaluer *in vivo* sur feuilles détachées de pomme de terre, son effet sur la réduction de la maladie.

Sommaire

Introduction	1
Chapitre I : Partie Bibliographique	
1. Généralités sur la plante	3
1.1 Historique	3
1.2 Répartition géographique	3
1.3 Description botanique de <i>Laurus nobilis</i> L.....	3
1.4 Systématique de <i>Laurus nobilis</i> L.	6
1.5 Multiplication et plantation de <i>Laurus nobilis</i> L.....	6
1.6 Exigences climatiques et édaphiques	7
1.7 Entretien de la culture.....	7
1.8 Pays producteurs et exportateurs de <i>Laurus nobilis</i> L.....	7
1.9 Mesures de conservation de <i>Laurus nobilis</i> L.....	8
1.10 Utilisation des feuilles de <i>Laurus nobilis</i> L.	8
2. Huile essentielle de <i>Laurus nobilis</i> L.	9
2.1 Localisation des huiles essentielles de <i>Laurus nobilis</i> L.....	9
2.2 Composition chimique de <i>Laurus nobilis</i> L.....	13
2.3 Domaines d'application des extraits de <i>Laurus nobilis</i> L.....	14
2.4 Effets biologique des extraits des feuilles de <i>Laurus nobilis</i> L.....	16
3 Généralités sur la culture de la pomme de terre	18
3.1 Description botanique.....	18
3.2 Taxonomie	18
3.3 Historique de la pomme de terre.....	16
3.4 Exigences climatiques et édaphiques de la pomme de terre	16
3.5 Importance Economique de la pomme de terre en Algérie.....	16
3.6 Problèmes phytosanitaires de la pomme de terre en Algérie	17
4. Généralités sur l'agent pathogène	19
4.1 Systématique.....	19
4.2 Micromorphologie.....	19
4.3. Spécificité parasitaire	20

5. Généralités sur le mildiou de la pomme de terre	20
5.1. Historique	20
5.2 Symptômes	24
5.3 Importance économique de la maladie	24
5.4 Le cycle évolutif de la maladie	25
5.5 Lutte contre le mildiou de la pomme de terre	27

Chapitre II : Matériels et Méthodes

2. Introduction	26
2.1 Matériel biologique	26
2.2. Méthodes	28
2.3 Etude du pouvoir antifongique <i>in vitro</i> et <i>in vivo</i> de <i>L.nobilis</i> L., à l'égard de <i>P .infestans</i>	34

Chapitre III : Résultats et Discussion

3.1 Structure anatomique de la feuille de <i>Laurus nobilis</i> L.	39
3.2 Rendements en matière sèche, des extraits de <i>L. nobilis</i>	39
Discussion.....	40
3.3 Activité antifongique des extraits des feuilles de <i>L. nobilis</i> L. vis-à-vis de <i>P.infestan</i>. 44	
3.3.1 Pouvoir antifongique <i>in vitro</i>	44
3.3.2 Pouvoir antifongique <i>in vivo</i>	47
Discussion.....	57
Conclusion	58
Références Bibliographique	60

Introduction

L'Algérie offre des opportunités exceptionnelles de variations climatiques, et de ressources hydriques, tous favorables à la flore spontanée, notamment celle qui flatte aussi délicieusement la vue, le goût et l'odorat issue de *Laurie sauce* (Amirouche, 2011).

La plante aromatique *Laurus nobilis* L., qui appartient à la famille des *lauracées*. Elle est parmi les familles de plantes les plus utilisées comme source mondiale d'épices et d'extraits à qualité médicale intéressante. Son utilisation fréquente dans le monde entier, dans le domaine culinaire et celui de la médecine traditionnelle, à côté du fait que leur huile essentielle est utilisée dans les industries alimentaires, pharmaceutique et cosmétique, leur efficacité dans le traitement symptomatique de troubles de l'appareil digestif supérieur reconnue traditionnellement, elles représentent récemment un sujet de recherche scientifique intéressant. (Yakhelf, 2010).

Les extraits bruts de cette plante commencent à avoir beaucoup d'intérêt comme source potentielle de molécules naturelles bioactives. Ils font l'objet d'étude pour leur éventuelle utilisation comme alternative pour le traitement des maladies infectieuses. (Atanda et al. 2007).

La Pomme de Terre (*Solanum tuberosum* L.) occupe le 4ème rang mondial après le riz, le blé et le maïs. Elle est cultivée par plus de 150 pays sur une superficie de 20 millions d'hectares. Sa production mondiale est de 323 millions de tonnes. Elle est considérée comme le légume le plus consommé dans le monde. Elle présente en effet l'avantage de produire plus de nourriture nutritive que toute autre grande culture sur moins de terres et que 85% de la plante est comestible pour l'homme, contre environ 50% pour les céréales. En Algérie 100 000 ha sont réservés annuellement à la production de la pomme de terre, soit 27 % de la superficie totale consacrée aux cultures maraîchères (Revue Agricole, 2008).

Actuellement, plusieurs questions sont soulevées concernant l'incidence croissante des maladies phytopathogènes inféodées à cette culture, plus particulièrement les infections fongiques où le mildiou de la pomme de terre, causé par *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary. est l'une des maladies les plus redoutables et les plus préjudiciables de cette culture. Jusqu'à présent, la lutte chimique reste le moyen de contrôle le plus utilisé contre cette maladie. Cependant, l'utilisation des pesticides a trouvé plusieurs contraintes qui s'expliquent aussi bien par le coût élevé de ces fongicides, que par leurs effets néfastes sur l'environnement et sur la santé du consommateur (Rakotonindraina, 2008). Aussi, des souches agressives de cette maladie, la plupart résistantes aux fongicides synthétiques

courants ont fait leur apparition ces dernières années, créant de nouveaux défis pour les producteurs de pommes de terre (Kuepper & Sullivan, 2004).

Afin de réduire les risques liés à l'utilisation massive des pesticides, la recherche agronomique s'est de plus en plus intéressée, au-delà des pratiques phytosanitaires alternatives à l'emploi de pesticides (Butault et *al.*, 2010). Ainsi, Différents essais ont déjà mis en évidence l'action de certains extraits végétaux et des huiles essentielles contre l'agent pathogène du mildiou de la pomme de terre (Latten, 1994; Blaeser, 1999; Wang et *al.*, 2001; Rashid et *al.*, 2004).

Dans ce contexte, nous nous sommes intéressés à :

- L'étude anatomique de la feuille de *Laurus nobilis* L.
- L'extraction de l'huile essentielle et l'extrait aqueux des feuilles de *Laurus nobilis* L.
- L'étude de l'évaluation de l'activité antifongique des huiles essentielles et des extraits aqueux purs et dilués de *Laurus nobilis* sur *Phytophthora infestans*. tout en déterminant le pouvoir antifongique *in vitro* sur la croissance mycélienne, la sporulation, la détermination des concentrations inhibitrices minimales et létales ainsi que l'inhibition de la survie après traitements. En outre, évaluer *in vivo* sur feuilles détachées de pomme de terre, son effet sur la réduction de la maladie.

1. Généralités sur la plante

1.1 Définition et Etymologie

Avant d'être Laurier-sauce, il s'appelait Laurier commun, Laurier d'apollon ou Laurier-noble, un arbre vénéré par les romains et béni par les chrétiens, aux jeux pythiques

grecs les vainqueurs recevaient une couronne de laurier. On nomme aussi "lauréat", celui qui réussit ses examens : il reçoit une couronne de laurier, non pas avec des feuilles, mais avec des baies (*bacca laurea*), d'où "baccalauréat", littéralement "baies de laurier" (Hurtel., 2002).

1.2 Répartition géographique

Le *Laurier noble* ou (*Laurier sauce*) est répandu dans les régions tempérées et subtropicales, en Asie, dans les pays d'Amérique donnant sur l'Atlantique et en Afrique, il a envahi tout le bassin méditerranéen et les régions d'Europe. Le laurier sauce constitue l'espèce dominante des pourtours de la Méditerranée. Il se présente sous forme d'arbrisseaux ou de petits arbres de 3 à 6m de hauteur en formation dense. Le sous-bois est ombragé avec des strates arbustives et herbacées à faible recouvrement. Cet habitat est présent en région méditerranéenne de la Provence jusqu'en Grèce mais la répartition exacte reste à préciser (SAGE, 2012).

En Algérie, Le *Laurier noble* c'est une espèce spontanée qui pousse dans les lieux humides et ombragés (Iserin, 2001). Il est le plus commun dans les forêts à climat caractérisé par des précipitations concentrées pendant la période hivernale, s'étalant du mois d'Octobre au mois d'Avril (Beloued, 1998 ; Mekious et Houmani, 2002).

C'est une espèce pionnière qui se régénère abondamment dans les vieux jardins, en particulier en sous-bois. Elle apprécie les terrains relativement fertiles (terre de jardin, terreau de fumier décomposé), et bien drainés exemple : (le Jardin d'Essai d'El Hamma) où elle est cultivée comme plante ornementale (Iserin, 2001).

1.3 Description botanique de *Laurus nobilis* L.

Laurus nobilis L., membre de la famille des lauracées qui renferme 32 genres et environ 2000-2500 espèces (Barla et al., 2007). *Laurus*, nom latin, d'origine celte qui veut dire « toujours vert » allusion au feuillage persistant de la plante (Pariante, 2001).

Laurus nobilis L., arbuste à petit arbre mesurant de 2 à 10 mètres de haut (Ducatillion, 2010) aromatique, glabre, vert, très rameux, à tige dressé droite grise dans sa partie basse et verte en haut à pollinisation entomogame (Iserin, 2001 ; Demir et al., 2004 ; Beloued, 2005).

Il est intéressant de noter que cette plante qui était pendant longtemps employée dans la nourriture comme condiment et en médecine traditionnelle a, en faite, des propriétés qui peuvent suggérer de nouvelles applications (Ferreira et al., 2006).

1.3.1 Feuilles de *Laurus nobilis* L.

Les feuilles sont alternées, coriaces et légèrement ondulées sur les bords, lancéolée en court pétiole, à penne innervées, de 16 cm de longueur sur 8 cm de largeur, rigides et persistantes. Elles sont luisantes vert foncées et glacées sur leur face supérieure mais plus pales en dessous (Demir et *al.*, 2004).

Elles sont assez touffues, dégageant une forte odeur aromatique agréable si on les froisse, c'est la conséquence de l'existence de grosses cellules sécrétrices éparses dans le mésophile des limbes (Mitchell, 1993).



Figure 1 : Les feuilles de *Laurus nobilis* L., (plantes-et-jardins.com)

1.3.2 Fleurs de *Laurus nobilis* L.

Les fleurs de *Laurus nobilis* L. sont petites dioïques, d'un blanc crème virant au jaune, odorantes groupées par 4 à 5 en petites ombelles axillaires pédonculées apparaissent en mars-avril (Neves et Valente, 1992).

Des fleurs involuquées et périanthe pétaloïde à 4 divisions obovales égales ; les fleurs mâles ont 8 à 12 étamines disposés sur 2 rangs, à anthères s'ouvrant de la base au sommet par des valvules ; 1 style court et épais, à stigmate subcapité ; ovaire libre, entouré de 2 à 4 staminodes tripartites ; drupe noire, à une seule graine (Godron, 1990).



Figure 2 : les fleurs de *Laurus nobilis* L., (Arbre-species.blogspot.com).

1.3.3 Fruits de *Laurus nobilis* L.

Les fruits sont des petites baies ovoïdes, de 2cm de longueur sur 1cm de largeur de couleur noire violacé vernissés à maturité et nus. (Iserin, 2001 ; Demir et *al.*, 2004 ; Beloued , 2005). Plus au moins sphériques à pédoncule très court, récoltés en Juillet – Août (Reynauds, 2002).



Figure 3 : les fruits de *Laurus nobilis* L., (Beloued, 2005)

1.4 Systématique de *Laurus nobilis* L.

Laurus nobilis L., est le seul arbuste comestible de la famille des *Lauracées*. Sa classification se réfère à celle proposée par Quezel et Santa (1962) synthétisée ci dessous (Tableau1).

Tableau 1 : Classification botanique de *Laurus nobilis* L.

Règne	Plantes
Sous règne	Plantes vasculaires
Embranchement	Spermaphytes
Sous embranchement	Angiospermes
Classe	Dicotylédones
Sous classe	Dialypétales
Ordre	Laurales

Famille	Lauracées
Genre	<i>Laurus</i>
Espèce	<i>Laurus nobilis</i> L.

En effet, on ne doit pas confondre ce laurier noble avec d'autres espèces ligneuses fâcheusement appelées *Laurier-noble*. Selon les variétés et les cultivars, on distingue :

- *Laurus nobilis* 'Aurea' (feuillage doré).
- *Laurus nobilis* 'Crispa' (feuilles au bord crispé).
- *Laurus nobilis* 'Bay Junior ' (croissance lente, port compact, petites feuilles : cultivar parfait en topiaire).
- *Laurus nobilis* 'Sunspot' (feuillage panaché de crème)

1.5 Multiplication et plantation de *Laurus nobilis* L.

Le laurier se plante de préférence en automne. Pour le rempotage des sujets en pot, cette période est également la plus propice (Wizelis, 2011).

La multiplication de *Laurus nobilis* L., se fait par semis en automne (possible mais difficile à réussir) (Hurtel ., 2002), ou à partir des semences (très astreignante) au printemps , on effectue la plantation dans un baquet qu'on rentre après les premières gelées nocturnes, pour les conserver entre 4 et 6°C, l'arrosage doit être régulier, tout en évitant l'accumulation d'eau ; dès le début du mois d'Avril , on peut à nouveau sortir les plants, mais dans un endroit ensoleillé et abrité (Wizelis, 2011).

La multiplication par bouturage se fait en Août en terre de bruyère et sable, avec les sujets vigoureux à partir des boutures constituées de fragments de tiges portant 4 ou 5 feuilles, également par marcottage et division des rejets (Wizelis, 2011).

1.6 Exigences climatiques et édaphiques

Le laurier est généralement rustique. Il résiste jusqu'à -10°C ou -15°C. Il supporte les embruns marins et résiste simultanément à la sécheresse et à l'ombre. Il peut être exposé au plein soleil ou éventuellement mi-ombre, mais il aime la lumière à l'abri des vents froids. La plante supporte mal l'hiver (Teuscher et *al.*, 2005) .

Il pousse idéalement dans un sol riche, léger et sablonneux, acide à calcaire et bien drainé (Wizelis, 2011).

1.7 Entretien de la culture

Laurus nobilis L., est une plante méditerranéenne : il n'a généralement pas besoin d'être arrosé (sauf pour les sujets en pots ou en bacs). Quelques arrosages en période de sécheresse, durant les premières années de l'arbre, peuvent cependant être nécessaires. Apportez du compost chaque année, au printemps. Rempotez le laurier en pot tous les 2 ou 3 ans (Wizelis, 2011).

La taille n'est pas obligatoire, mais on peut tailler en fin d'hiver afin de conserver une forme particulière à l'arbre. Enfin, il est conseillé d'installer un paillage au pied de l'arbre pour protéger ses racines en cas de gel. Si les parties aériennes de l'arbre sont détruites par le gel : on rabatte au ras du sol, la souche repartira par rejets. (Wizelis, 2011). Le laurier sauce est très résistant aux maladies mais facilement contaminé par des cochenilles et/ou de la fumagine, ce qui lui donne un aspect disgracieux. (Ducatillion, 2010).

1.8 Pays producteurs et exportateurs de *Laurus nobilis* L.

Les principaux pays producteurs de *Laurus nobilis* L., sont : l'Italie, la Grèce, la Turquie, la Syrie, l'Espagne, le Maroc, l'Albanie et la France, mais aussi le Groupement des états indépendants (autre de la Mer noire), ainsi que l'Amérique centrale et l'Amérique du Sud. Les pays du bassin méditerranéen, notamment la Turquie, la Syrie sont les principaux pays exportateurs de cette plante (Teuscher et *al.*, 2005).

1.9 Mesures de conservation de *Laurus nobilis* L.

Vu la présence de la plus grande station de *Laurus nobilis* L., qui est une espèce protégée en Algérie et qui est aussi menacée par les coupes illicites, une protection plus vigoureuse serait nécessaire au niveau des forêts Algériennes.

Les sites de laurier pourraient, de ce fait, constituer un laboratoire pour des recherches surtout que nos connaissances sont préliminaires sur cette plante. Les études de cette espèce sont nécessaires afin de comprendre sa valeur.

Son classement sur la Liste RAMSAR permettra certainement d'y prévoir des mesures de conservation plus spécifiques et de dégager des financements pour réaliser des opérations de réhabilitation et de protection (FDR, 2008).

1.10 Utilisation des feuilles de *Laurus nobilis* L.

Les feuilles de *Laurus nobilis* L., sont parmi les assaisonnements les plus connus dans tous les pays, elles sont généralement utilisées comme épice valable en culinaire (en potages, ragoûts, sauce,...) et aromatisant en industrie alimentaire. Cette plante a aussi des applications importantes en médecine traditionnelle et représente récemment un sujet de recherche scientifique intéressant (Simi et *al.*, 2003), le laurier est principalement utilisé, par voie orale, dans le traitement symptomatique des troubles de l'appareil digestif supérieur tels que le ballonnement épigastrique (Iserin, 2001).

L'extrait aqueux est utilisé dans la médecine traditionnelle en tant qu'anti hémorroïdal, antirhumatismal, diurétique et comme un antidote dans des morsures de serpent et pour le traitement du mal d'estomac (Kivçak et Mert, 2002).

L'huile essentielle obtenue des feuilles de cette plante a été employée pour le soulagement d'hémorroïdes et des douleurs rhumatismales (Sayyah et *al.*, 2002). En outre, elle est employée par l'industrie cosmétique en parfumerie. Elle compte parmi les meilleurs moyens d'éloigner les insectes gênants (Demir et *al.*, 2004 ; Beloued .,2005).

2 Huile essentielle de *Laurus nobilis* L.

L'huile essentielle extraite des feuilles de Laurier est d'aspect liquide mobile limpide, de couleur jaune très pâle à jaune foncée, d'odeur aromatique, douce, fine, chaude ou épicée. (Castilho et *al.*, 2005).

2.1 Localisation des huiles essentielles de *Laurus nobilis* L.

L'huile essentielle de *Laurus nobilis* L., se situe sous l'épiderme supérieur de la feuille, une double, voire triple couche de parenchyme palissadique peut être observé, qui renferme comme le parenchyme médullaire de nombreuses cellules sécrétrices arrondies ; ces dernières sont de grandes tailles et particulièrement abondantes à proximité ; ces dernières sont de grandes tailles et particulièrement abondantes à proximité des épidermes, certaines contiennent du mucilage. Une coupe superficielle de l'épiderme supérieur montre des cellules polyédriques à parois épaisses, les parois cellulaires radiales sont ondulées à dentelées et apparaissent ponctuées (Figure 4 : A) (Peyron, 1970).

L'huile essentielle de *Laurus nobilis* L., se caractérise par la présence de fragments provenant de l'épiderme supérieur, formés des cellules de forme irrégulière, à parois épaisses et grossièrement ponctuées, d'où leur aspect en « collier de perles ». Les fragments provenant de l'épiderme inférieur se repèrent par la présence des cellules épidermiques à parois peu épaisses mais accompagnées de nombreuses stomates avec deux cellules annexes disposées dans un axe longitudinal parallèle à l'ouverture de l'ostiole, la poudre présente également des fibres lignifiées (Figure 4 : B), souvent accompagnée de faisceaux libéro-ligneux, cellules scléreuses et de grosses cellules sécrétrices ovale (Teuscher et *al.*, 2005).

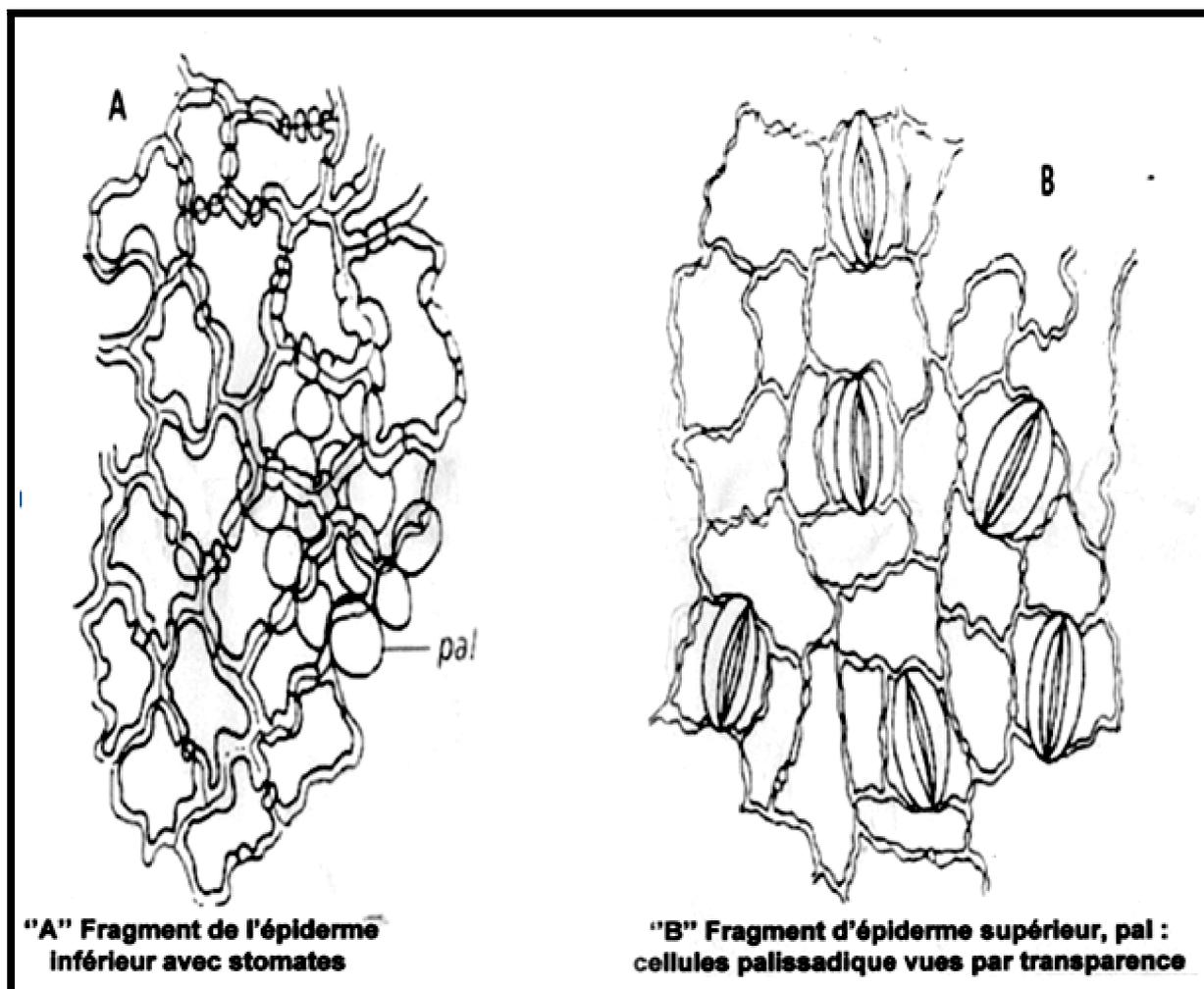


Figure 4 : Localisation des cellules contenant les huiles essentielles *Laurus nobilis* L. (Teuscher et *al.*, 2005).

2.2 Composition chimique de *Laurus nobilis* L.

La composition de l'huile essentielle de laurier est exprimée en pourcentage de divers composés des familles des oxydes terpéniques, des monoterpénols, des phénols des monoterpènes, des sesquiterpènes et des esters terpéniques (Flamini et *al.*, 2007).

L'analyse de l'huile essentielle des feuilles de laurier Algérien (Yakhlef, 2010) a identifié la présence d'une trentaine de composés, représentant un pourcentage de 73,24 % du volume total de l'huile essentielle. L'huile essentielle de laurier est riche en 1,8-cinéole (23,2%) et en acétate d' α -terpényl (19,5 %). Cette huile contient, aussi, un pourcentage de terpinène-4-ol (6%) et de limonène (3,6 %) ; Selon le (Tableau 2).

La composition chimique de l'huile essentielle de *Laurus nobilis* L., en Algérie a eu un semblable à celui publié pour huiles de différents pays. Cette analyse chimique a révélé que cette huile essentielle a montré une tendance similaire à ceux publiés pour d'autres régions géographiques (Ozcan, 2005).

Tableau 2 : Composition principale de l'huile essentielle de *Laurus nobilis* L., cultivé en Algérie (Yakhlef, 2010)

Temps. Rét	Composant	%*	RI**
13,87	α -Terpinène	0,81	1179
14,3	2,3 Hydro-1,8-cinéole	0,48	1192
14,49	Limonène	3,58	1198
14,96	1,8-cinéole	23,17	1214
25,63	Terpinène-4-ol	6,03	1611
26,27	Myrténal	0,85	1639
26,73	Acétate de Terpinène	1,51	1659
27,23	α -Terpinéol	1,43	1680
27, 58	Acétate d'α-Terpényl	19,50	1706
27,95	Bornéol	0,34	1712
28,15	Carvone	0,25	1721
28,41	Valencène	1,96	1733

*Pourcentage basé sur l'aire normalisée du chromatogramme Moyenne de deux répétitions.

** Indice de rétention.

2.3 Domaines d'application des extraits de *Laurus nobilis* L.

La composition chimique de l'huile essentielle offre des débouchés importants dans de nombreux domaines industriels, mais également en agriculture où elle est utilisée en tant que pesticides naturels:

2.3.1 Parfums et Cosmétiques

Dans le domaine des parfums et cosmétiques, l'huile de *L.nobilis* est employée en tant qu'agent conservateur grâce à ses propriétés antiseptiques qui permettent d'augmenter la durée de conservation du produit. Cependant, c'est surtout pour sa caractéristique odorante qu'elle est utilisée, notamment dans la formulation de parfums, de produits d'entretien personnels. (AFSSAPS, 2008).

2.3.2 Santé

En pharmacie, l'huile de *L.nobilis* est majoritairement destinée à l'aromatisation des formes médicamenteuses et à la production d'antiseptiques. (Bruneton, 1999). La propriété de cette huile telle que la pénétration aisément dans la peau (principalement due aux terpènes) permettrait de faciliter l'administration des médicaments par voie transdermique. (Bruneton et al., 2007).

2.3.3 Agro-alimentaire

L'ensemble des secteurs de l'agro-alimentaire sont consommateurs de l'huile essentielle de *L.nobilis* (Bruneton, 1999) vu leur efficacité et non toxicité (Rozman et al., 2007). L'utilisation traditionnelle des feuilles de cette plante dans l'industrie alimentaire est reliée non seulement à l'odeur et à l'arôme plaisant (Rozman et al., 2007) mais, aussi à ses propriétés conservatrices (Burt, 2004 ; Tiwari et al., 2009, Rozman et al., 2007).

2.3.4 Agriculture

La volonté de réduire l'utilisation des pesticides de synthèse dans l'agriculture moderne s'est affermie ces dernières années, notamment en Algérie avec l'intervention des politiques de l'Environnement est un bon exemple de la prise de conscience environnementale (MAP., 2008).

Dans ce contexte, les pesticides naturels basés, notamment, sur les huiles essentielles et les extraits aqueux des plantes aromatiques dont les extraits de *L.nobilis* représentent une alternative intéressante pour la protection des cultures contre les insectes mais également contre les adventices et les champignons (Dayan., 2009 ; Isman, 2000) . Outre, leurs activités biologiques, les extraits naturels présentent d'autres caractéristiques qui en font des produits adaptés dans la lutte contre les nuisibles (Isman, 2010). Parmi celles-ci, on peut citer :

- leur prix faible et approvisionnement assurés par une production mondiale importante pour de nombreuses huiles essentielles,
- leurs multiples modes et sites d'action sur les insectes,
- leur faible toxicité pour les mammifères (à quelques rares exceptions près),
- leur faible persistance dans l'environnement due à leur volatilité (temps de demi-vie en extérieur < 24 h sur les surfaces, dans les sols ou l'eau) (Hernandez et *al.*, 2001).

2.4 Effets biologique des extraits des feuilles de *Laurus nobilis* L.

2.4.1 Effets fumigènes et insecticides

Récemment, il ya un intérêt croissant pour l'utilisation probable des extraits de plantes comme solution de rechange aux insecticides synthétiques. Treize huiles essentielles dont ceux de *Laurus nobilis* L., ont été examinées sous leurs formes de vapeur contre une espèce d'insecte attaquant les produits stockés, *Acanthoscelides obtectus* (bruche du haricot). Les résultats ont indiqués que l'huile essentielle des feuilles de *Laurus nobilis* L., a une action répulsive, réduit la fécondité, diminue la couvaison d'œufs, augmente la mortalité larvaire de nouveau-né et influence défavorablement l'apparition de progéniture. Une étude similaire a été réalisée par Erler et ses collaborateurs en 2006. De même, l'activité fumigène de certains composés qui se produisent naturellement dans les huiles essentielles des plantes aromatiques dont cinéol, eugénol et linalol, composés principales (Papachristos et Stamopoulos, 2002).

2.4.2 Effet antifongique

L'huile essentielle de *Laurus nobilis* L., a révélé son pouvoir inhibiteur *in vitro* sur la croissance mycélienne de *Phytophthora infestans* selon la méthode de contact directe d'une manière dose dépendante. En effet, l'inhibition totale a été enregistrée à 51,2 µg /ml (Soylu et *al.*, 2006). Simic et *al.* (2004) ont affirmé que 1,8 – Cinéole semble être le constituant antifongique dominant de cette huile essentielle. En revanche, cette dernière a plutot montré son effet stimulateur *in vitro* sur la croissance mycélienne d'*Aspergillus flavus* mais a réduit la concentration de son aflatoxine de 55.21% (Atanda et *al.*, 2007).

2.4.3 Effet antioxydant

L'activité antioxydante des extraits méthanoliques (bruts et dégraissés) des feuilles, d'écorce et des fruits de *Laurus nobilis* L., ont été étudiés au niveau de la peroxydation des lipides (LP) dans les liposomes. Les résultats ont montré que tous les extraits testés possédaient une activité antioxydante.

L'extrait dégraissé des feuilles a montré une inhibition plus élevée du LP que l'extrait brut et les autres extraits. Le maximum de son activité (68,4%) a été atteint avec une plus petite quantité (2,0 mg) (Simi et *al.*, 2003).

Ferreira et *al.* (2006) ont étudié l'activité antioxydante de trois extraits (huile essentielle, extrait éthanolique et décoction) de dix espèces de plantes médicinales dont *Laurus nobilis* L., cette espèce a montré des valeurs élevées pour l'activité antioxydante pour chacun des trois extraits mais, elle a été plus importante pour les extraits polaires. Par ailleurs, Demo et *al.* (1998) ont mis en évidence la présence de la vitamine E dans la fraction apolaire obtenue par extraction d'hexane à partir des feuilles de *Laurus nobilis* L., Cette étude a affirmé que le contenu est strictement corrélé avec l'activité antioxydante de l'extrait hexane des feuilles.

3 Généralités sur la culture de la pomme de terre

3.1 Description botanique

La pomme de terre est une espèce herbacée, vivace par ses tubercules mais qui est généralement utilisée comme une plante annuelle. Elle se reproduit naturellement par multiplication végétative, grâce à un tubercule dit "mère" qui est planté. Il émet des ramifications à partir de ses bourgeons qui, dans leurs parties aériennes, produisent des feuilles, fleurs, graines et fruits. Les bourgeons souterrains émettent des ramifications appelées stolons au bout desquels se forment des tubercules, renflements où s'accumulent des réserves. Le tubercule mère, les tiges et les stolons émettent aussi des racines pour approvisionner la plante en éléments minéraux. En utilisant ce mode de reproduction, on obtient à chaque fois la même plante du point de vue génétique, que l'on peut appeler un clone. Ce phénomène est naturel chez les végétaux (Dorothee, 2011).

3.2 Taxonomie

Le genre *Solanum* auquel appartient la pomme de terre, rassemble environ mille espèces dont plus de deux cents sont tubéreuses présent un peu partout dans le monde (Cousin, 2011). En effet, la pomme de terre *Solanum tuberosum* L. est classée comme suit :

Tableau 3 : Classification botanique de *Solanum tuberosum* L. (Cousin, 2011).

Règne	végétal
Sous règne	Plantes vasculaires
Embranchement	Spermaphytes ou Phanérogames
Sous embranchement	Angiospermes
Classe	Dicotylédones
Ordre	Gamopétales ou Métachlamydées
Famille	Solanacées
Genre	<i>Solanum</i>
Genre et espèce	<i>Solanum tuberosum</i> L.

3.3 Historique de la pomme de terre

La pomme de terre existe depuis plus de 8000 ans. Elle est originaire d'Amérique du sud, plus exactement près du lac Titicaca dans les hauts plateaux andins de la cordillère des Andes au sud du Pérou et au nord de la Bolivie (Spooner et *al.*, 2005). Elle fut introduite en Europe par l'Espagne, il y a plus de quatre siècles en 1534, puis en France et en Angleterre (Cousin, 2006).

Propagée aussi bien par les Anglais que par les Espagnols, la pomme de terre a gagné le reste de l'Europe (Robuchon, 1994 ; Rousselle et *al.*, 1996). Depuis, elle s'est répandue dans le monde entier (Cousin, 2006).

Cette culture a été ramenée et propagée par les maures andalous en Algérie. Elle a été faite par les français en 1856 et en 1898, mais notre pays était déjà un pays importateur de pomme de terre de consommation (INVA, 2007 ; Carrier, 2008).

La production des plants de pomme de terre n'est pas récente, puisque l'Algérie a produit une partie de ses besoins en semences dans les années 40. Le premier programme de l'Algérie indépendante avait démarré en 1969. La période de 1970 à 1973 a permis de maîtriser les techniques de multiplication avec la formation des contrôleurs et l'encadrement de la production. Devant cette nouvelle situation, le système de contrôle a été renforcé avec la création du CNCC en 1992 qui regroupe le contrôle officiel de l'ensemble des semences et plants. (Haddad, 2009).

3.4 Exigences climatiques et édaphiques de la pomme de terre

La pomme de terre s'accommode à tous les types de sols, exception faite des sols salés et alcalins (Bamouh, 2003). . La température optimale pour la végétation semble se situer entre 15,5 et 21°C (Clarys, 2005).

3.5 Importance Economique de la pomme de terre en Algérie

L'Algérie figure parmi les pays producteurs de la pomme de terre avec une production de 3.290.000 tonnes en 2010 sur une superficie d'environ 130 000 ha. L'importance de la production est due à la position géographique du pays qui permet une bonne acclimatation à la culture de pomme de terre. Cette dernière est largement répandue car, c'est un aliment de base après les céréales (FAO, 2010 ; Anonyme, 2012).

Ainsi, l'Algérie est le deuxième pays producteur de pomme de terre dans le monde arabe après l'Égypte et le quatrième producteur en Afrique (FAO, 2008).

La pomme de terre est cultivée sur tout le territoire, y compris dans les oasis du sud du pays, avec l'apparition récente du bassin spécifique d'El Oued, où la pomme de terre est devenue une spéculation majeure en quelques années. Cependant, si l'on retient les quinze wilayas où elle occupe plus d'un millier d'hectares, on pourra alors distinguer dans les zones du littoral et du sublittoral, trois bassins de production (Chehat, 2008) ; A l'Ouest, celui constitué par les wilayas de Tlemcen, Mostaganem et Chlef ; Au Centre, celui regroupant les wilayas d'Ain Defla, Tipaza, Alger, Boumerdes, Bouira et Tizi- Ouzou ; A l'Est, représenté par la wilaya de Skikda sur le littoral et de Guelma, Setif, Mila et Batna à l'intérieur. Les wilayas d'El oued, Mascara, Mostaganem et Ain Defla représentent les principales localités productrices (Tableau 4). Les variétés Spunta, Désirée, Kondor, Batina, Timate et Atlas sont les plus cultivées (MADR, 2011).

Tableau 4 : Bilan global de production de la pomme de terre de consommation et de multiplication durant la campagne 2009/2010 (MADR, 2011).

Wilaya	Superficie réalisée	Superficie récoltée	Production obtenue	Rendement q/ha
S/T ouest	37359	37158	9173986	247
S/T Centre	44283	43633	12294888	282
S/T Est	18582	18398	4300905	234
S/T Sud	21349	21349	6830430	320
TOTAL GENERAL	121574	120537	32600208	270

* S / T : Superficie Total

3.6 Problèmes phytosanitaires de la pomme de terre en Algérie

Les cultures de pommes de terre sont très affectées par les maladies à virus. La pomme de terre est sensible aux maladies, aux ravageurs (Tableau 5) et aux fluctuations climatiques. (Changins et *al*, 2008).

Sans oublier les risques de contamination des productions sur champ dues à des pucerons vecteurs de viroses et qui sont la cause des déclassements des semences. (Bensemmane, 2008).

Tableau 5 : Principales maladies et principaux parasites limitant la culture de la pomme de terre (Anonyme, 2008).

	Maladie	Agent causal
Maladies bactériennes	Flétrissement bactérien de la pomme de terre	<i>Ralstonia solanacearum</i>
	Jambe noire de la pomme de terre	<i>Erwinia carotovora</i>
	Flétrissement bactérien de la pomme de terre	<i>Clavibacter michiganensis subsp. sepedonicus</i>
	Gales communes de la pomme de terre	<i>Streptomyces scabies</i>
	Mildiou de la pomme de terre	<i>Phytophthora infestans</i>
	alternariose	<i>Alternaria solani</i>
	Verticilliose	<i>Verticillium spp.</i>
Maladies fongiques	Gales argentées de la pomme de terre	<i>Helminthosporium solani</i>
	Gales poudreuses de la pomme de terre	<i>Spongospora subterranea</i>
	Dartrose	<i>Colletotrichum coccodes</i>
	Galles verruqueuses	<i>Synchytrium endobioticum</i>
	Flétrissement fusarien	<i>Fusarium spp</i>
Nématodes parasites	Taches noires de la pomme de terre	<i>Alternaria alternata</i>
	Nématodes à kyste	<i>Globodera pallida</i> , <i>Globodera rostochiensis</i>
	Nématodes à galles	<i>Meloidogyne spp</i>
Maladies virales	PVY genre <i>Potyvirus</i>	<i>Virus Y de la pomme de terre</i>

Insectes parasites

<i>PVX</i> genre <i>Potexvirus</i>	<i>Virus X de la pomme de terre</i>
<i>PLRV</i> genre <i>Luteovirus</i>	
<i>PVS</i> genre <i>Potyvirus</i>	<i>Virus S de la pomme de terre</i>
<i>PVA</i> genre <i>Potyvirus</i>	<i>Virus A de la pomme de terre</i>
doryphore de la pomme de terre	<i>Leptinotarsa decemlineata</i>
Teigne de la pomme de terre	<i>Phthorimaea operculella</i>

4. Généralités sur l'agent pathogène

4.1 Systématique

L'agent phytopathogène responsable du mildiou est classé comme suit :

Tableau 6 : Classification de *Phytophthora infestans* (Legemle, 2008).

Classe	Oomycètes
Ordre	Péronosporales
Famille	Pythiacées
Genre	<i>Phytophthora</i>
Genre et espèce	<i>Phytophthora infestans</i>

4.2 Morphologie

Phytophthora infestans possède un mycélium coenocytique hyalin et à développement endogène (Chamont, 2010). Ces derniers en position terminale ont une forme et une taille variable selon les isolats. Les sporanges sont citriformes avec présence d'une papille apicale, et renferment des cellules mobiles appelées zoospores qui assurent la reproduction asexuée (Figure 5 : A). Ces zoospores se déplacent grâce à deux flagelles dissemblables, (Bouchet et al., 2000). Les oospores sont pour la plupart de forme aplerotic avec un diamètre moyen d'environ 30 µm (Gallegly et Hong, 2008) (Figure 5 : B). Les oogones sont globuleuses, d'un

diamètre de 37 μm , alors que les anthéridies sont amphygynes et généralement de forme allongée (Gallegly et hong, 2008).

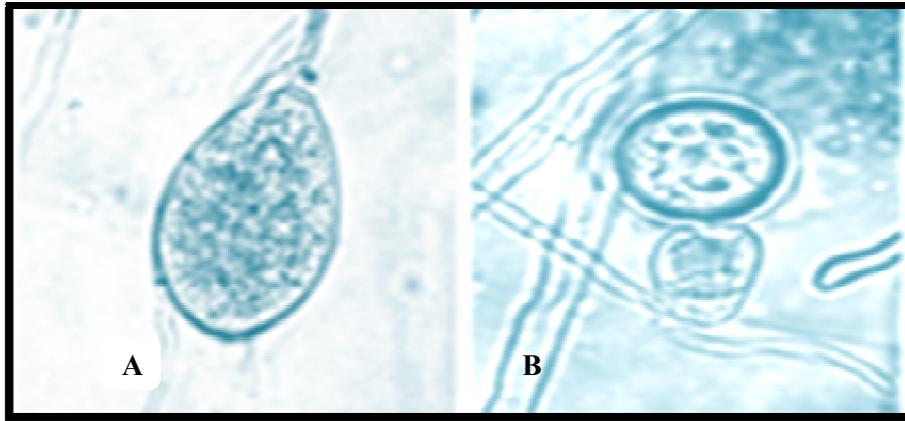


Figure 5 : Morphologie d'un sporange (A : structure asexuée) et d'une oospore (B : structure sexuée) de *P.infestans* (Legemble ,2008).

4.3. Spécificité parasitaire

L'agent phytopathogène *Phytophthora infestans* peut survivre entre les périodes de végétation sous forme de mycélium dans les tubercules et dans les tissus végétaux de la pomme de terre, ainsi que sur les hôtes facultatifs de la famille *Solanaceae* (Al-Mughrabi, 2011).

Le champignon survit pendant l'hiver dans les tubercules contaminés. Il se retrouvera donc au printemps dans les tas d'écarts de triage, les tubercules abandonnés au sol l'année précédente, les tubercules produits par les repousses sauvages et les plants.

La littérature et les observations des centres de recherches indiquent qu'il existe aussi une forme sexuée de reproduction du champignon. Quand une forme A1 est confrontée à une forme A2, dans des conditions propices, les mycéliums peuvent localement fusionner et produire des oospores, fruits d'un brassage génétique, source de variabilité des populations de mildiou. Les oospores peuvent survivre quelques années dans le sol (Ducattillon et *al.*, 2006).

4. Généralités sur le mildiou de la pomme de terre

4.1. Historique

Le mildiou causé par *Phytophthora infestans* est une maladie cryptogamique qui s'attaque aux feuilles, aux tiges et aux tubercules de la pomme. Dans les années 1840, *P. infestans* a provoqué la grande famine européenne marquée par la mort d'un million

d'Irlandais et l'exil d'un autre million et demi (Mercure, 1998). Ces dernières années, des souches extrêmement virulentes de cette maladie la plupart insensibles aux fongicides synthétiques courants ont fait leur apparition, créant de nouveaux défis pour les producteurs de pommes de terre et de tomates (Powelson ; Debra, 1998).

4.2 Symptômes

Provoqué par *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary., le mildiou est l'ennemi numéro 1 de la pomme de terre. Il attaque toutes les parties de la plante ; les jeunes pousses, les feuilles, les pétioles, les bouquets terminaux, les tiges et les tubercules (Figure 6). Ses symptômes développés trois à cinq jours après l'infection initiale, se manifestent par des taches aqueuses circulaires ou irrégulières aux extrémités des feuilles basales, décolorées et entourées d'un halo jaune sur la face supérieure des feuilles, elles s'agrandissent et deviennent brun foncé. En conditions humides, les fructifications du champignon apparaissent sur le pourtour des taches et montrant un duvet blanchâtre (Paitier, 1980 ; Maaaro, 2010).

Sur tige, le symptôme typique est une nécrose brune violacée, s'étendant sur 2 à 10 cm à partir d'un nœud. Par temps humide, cette nécrose se couvre d'une pulvérulence blanche ou grisâtre, formant des organes de multiplication du pathogène (Rousselle et *al.*, 1996).

L'infection des tubercules se manifeste sur la peau par des lésions grisâtres irrégulières. Tandis que la chair présente une altération de couleur brunâtre avec une texture souvent granuleuse. Il en résulte une pourriture sèche (Thurston et Shultz, 1981 ; Henfling, 1987).



Figure 6 : Symptômes du mildiou sur tiges, tubercules et feuilles de la Pomme de Terre (Al-Mughrabi, 2011).

4.3 Importance économique de la maladie

Le Mildiou de la pomme de terre reste l'une des maladies les plus dangereuses des plantes cultivées. Une épidémie extrêmement rapide en conditions favorables augmente l'agressivité. En zone tempérée, les conséquences économiques sont fréquentes et graves. En

effet, une attaque précoce peut entraîner des baisses de rendement de plus de 50 %, une attaque plus tardive détériore la qualité des tubercules (Cousin, 2011).

L'épidémie du mildiou évolue selon une progression géométrique de raison estimée à 100. Comme les cycles de multiplication asexuée sont courts (en pratique, de l'ordre de 4,5 à 7,0 jours durant la saison de production), les dégâts provoqués peuvent être rapidement très importants (Ducattillon et *al.*, 2006).

Une attaque précoce peut réduire fortement le rendement de la culture en tubercules voire même de la réduire à néant, alors qu'une attaque tardive déprécie la qualité du tubercule, donc sa valeur marchande (Moulai, 2010).

4.4 Le cycle évolutif de la maladie

L'évolution du mildiou peut évoluer en plusieurs phases résumées dans la Figure 7. Les sporanges sont disséminés dans la nature par le vent et la pluie et certains d'entre eux atteindront des plantes réceptives. Le sporange peut germer directement et pénétrer dans les tissus de la plante ; mais plus souvent, il subira des divisions cellulaires internes, aboutissant à la formation de 8 zoospores¹ flagellés mobiles dans l'eau. Ces zoospores germent et forment un appressorium en surface de la plante (feuille, tige, tubercule) ou pénètrent par les stomates et l'hyphe pénètre dans les tissus végétaux. Le mycélium envahit les cellules végétales, c'est l'incubation, non visible à l'œil nu. En fin d'incubation, la tache devient visible à l'œil nu, le mycélium est présent à l'extérieur des feuilles et des tiges et peut produire, si la durée de la période humide est suffisante, des sporangiophores produisant des sporanges. Le cycle estival est bouclé. (Ducattillon et *al.*, 2006).



Figure 7 : Cycle biologique du *Phytophthora infestans* (Ducattillon et al., 2006).

Le mildiou causé par le *Phytophthora infestans* a une reproduction à la fois sexuelle et asexuelle. Il donne naissance à des oospores, des spores à la paroi épaisse pouvant survivre pendant des années dans le sol. Lors de leur germination, les oospores produisent des spores asexuelles appelées sporanges qui survivent seulement dans les tissus d'hôtes vivants, comme des pommes de terre rejetées. Ce sont souvent les sources de l'infection qui précèdent une flambée épidémique de la maladie (Ducattillon et al., 2006).

Une fois libérés, les sporanges sont disséminés rapidement par les éclaboussures de la pluie et sur de longues distances par le vent (Williams, 1994). Des conditions humides favorisent le développement de la maladie et une humidité élevée (supérieure à 90 %) accélère le développement des sporanges qui germent rapidement sur des feuilles humidifiées; des plants entiers peuvent ainsi être détruits en un très court laps de temps (Mercure, 1998).

4.5 Lutte contre le mildiou de la pomme de terre

Parmi les outils disponibles pour la lutte contre du mildiou, on compte les systèmes d'alerte au mildiou et les techniques de surveillance, les techniques culturales, la résistance génétique et la pulvérisation de produits de substitution aux produits chimiques et une gestion biologique.

4.5.1 Méthodes préventives et prophylactiques

Dans la lutte contre le mildiou, le dépistage sur le terrain est très important. Les producteurs devraient donc inspecter leurs champs deux fois par semaine. Les symptômes apparaissent d'abord autour des dépressions de terrain, des mares ou des ruisseaux, près des pivots des systèmes d'irrigation par aspersion et dans les endroits à l'abri du vent. Les champs ensemencés tôt sont susceptibles d'être atteints les premiers (Bob et Whalen, 1998).

En effet, plusieurs méthodes peuvent être préconisées à titre préventif :

- Les rotations des cultures peuvent également aider, surtout lorsque les repousses spontanées de pommes de terre deviennent un problème (Caldwell et Brian ; Saling et Travis, 1998).
- L'utilisation de semences certifiées peut diminuer l'infestation causée par des semences malades.
- Le travail du sol visant à enfouir les plants infectés peut également donner des résultats. Il faut détruire tous les plants dans un rayon de 15 pieds du site d'infection (Caldwell et Brian, 1998).
- Ne pas mélanger les lots de semences.
- La plantation doit avoir lieu lorsque les températures du sol sont d'au moins 10 °C. Planter pour une récolte hâtive aide également à éviter l'infection (Caldwell et Brian, 1998).
- Les spores de mildiou peuvent aussi se disperser lors du tranchage et de la plantation des plantons. Un plantoir qui utilise la pression à vide au lieu des ergots ou des cuillères peut contribuer à prévenir l'infection des plantons.
- La profondeur d'enfouissement des plantons et le buttage doivent être surveillés avec soin.
- l'irrigation par aspersion doit être planifiée avec soin.

4.5.2 Lutte chimique

Un programme préventif de vaporisation est toujours recommandé. Une lutte efficace au moyen de fongicide nécessite une bonne couverture du feuillage, des doses convenables et un calendrier d'application adéquat. De manière générale, les fongicides sont plus efficaces aux premiers stades de l'infection, avant l'apparition des symptômes. Toutefois, aucun fongicide ne peut traiter une infection bien établie. Les fongicides contre le mildiou sont essentiellement des fongicides à action préventive et ne sont pas particulièrement persistants. Ils doivent servir à protéger les plants comme le ferait une pulvérisation prophylactique, dans le cadre d'une stratégie globale visant à empêcher que la maladie infecte la récolte (Al-Mughrabi, 2011).

On peut utiliser des traitements cupriques (de cuivre) de façon préventive pour éviter la propagation du mildiou. Plusieurs produits de cuivre commerciaux approuvés sont disponibles Depuis août 2003 (Al-Mughrabi, 2011).

4.5.3 Lutte génétique

Actuellement, il n'y a aucune variété de pomme de terre qui soit totalement résistante au mildiou. Quelques cultivars comme Kennebec, Elba, Onaway, Rosa et Sebago affichent cependant un certain degré de résistance (Anon, 2006 ; Greg et Williams, 1994) et font l'objet d'études approfondies dans les programmes de sélection.

La biotechnologie est également mise à profit dans la recherche sur la résistance au mildiou. On s'attend à voir apparaître bientôt des souches commerciales totalement résistantes génétiquement modifiées (Greg et Williams, 1994). Cependant, des OGM ne seraient pas acceptables en production biologique (Laura et *al.*, 1998).

4.5.4. Lutte biologique

C'est l'utilisation d'organismes vivants ou des substances qu'ils produisent pour limiter ou supprimer les activités et les populations des pathogènes (INRA, 2005).

Ses substances sont des pesticides préparés à partir de produits naturels comme les plantes. Ils sont généralement moins dangereux et sont plus spécifiques à la cible visée par rapport aux pesticides conventionnels. Ils sont efficaces à faible dose et se décomposent rapidement, d'où un impact environnemental moindre même si la matière active est toxique (Fredon, 2008).

2. Introduction

Ce présent travail vise l'étude du pouvoir antifongique *in vivo* et *in vitro* des extraits des feuilles de Laurier sauce (*Laurus nobilis* L.) à l'égard de *P.infestans* agent responsable du mildiou de la pomme de terre. Notre expérimentation s'est déroulée au niveau de la station régionale de la protection des végétaux (SRPV) de Boufarik (Wilaya de Blida). Elle a nécessité l'utilisation d'un matériel biologique et le suivi d'une méthodologie comportant six étapes essentielles :

- Collecte des échantillons de feuilles de la plante aromatique Laurier sauce et des feuilles de la variété *Spunta* de la pomme de terre.
- Préparation des extraits de l'huile essentielle et l'extrait aqueux de Laurier sauce.
- Détermination des rendements en l'huile essentielle et taux d'humidité des feuilles de Laurier sauce.
- Etude histologique des feuilles de Laurier sauce.
- Etude de l'activité antifongique *in vitro* et *in vivo* des extraits de Laurier sauce à l'égard de *P.infestans*.
- Analyse statistique.

2.1 Matériel biologique

Le matériel biologique utilisé regroupe le matériel végétal représenté par les feuilles de *Laurus nobilis* L., les feuilles saines de la variété *Spunta* de pomme de terre et le matériel fongique représenté par une souche Algérienne A2 de *Phytophthora infestans*.

2.1.1 Matériel fongique

Un isolat fongique purifié de *Phytophthora infestans* ; sujet de traitement par les extraits en huiles essentielles et l'autre aqueux des feuilles de *Laurus nobilis* L. L'isolat fongique a été prélevé de la collection des isolats Algériens des zones de production de la pomme de terre il a été isolé de la région de Meftah wilaya de Blida entretenu par repiquage sur milieu à base de petits pois agar (composition voir annexe) et incubé à 18°C pendant 21 jours (Hammi, 2003).

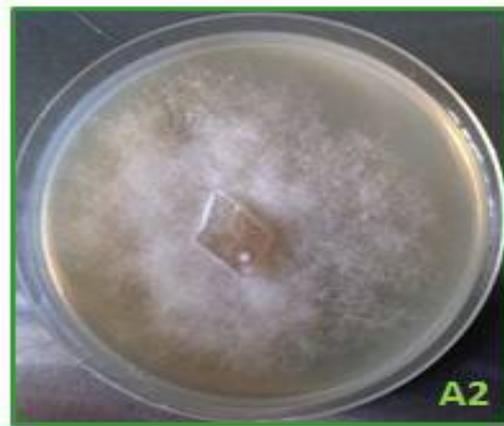


Figure 8 : Isolat de *Phytophthora infestans* (Souche A2) (Photo Originale)

2.1.2 Matériel végétal

2.1.2.1 Feuilles de *Laurus nobilis* L.

Le matériel végétal utilisé pour cette expérimentation est représenté par l'extrait d'huile essentielle et l'extrait aqueux des feuilles d'arbuste de *Laurus nobilis* L., appartenant au genre *Laurus*, de la famille des *Lauracées*, appelé communément : Laurier sauce. La récolte des feuilles a été réalisée, le 02 Mars 2012 entre 11 h et 13 h au jardin d'essai d'El Hamma au printemps sur cinq arbustes de laurier choisis d'une façon aléatoire. Ces arbustes se trouvent généralement en situation mi ombragée, ils ne bénéficient d'aucun entretien, ils sont arrosés de temps à autres de façon irrégulière. Les échantillons des rameaux feuillés de 30 à 50 cm de long situés au sommet des arbustes ont été récoltés à l'état frais près de la mer.



Figure 9 : Les feuilles récoltées du jardin d'essai d'El Hamma (Photo Originale).

2.1.2.2 Feuilles de pomme de terre

Des feuilles saines au stade début de floraison, de la variété *Spunta* de pomme de terre ont été récoltées à partir d'une parcelle, indemne de mildiou, située près de l'ITCMI de Staouli à la wilaya d'Alger.



Figure 10 : Feuilles de la variété Spunta de pommes de terre (Photo Originale).

2.2. Méthodes

2.2.1 Préparation du matériel végétal

2.2.1.1 Préparation des feuilles de *Laurus nobilis* L.

Après la récolte, les échantillons ont été lavés et triés pour garder seulement les feuilles saines et propres, ils ont été étalés sur les paillasses au laboratoire à l'air libre et retournées de temps à l'autre pour éviter l'attaque des moisissures. Après séchage les

échantillons sont coupés en petits fragments pour l'extraction de l'huile essentielle et extrait aqueux.



Figure 11 : Les feuilles de *Laurus nobilis* L., séchées. (Photo Originale).

2.2.1.2 Préparation des feuilles de Pomme de Terre

Selon la méthode de Klarfeld *et al.* (2000) ; Les feuilles saines, ayant un diamètre supérieur ou égale à 30 mm ont été choisies puis découpées à l'aide d'un emporte pièces en disques uniformes lavés à l'eau du robinet.



Figure 12 : Les feuilles préparées pour le traitement et l'inoculation (Photo Originale).

2.2.2 Préparation des extraits de feuilles de *Laurus nobilis*

2.2.2.1 Extraction de l'huile essentielle

L'huile essentielle des feuilles de *Laurus nobilis* L., a été extraite par hydrodistillation. Son principe consiste à immerger la matière végétale directement à traiter dans un alambic rempli d'eau qui est en suite portée à ébullition. Les vapeurs hétérogènes sont condensées sur surface froide et l'huile essentielle se sépare par différence de densité (Bruneton, 1999).

2.2.2.2 Préparation de l'extrait aqueux

Après séchage à l'air libre, les feuilles de *Laurus nobilis* L. , ont été broyées jusqu'à l'obtention de poudre, pesées et récupérées dans une boîte propre conservée à l'abri de la lumière et de l'humidité pour éviter toutes contaminations et dégradation de la matière active. Les extraits aqueux ont été obtenus par décoction de 10 g de poudre végétale dans 100 ml d'eau distillée stérile. Cette opération a été réalisée au niveau de l'autoclave à 180°C pendant 20 minutes dans une fiole bien fermée et cela, afin d'éviter toute forme de contamination provenant des feuilles. L'extrait est récupéré par filtration sur papier Wattman stérile sous une hotte aspirante. Le filtrat obtenu a été récupéré dans des flacons en verres stériles hermétiquement fermés et conservés au réfrigérateur à 4°C jusqu'à son utilisation.

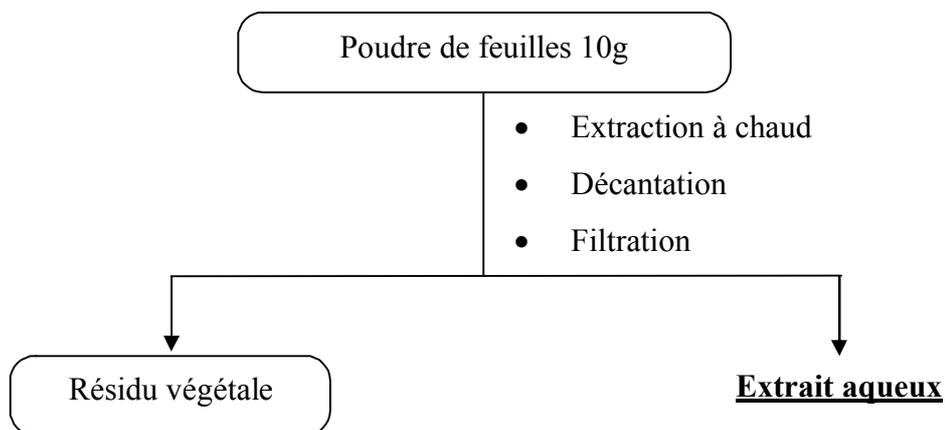


Figure 13 : Schéma de macération par l'eau distillée de la poudre de *Laurus nobilis* L.

2. 2. 3 Rendement et taux d'humidité

2.2. 3.1 Rendements en huiles essentielles

Le volume du distillat obtenu est mesuré soit V (ml), les rendements sont calculés selon la formule suivante :

$$\text{Rdt (\%)} = (V/Ps) \times 100$$

V : volume d'huile essentielle (ml).

Ps : poids sec de la prise d'essai (g).

2.2.3.2 Taux d'humidité des feuilles

Pour connaître le taux de la matière sèche contenue dans la poudre des feuilles sèches de *Laurus nobilis* L., on a appliqué la méthode rapporté par Lindon et Lorient (1994) basée sur la dessiccation à une température de 105°C dans une étuve isotherme, les résultats sont exprimés selon la formule suivante :

$$\text{MS (\%)} = (\text{PS/PF}) \times 100$$

- **MS (%)** : pourcentage de la matière sèche.
- **PS** : poids sec.
- **PF** : poids frais.

En effet, 50g de poudre de l'écorce et des feuilles de *Laurus nobilis* L., ont été placés dans l'étuve à 105 °C pendant 24h. Cette poudre a été retirée puis mise dans le dessiccateur afin d'éliminer l'humidité, puis mesurer la quantité d'eau qu'a perdu cette unité.

2.2.4 Etude histologique des feuilles de *Laurus nobilis* L.

Afin de connaître la structure histologique responsable de la sécrétion des huiles essentielles, des coupes transversales des feuilles de *Laurus nobilis* L., ont été colorées selon la technique de double coloration (bleu de méthyle et rouge Congo) utilisée par de nombreux auteurs rapportés par la bibliographie (Boukhatem 2010 ; Madjene et Madani 2010). Cette technique comprend les étapes suivantes :

- Réaliser des coupes très fines à l'aide d'une lame.
- Mettre les coupes dans de l'eau javel durant 10 à 15 mn puis les rincer environ 10 à 20 mn.
- Les laisser dans du bleu de méthyle pendant 20 minutes puis les rincer.
- Et enfin, dans du rouge Congo pour 5 minutes avant de les rincer.
- Les mettre entre lame et lamelle pour les observer au microscope photonique.

2. 5 Etude du pouvoir antifongique *in vitro* et *in vivo* des extraits des feuilles de *Laurus nobilis* L., à l'égard de *Phytophthora infestans*

La lutte chimique contre le mildiou ou brûlure tardive causée par *Phytophthora infestans*, par l'utilisation de fongicides à base de metalaxyl lui a permis une certaine résistance avec l'apparition des souches agressives du type sexuel A2. (Alim, 2010).

Ainsi, dans le cadre de recherche de méthodes alternatives de lutte biologique contre cette maladie, qui a fait l'objet de plusieurs mémoires de fin d'étude (Serrir et Moussaoui, 2011 ; Saadoune, 2011 ; Bachir, 2011 ; Feniche, 2012 ; Zanoune, 2012). Notre travail représente consiste à étudier le pouvoir antifongique *in vitro* et *in vivo* d'huile essentielle et l'extrait aqueux de *Laurus nobilis* L., à l'égard d'isolat Algérien A2 de *P.infestans*

La survie *in vitro* et *in vivo* de ces derniers traités par les extraits précédents permettra de confirmer leurs effets fongicides ou fongistatiques.

2.5.1 Etude du pouvoir antifongique *in vitro* des extraits des feuilles de *Laurus nobilis* L.

Le pouvoir antifongique *in vitro* a été basé sur l'inhibition de la croissance mycélienne de la souche A2 de *P.infestans* réalisé suivant la méthode de contact directe par Mishra et Dubey (1994) sur milieu PPA maintenu en surfusion à 45 °C. Les procédures microbiologiques, et La concentration minimale inhibitrice (CMI) de l'huile essentielle et celle de l'extrait aqueux ont été déterminées selon la méthode rapportée par Remmal *et al.* (1993), et Satrani *et al.* (2001) in El Ajjouri *et al.* (2008).

2.5.1.1 Préparation des traitements à base des extraits des feuilles de *Laurus nobilis* L.

Des émulsions diluées sont préparées de l'eau distillée stérile avec l'huile essentielle des feuilles de *Laurus nobilis* L., en mesurant à chaque fois et respectivement à l'aide d'une micropipette stérile 10 ml d'eau distillé stérile contre 1000 après 500 et 100 microlitre d'huile essentielle de *Laurus nobilis* L. Pour retenir les dilutions suivantes : 1/10, 1/50 et 1/100.

Ces derniers correspondent respectivement aux doses D2, D3 et D4. Dans des tubes à essais stériles qui ont été soumis à l'agitation à l'aide d'un agitateur de tubes vortex. En outre, l'huile essentielle pure D1 de la même espèce sera aussi appliquée.

On prépare parallèlement l'extrait aqueux à l'état pure et ses dilutions de : 1 /10, 1/50 et 1/100 correspondant respectivement aux doses : D1, D2, D3 et D4.

Pour chaque dilution 1,5 ml des extraits de la plante étudiée est versé dans des boîtes de Pétri à l'aide d'une micropipette stérile sur 13,5 ml du milieu PPA maintenu en surfusion à 45°C est ensuite coulé dans les boîtes contenant les extraits et leurs dilutions. Ces dernières sont légèrement agitées pour homogénéiser le milieu. En ce qui concerne les témoins, les

extraits sont remplacés par l'eau distillée stérile. Chaque dilution sera répétée Cinq fois pour l'isolat phytopathogène.

Ainsi, à l'aide de pipettes Pasteur stériles, un disque d'inoculum de 5 mm de diamètre d'isolat A2 est prélevé puis déposé au centre des boîtes de pétri. Ces dernières seront bien fermées et entourées d'un para film. L'incubation des boîtes ainsi préparées se fait dans l'incubateur réglée à la température de 18°C pour évaluer la croissance mycélienne.

En calculant la moyenne des deux diamètres mesurés sur deux axes perpendiculaires tracés au revers des boîtes de culture, pendant une durée d'incubation de 15 jours.



Figure 14: L'incubation des boîtes dans l'incubateur (Photo Originale).

2.5.1.2 Croissance mycélienne

La concentration minimale inhibitrice de la croissance mycélienne (CMI) a été déterminée pour chaque extrait (d'huile et aqueux) des feuilles de *Laurus nobilis* L., et pour chaque dilution.

Ainsi, les taux d'inhibition de la croissance mycélienne ont été déterminés pour l'isolat de *P. infestans* selon la formule décrite par Sy (1976) et Rollan *et al.* (1999) in Ibarra-Medina *et al.* (2010) :

$$I (\%) = \frac{(I I - I I)}{I I} I 100$$

- I : Taux d'inhibition de la croissance en %.
- DT : Diamètre de la croissance mycélienne du champignon témoin (mm).
- Dt : Diamètre de la croissance mycélienne du champignon traité (mm).

2.5.1.3 Morphologie de l'isolat de *P.infestans* traité et témoin

Pour comprendre et pouvoir définir l'effet de l'huile essentielle et l'extrait aqueux sur l'isolat fongique. Une description structurale a été réalisée après 7 jours d'incubation, par observation directe des cultures traitées et témoins d'isolats A2 de *P.infestans* sous microscope photonique au grossissement (x 500).

2.5.1.4 Sporulation

Après incubation de 21 jours de croissance l'isolat fongique développé sur milieux traité et témoin à la température de 18°C, 15 ml d'eau distillée stérile sont versés dans chaque boîte de culture qui ont été raclées à l'aide d'une pipette pasteur stérile pour récupérer les suspensions sporangiales dans des tubes à essai stérilisés. Ces derniers ont été soumis à l'agitation à l'aide d'un agitateur de tubes vortex. Les suspensions ainsi préparées de l'isolat A2 traité par les extraits ainsi que celles des témoins ont fait l'objet de détermination de la concentration en spores par le biais d'une cellule de Malassez pour déterminer l'inhibition de la sporulation de chaque extraits des feuilles de *Laurus nobilis* L., pour chaque concentration selon la formule de Pandey et *al.* (1982).

$$II (\%) = \frac{(II - I)}{I} \times 100$$

- IS : Taux d'inhibition de la sporulation en %.
- ST : Concentration en sporanges de l'inoculum témoin (sporangies/ml).
- St : Concentration en sporanges de l'inoculum traité (sporangies/ml).

2.5.1.5 Survie de l'isolat de *P.infestans*

La survie de l'isolat phytopathogène de *P.infestans* soumis aux différents traitements à base des extraits des feuilles de *Laurus nobilis* L., a été appliquée sur feuilles détachées de pomme de terre. Afin de confirmer l'effet fongistatique ou fongicide des traitements testés, les extraits de plantes ayant montré une inhibition remarquable sur la croissance mycélienne de l'isolat de *P.infestans* ont été pris en considération, et l'observation a été suivie quotidiennement et prolongée jusqu'à 31 jours dans les boîtes où il n'y a pas eu de germination.

2.5.2 Etude de pouvoir antifongique *in vivo* des extraits des feuilles de *Laurus nobilis* L.

Le pouvoir antifongique *in vivo* consiste à l'inoculation des folioles détachées récupérées de la pomme de terre qui ont subi deux modes de traitement : préventif par trempage et curatif.

2.5.2.1 Traitement préventif par trempage

Dans des boîtes transparentes et stériles, sont déposés respectivement du papier filtre (stérilisé à 120°C pendant 2 h dans un four Pasteur) et du grillage en plastique à la taille des boîtes. Après avoir imbibé le papier filtre d'eau distillée stérile. Les feuilles de pomme de terre détachées lavées et découpées en rond ont été placées en nombre de 5 par boîte.



Figure 15 : Préparation des feuilles de Pomme de Terre (Photo Originale).

Les disques foliaires de chaque boîte ont été soumis au trempage dans les extraits (l'huile essentielle et extrait aqueux) de *Laurus nobilis* L. pure et à différentes concentrations : 1/10, 1/50 et 1/100 durant une minute puis, placés sur la face supérieure dans les boîtes préalablement préparées. Ainsi, l'inoculation se fait sur la face inférieure par dépôt de 100 µl de suspension sporangiale d'ordre de 3×10^5 sporanges/ml de l'isolat A2. En, outre une boîte a été consacrée aux témoins positifs trempés dans l'eau distillée stérile.

2.5.2.2 Traitement Curatif

Ce mode de traitement est réalisé par inoculation des folioles détachées préparées précédemment dans les boîtes transparentes (Figure 15) et par dépôt de 100µl de suspension sporangiale sur leur face inférieure. Après 24h d'inoculation, 80µl des suspensions des extraits (huile essentielle et extrait aqueux) pures et à différentes dilutions : 1/10, 1/50 et

1/100 sont déposées sur les feuilles préalablement inoculées au même point de l'inoculation (Berber *et al.*, 2009).

Par ailleurs, une autre boîte dont les folioles inoculés avec les isolat A2 ont été considérées comme des témoins positifs traité par l'eau distillé stérile (Fontem *et al.*, 2005 ; Khair & Wafaa ; 2007).

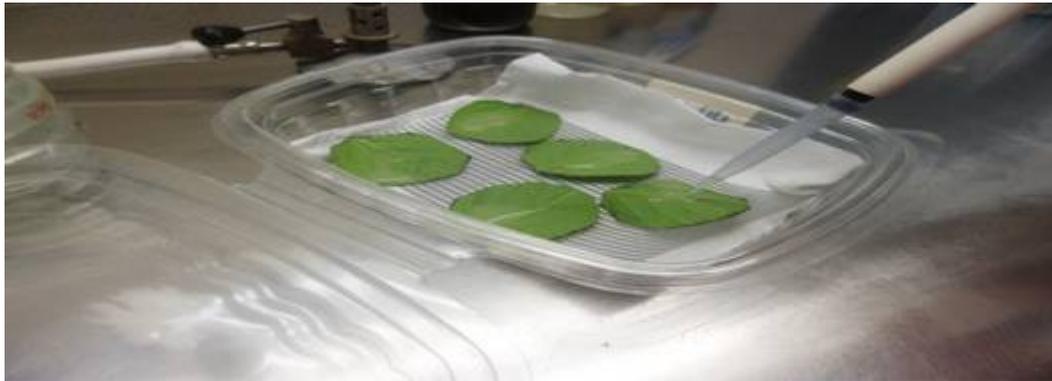


Figure 16 : Inoculation des feuilles détache en mode curative. (Photo Originale).

2.5.2.3 Inhibition des symptômes

La lecture des résultats a porté sur l'expression des symptômes des deux modes d'application étudiés (préventif et curatif) en termes de pourcentage de superficie infectée par le mildiou de la pomme de terre, représentée par le nombre de feuilles présentant des symptômes typiques du mildiou Ainsi, ont été déterminés les % d'inhibition d'expression des symptômes selon la formule proposée par Berber *et al.*(2009) :

$$III (\%) = \frac{(III I - III (I))}{III I} \times 100$$

- Inf : Taux d'infection des feuilles en %.
- Inf T : Taux d'infection des feuilles témoins positifs en %.
- Inf (t): Taux d'infection des feuilles traitées en %.

2.2.6 Analyse statistique

L'activité antifongique des deux extraits de *Laurus nobilis* L., a été indiquée par la mesure des diamètres des colonies fongiques à l'aide d'un double décimètre. Pour la détermination du pouvoir antifongique les Cinq répétitions ont été résumées par le calcul de la

moyenne dans l'Excel, puis le calcul du pourcentage d'inhibition par la formule de Pandey *et al.* (1982).

Afin de vérifier une éventuelle efficacité des extraits vis-à-vis de la souche fongique testée et la comparaison entre le traitement par l'huile essentielle et l'extrait aqueux tout en considérant les dilutions, et le mode d'application des extraits de la plante, nous avons utilisé le logiciel SYSTAT, ver. 12, SPSS 2009, en déterminant la variance à l'aide du GLM (General Linear Model), les différences ont été considérées significatives à $P \leq 0.05$.

L'hypothèse de l'efficacité antifongique des extraits est testée par le modèle de la distance euclidienne à un facteur contrôlé par le logiciel PAST (Paléontological Statistics, ver. 1.81 (Hammer *et al.*, 2001)).

3.1 Structure anatomique de la feuille de *Laurus nobilis* L.

La feuille de *Laurus nobilis* L possède un épiderme fortement cutinisé est présent sur les deux faces mais les stomates n'existent que sur la face abaxiale (Figure 17 : C). On qualifie cette disposition des stomates d'hypostomatique.

En dehors de la nervure principale, le mésophylle présente une structure bifaciale typique (Figure 17 : C). Sous l'épiderme de la face adaxiale se reconnaît un parenchyme palissadique formé de deux assises cellulaires. Chez les Dicotylédones ce parenchyme qui recèle 80 % des chloroplastes est le lieu privilégié de la photosynthèse. Nos coupes sont semblables a celles de Reille et Lavoie (2010).

Du côté de la face abaxiale, le parenchyme est de type lacuneux, dans lequel s'ouvrent les chambres sous-stomatiques. De grosses cellules sécrétrices d'essence se rencontrent dans ces deux types de parenchyme (Figure17 : A, C).

Le cordon vasculaire de la nervure principale est à symétrie bilatérale, en forme de croissant dans la concavité duquel se reconnaissent de nombreux pointements de xylème, désignant la face adaxiale ; des massifs de phloème leur sont superposés. Entre les deux, le cambium libéro-ligneux a produit des files de formations secondaires : bois adaxial et liber. Cette lame vasculaire est entourée d'un manchon de sclérenchyme. Cet ensemble est rigidifié par du collenchyme ; celui de la face adaxiale, sous l'épiderme, donne un bon exemple de collenchyme rond (Figure 17) comme celle de Reille et Lavoie (2010).

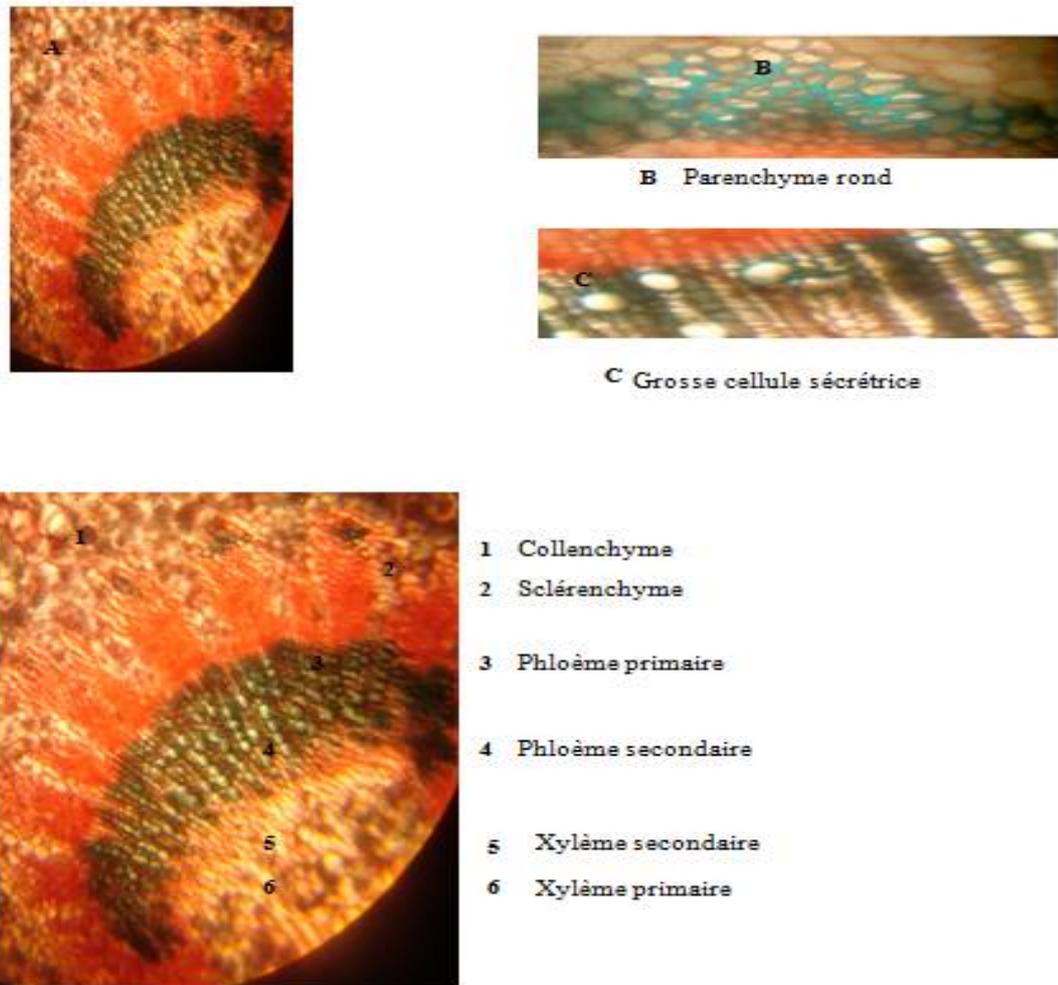


Figure 17 : Coupe transversale d'une feuille de *L. nobilis*. (Gr x 100)(Photo originale).

3.2 Rendements en matière sèche, en huile essentielle et en extrait aqueux de *Laurus nobilis* L.

Un taux d'humidité ($6.79 \% \pm 0.18$) inférieure à 10% a été enregistré pour notre plante *Laurus nobilis* L.

L'extraction des huiles essentielles a permis d'obtenir un rendement en huile essentielle des feuilles compris entre 0,5 et 1, 5%. Ces taux enregistrés sont supérieurs à ceux obtenus par Richard en 1992 (0,5 à 1%) et Plaque en 1997 (1%) pour les feuilles de la même espèce mais récoltées de différentes régions européennes. Mais proches de ceux de l'équipe Algérienne de Chaouche et *al.* (2011) (1,80 %). D'autre part, le rendement en extrait aqueux était de 15,2%.

Discussion

L'examen microscopique des coupes histologiques réalisées sur feuilles de *Laurus nobilis* suivant la technique de double coloration, nous a permis de distinguer les structures responsables de la sécrétion de l'huile essentielle de *Laurus nobilis* L., qui se caractérisent par des cellules sécrétrices localisées dans le mésophylle de la feuille de laurier noble. Elles sont de très grande taille et globuleuses à parois distendues par le produit de sécrétion, une essence responsable de l'odeur caractéristique de ces feuilles. Nos coupes histologiques sont semblables à celles réalisées par Reille et Lavoie (2010).

Par ailleurs, la teneur en eau des feuilles sèches de *Laurus nobilis* L. était inférieure à 10% ce qui confère à notre poudre une meilleure conservation à long terme d'après les travaux de Paris et Moyses (1965), Marzouki et al. (2008) et Yakhlef (2010).

Les résultats des rendements en huiles essentielles obtenus à partir de nos échantillons ont révélé qu'à partir de la même quantité du matériel végétal initiale, des teneurs variables d'une distillation à l'autre où, l'effet individu pourrait jouer un rôle non négligeable. Selon Gaknero (1991), les métabolites secondaires varient quantitativement durant le développement de la plante. En effet, au sein du même échantillon les feuilles ne sont pas toutes au même stade de développement. Dans le même contexte, Mekious et Houmani (2000). Lors de l'hydrodistillation plusieurs perturbations peuvent apparaître sous l'effet de la température de l'eau et la durée d'extraction. Ce qui explique la variabilité inter population des métabolites secondaires. Macchioni et al. (2006) a rapporté aussi les mêmes constatations pour les feuilles de *Laurus nobilis*.

Selon les travaux sur l'huile de laurier sauce de Derwich et al. (2009) publiés au Maroc et ceux de Bouzouita (2010) effectuées en Tunisie comparés à notre étude. La variabilité des rendements en huiles essentielles de *Laurus nobilis* peut être attribué aux facteurs écologiques (Roux, 2008), stade de développement de la plante (Guido et al., 2004; Zoran, 2004 ; Özcan et Chalchat, 2008 ; Zekovic et al., 2009).

Parallèlement, il a été rapporté par la bibliographie que l'extraction aqueuse menée à température ambiante permet d'extraire le maximum de composés et de prévenir leur dénaturation ou modification probable dues aux températures élevées utilisées dans d'autres méthodes d'extraction. Le rendement est relatif et dépend donc de la méthode et des conditions d'extraction. Selon Lee et al. (2003) le contenu total des principes actifs et l'activité biologique de la plante dépend essentiellement de la méthode d'extraction.

3.3 Activité antifongique des extraits des feuilles de *Laurus nobilis* L. vis-à-vis de *Phytophthora infestans*

3.3.1 Pouvoir antifongique *in vitro*

3.3.1.1 Pouvoir antifongique des extraits des feuilles de *Laurus nobilis* L., sur la croissance mycélienne

L'analyse de la variance des pourcentages d'inhibition de la croissance mycélienne n'a pas montré une différence significative entre la nature des deux extraits (l'huile essentielle et extrait aqueux) utilisés (Tableau 7).

Tableau 7 : Analyse de la variance de la croissance mycélienne des extraits testés.

Facteurs	Somme des carrés	d.d.l.	Carrés moyens	F-ratio	P
Nature d'Extrait	1729.593	1	1729.593	5.304	0.027

Cependant, une différence significative a été signalée en modèle GLM et une variabilité a été approuvée entre la nature des extraits par rapport aux taux d'inhibition de la croissance mycélienne de la souche A2 de *P.infestans* (Figure 18).

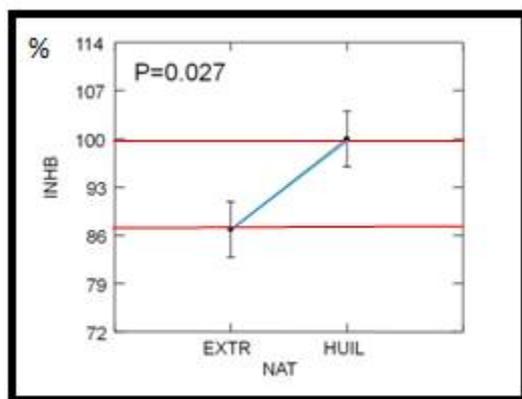


Figure 18 : Variabilité de la croissance mycélienne en fonction de la nature des extraits (l'huile essentielle et extrait aqueux).des feuilles de *Laurus nobilis* L.

Par ailleurs, l'analyse de la variance des pourcentages d'inhibition de la croissance mycélienne n'a pas montré de différence entre les dilutions de l'huile de *Laurus nobilis* L., avec l'huile pure mais la différence était significative au cours du temps entre l'extrait aqueux pure et la dilution 1/100 ainsi les autres dilutions du même extrait (Tableau 8).

Tableau 8: Variabilité de la croissance mycélienne de la souche A2 de *P.infestans* sous traitements des différentes dilutions des extraits de *Laurus nobilis* L., testées.

Facteurs	Somme des carrés	d.d.l.	Carrés moyens	F-ratio	P
Extrait Aqueux	10377.558	3	3459.186	27.496	0.000
L'huile Essentielle	0.000	3	0.000	0.333	0.801

A n'importe quelle dilution de l'extrait aqueux le taux d'inhibition reste 100 % mais la dilution 1/100 de l'extrait aqueux est moins active et l'inhibition est égale à 49.5 %, et qui évolue dans le temps en fonction de la croissance mycélienne de l'isolat fongique.

Parallèlement, la croissance mycélienne était inhibée pour l'isolat A2 qui s'est montré sensible à l'huile testé à différentes dilutions même l'huile pure. Ce dernier n'a montré aucune résistance vis à vis à l'huile testée de *Laurus nobilis* L., en modèle GLM, la croissance de la souche A2 était moins inhibée par la dilution 1/100 d'extrait aqueux de *Laurus nobilis* L. par rapport à la dilution 1/100 de l'huile essentielle (Figure 19).

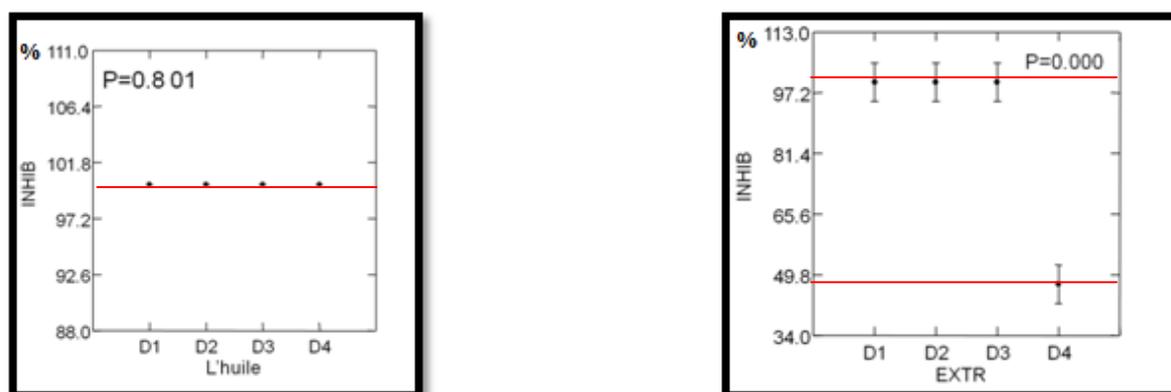


Figure 19: Taux d'inhibition de la croissance mycélienne de la souche A2 de *P.infestans* en modèle GLM en fonction de la nature des extraits et leurs dilutions.

Traitement par l'huile essentielle

Témoin EA pure EA 1/10 EA 1/50 EA 1/100

Traitement par extrait aqueux

Témoin HU pure HU 1/10 HU 1/50 HU 1/100

3.3.1.2 Aspect morphologique de la souche de *P.infestans* traitée par les extraits des feuilles de *Laurus nobilis* L.

L'inhibition de la croissance mycélienne de la souche A2 de *P.infestans* peut être résumée par l'effet de l'huile pure et ses différentes dilutions et l'extrait aqueux pure et ses dilutions : 1/10, 1/50 sur la lyse et la vésiculation du mycélium présentant un diamètre égale à zéro. Ce qui a induit l'inhibition total de la croissance. L'absence de sporulation ou la présence très rare de sporanges, présentant des déformations a réduit le taux de germination et par conséquent la croissance mycélienne. (Figures 22)



Figure 21 : Morphologie de l'isolat A2 de *P.infestans* témoin (Gr : x 500). (Photo originale).



Figure 22: Morphologie de l'isolat A2 de *P.infestans* traité par l'huile essentielle des feuilles de *Laurus nobilis* L., à dilution 1/100 (Gr : x 500). (Photo originale).



Figure 23: Morphologie d'isolat A2 de *P.infestans* traité par l'extrait aqueux des feuilles de *Laurus nobilis* L., à dilution 1/100 (Gr : x500) (Photo originale).

3.3.1.3 Pouvoir antifongique des extraits des feuilles de *Laurus nobilis* L., sur la sporulation

D'autre part, l'analyse de la variance de l'inhibition de la sporulation de *P.infestans* sous l'effet de l'huile et l'extrait aqueux des feuilles de *Laurus nobilis* L., n'a pas montré des résultats hautement significatifs entre la nature des deux extraits utilisés, comparé aussi avec le témoin (Tableau9).

Tableau 9 : Variabilité de l'inhibition de la sporulation de la souche A2 de *P.infestans* en fonction de la nature des deux extraits des feuilles de *Laurus nobilis* L., testées.

Facteurs	Somme des carrés	d.d.l.	Carrés moyens	F-ratio	P
Nature d'Extrait	1.899	2	0.949	3.391	0.041

Cependant, en modèle GLM une variabilité a été approuvée entre la nature des extraits et le témoin par rapport aux taux d'inhibition de la sporulation de A2 de *P.infestans* (Figure 24).

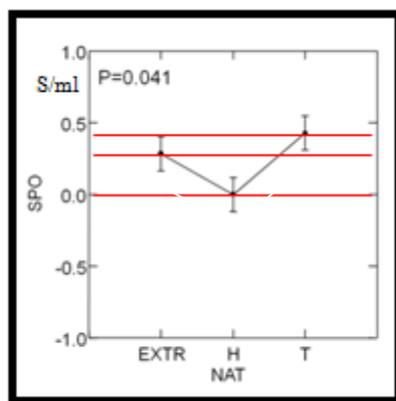


Figure 24 : Variabilité de taux d'inhibition de la sporulation de l'extrait aqueux, l'huile essentielle et le témoin.

L'analyse de la variance des pourcentages d'inhibition de la sporulation n'a pas montré de différence entre les dilutions de l'huile de *Laurus nobilis* L., avec l'huile pure mais la différence était significative au cours du temps entre l'extrait aqueux pure et la dilution 1/100 du même extrait (Tableau 10).

Tableau 10: Variabilité de l'inhibition de la sporulation de souche A2 de *P. infestans* sous traitements des différentes dilutions des extraits des feuilles de *Laurus nobilis* L.,

Facteurs	Somme des carrés	d.d.l.	Carrés moyens	F-ratio	P
Extrait Aqueux	4.852	3	1.617	2366.00	0.000
L'huile Essentielle	0.000	3	0.000	1.000	0.418

La sporulation du champignon traité par l'huile essentielle pure et à différentes dilutions n'était pas marquée après l'observation à l'œil nue et à l'aide du microscope optique. Ainsi pour l'extrait aqueux pure et ses dilutions ; 1/10, 1/50. En effet, le pouvoir antifongique *in vitro* de l'huile essentielle de *Laurus nobilis* L., pure et diluée à 1/10, 1/50 et 1/100 a révélé une efficacité de 100% d'inhibition de la sporulation de l'isolat A2 de *P.infestans* avec l'extrait aqueux pure et dilué à ; 1/10, 1/50 mais par degré moindre de l'extrait aqueux à dilution 1/100 (Figure 25).

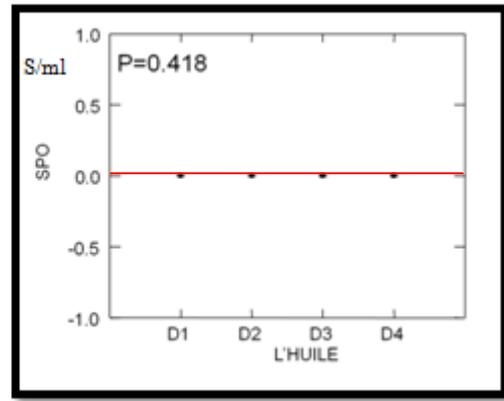
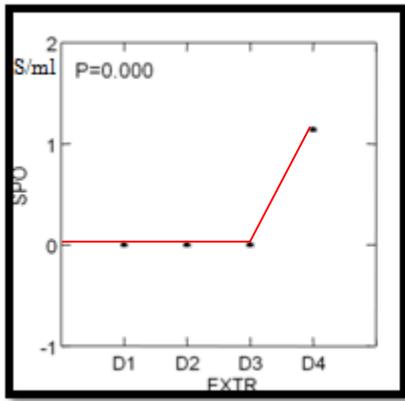


Figure 25 : Taux d'inhibition de la sporulation de *P.infestans* sous l'effet des extraits des feuilles de *Laurus nobilis* L., à différentes dilutions.



Figure 26 : Morphologie des sporanges de *P.infestans* observée au microscope photonique (Gr : x 500).

Cependant, il était important donc de déterminer leur effet fongistatique ou fongicide. (Tableau 11).

Tableau 11 : Effet des extraits des feuilles de *Laurus nobilis* L., sur la sporulation de la souche A2 de *P.infestans*.

Traitement	Taux de sporulation (x 10 ⁵ Sporangies/ml)
Témoin	0,4
L'huile pure	0
L'huile 1/10	0
L'huile 1/50	0
L'huile 1/100	0
Ex aqueux pure	0
Ex aqueux 1/10	0
Ex aqueux 1/50	0
Ex aqueux 1/100	0,2

3.3.1.4. Survie de *P.infestans* traité par l'huile essentielle et l'extrait aqueux de *Laurus nobilis* L.

En effet, les explants mycéliens de l'isolat A2 préalablement inhibé par l'huile pure et dilué, aussi l'extrait aqueux pure et dilué aux concentrations 1/10, 1/50 sur milieu PPA frais n'a pas permis la reprise de croissance de ces derniers jusqu'à même un mois d'incubation. Dans ce sens leur non survie affirme leur efficacité avec un effet fongicide par une forte inhibition de la sporulation de l'isolat A2 de *Phytophthora infestans*.

3.3.2 Pouvoir antifongique *in vivo*

Dans cette partie du travail, on compare l'effet des deux extraits des feuilles de *Laurus nobilis* L., testés à deux modes de traitements préventif par trempage et curatif sur la souche A2 de *P.infestans* qui a été estimé par apport aux taux d'infection enregistrés sur les disques foliaires exprimant l'expression des symptômes du mildiou sur les feuilles de pomme de terre traitées par les deux extraits.

L'analyse de la variance des pourcentages du pouvoir infectieux de *P.infestans* a montré une différence significative entre les deux modes de traitements. L'analyse de la variance des taux d'incidence n'a pas montré des différences significatives entre la nature des extraits appliqués au mode préventif. Parallèlement, une différence significative a été révélée pour le mode curatif entre ses derniers (Tableau 12).

Tableau 12 : Analyse de la variance des taux d'infection *in vivo* en fonction de la nature des extraits , et le mode de traitement.

Facteurs	Somme des carrés	d.d .l	Carrés moyens	F-ratio	P
Mode de traitement	2787.840	1	2787.840	9.811	0.002
Traitement Préventif	0	1	0	0	1
Traitement Curatif	840.500	1	840.500	1.593	0.213

En modèle GLM, les taux d'incidence des symptômes ont permis le classement des modes d'application dans l'ordre décroissant suivant (Figure 27).

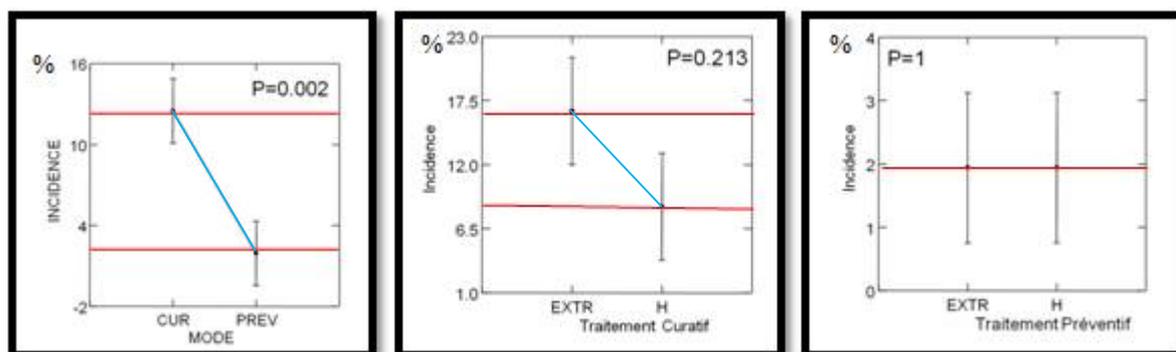


Figure 27: Analyse de la variance en modèle GLM de l'apparition des symptômes selon les modes d'application des traitements.

3.3.2.1 Traitements Préventifs

Les traitements préventifs avec l'extrait aqueux et l'huile essentielle de *Laurus nobilis* L., pure et à différentes dilutions ont montré un pouvoir antifongique contre l'isolat A2. Le témoin (+) a considérablement révélé des signes de la maladie par apport au mode de traitement utilisé et les deux extraits étudiés ; nous a renseigné sur l'état des feuilles, et sur la virulence du champignon. (Tableau 13).

Tableau 13 : Variabilité de taux d'incidence de la souche A2 de *P.infestans* sous traitements des extraits de *Laurus nobilis* L., testées par le mode préventif.

Facteurs	Somme des carrés	d.d.l.	Carrés moyens	F-ratio	P
HU (Traite Préventif)	7056.000	4	1764.000	6.481	0.002
EA (Traite Préventif)	376.360	4	94.090	4.027	0.015

En modèle GLM, l'absence des symptômes de la maladie selon ce mode d'application par les deux extraits de *L.nobilis* est comprise entre 2.5 et 5 jours. Le témoin a montré des symptômes rapidement. Ainsi, le classement des dilutions applique a été établi dans l'ordre suivant (Figure 28).

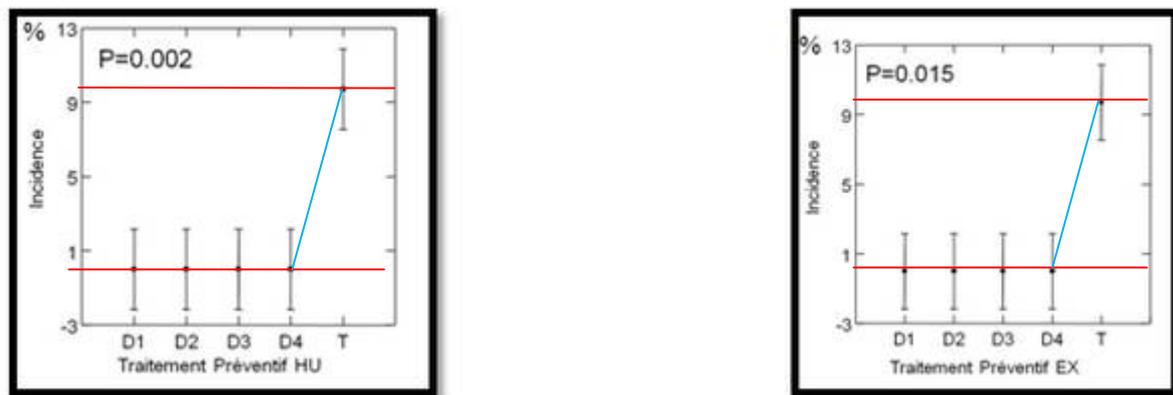


Figure 28 : Taux d'incidence des symptômes de *P.infestans* sous l'effet des extraits de *Laurus nobilis* L., à différentes dilutions au traitement préventif par trempage.

3.3.2.2 Traitements Curatifs

Le traitement curatif avec l'extrait aqueux de *Laurus nobilis* L., à différentes dilutions a montré un développement des symptômes. Ce développement s'est prononcé par de légères nécroses, chloroses, accompagnés d'un léger brunissement suite à et un duvet blanchâtre. Les mêmes résultats ont été visibles sur les témoins (+) inoculés et imbibés par de l'eau distillée stérile.

L'analyse de la variance a montré une différence très hautement significative entre le pouvoir anti infectieux des différents extraits (l'huile essentielle et l'extrait aqueux), sur la souche de *P.infestans* Seulement il n'y avait pas de différence entre les feuilles traitées par l'huile pure et celles traitées par l'extrait aqueux pure.

En terme de dose, l'infection progresse pour atteindre en moyenne de 13.33 %, cela peut s'expliquer par la croissance du champignon qui augmente avec la diminution des concentrations de l'extrait aqueux. Cette différence s'est avérée très hautement significative (Tableau 14).

Tableau 14 : Taux de l'incidence des Symptômes du mildiou sur les feuilles de pomme de terre traitées par les différentes doses d'extrait aqueux sur le *P.infestans* au mode curatif.

Dilutions de l'Extrait Aqueux	Taux de l'Incidence des Symptômes (%)
1/10	4.1
1/50	15.6
1/100	21.3

L'analyse de la variance de taux d'incidence des symptômes a montré une différence hautement significative entre la nature des deux extraits, les dilutions testées et le témoin incorporé. L'ensemble des feuilles testées par l'extrait aqueux de *Laurus nobilis* L., ont montré les mêmes symptômes que celles de témoin. (Tableau15)

Tableau 15 : Variabilité de taux d'incidence des symptômes de la maladie sur les feuilles sous traitements à base des extraits de *Laurus nobilis* L., testées selon le mode curatif à plusieurs dilutions.

Facteurs	Somme des carrés	d.d.l.	Carrés moyens	F-ratio	P
HU (Traite Curatif)	376.360	4	94.090	4.027	0.015
EA (Traite Curatif)	5500.300	4	1375.075	3.758	0.019

En modèle GLM, une grande variabilité des taux d'incidence de la souche A2 a été révélée entre les deux extraits des feuilles de *Laurus nobilis* L., l'incidence était plus importante pour les dilutions de l'extrait aqueux contrairement à l'huile essentielle qui a enregistré le 0% d'incidence de la maladie. (Figure 29).

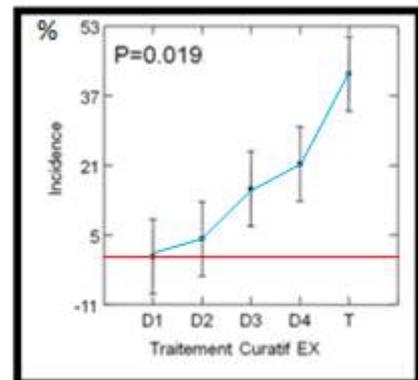
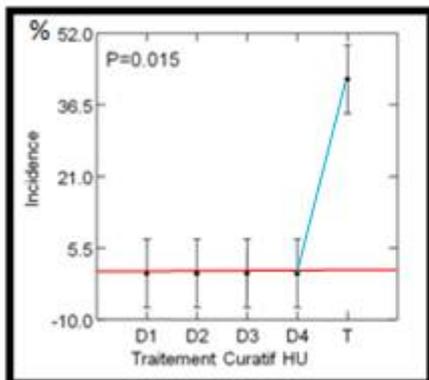
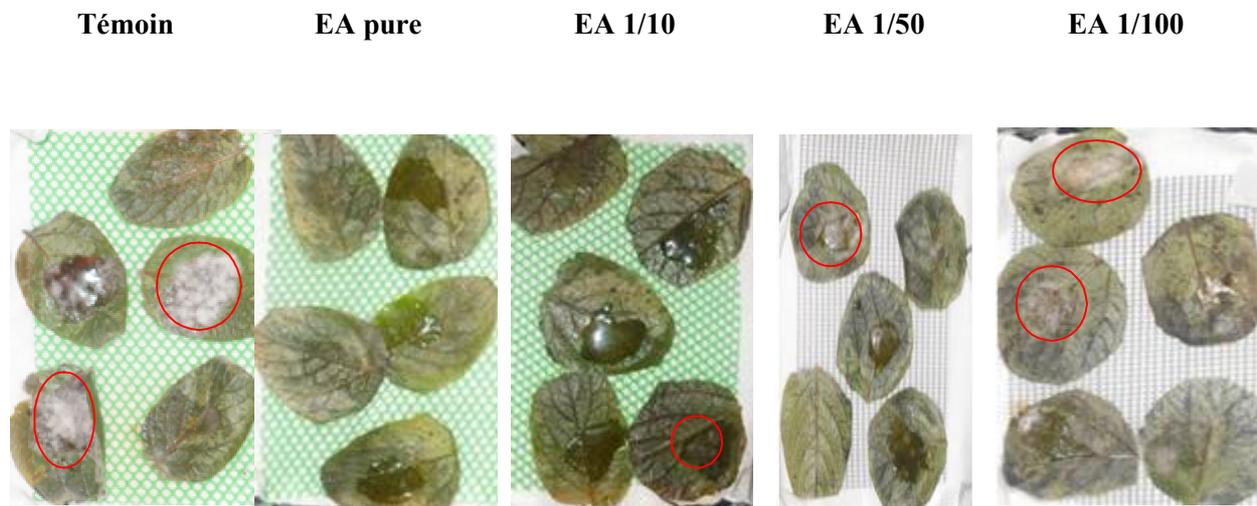


Figure 29 : Variabilité de taux d'incidence des symptômes du mildiou sous l'effet des extraits de *Laurus nobilis* L., à différentes dilutions au traitement curatif.

3.3.2.3 Description des symptômes foliaires

Sur les disques des feuilles inoculées, le premier signe macroscopique de l'infection est l'apparition de taches humides juste au point de l'inoculation. Ces taches devenant brunes. Les nécroses se développent et s'élargissent différemment. Après une semaine d'incubation, et avec les conditions optimales de température et d'humidité, quelques feuilles nécrosées se recouvrent non pas sur leurs faces inférieures qui sont au contact avec le grillage de séparation, mais sur leurs faces supérieures libres, elles se recouvrent par une fructification blanchâtre abondante du pathogène (Figure 30).

Traitement par extrait aqueux



Traitement par l'huile essentielle

Témoin	HU pure	HU 1/10	HU 1/50	HU 1/100
--------	---------	---------	---------	----------



Discussion

Ce présent travail a révélé un très fort pouvoir antifongique à l'égard de l'isolat Algérien A2 de: *Phytophthora infestans* suite à un test *in vitro* et *in vivo* de l'huile essentielle de *Laurus nobilis* L. Par la technique de contact direct sur un milieu à base de petits pois *in vitro*, aussi l'inoculation du champignon et son traitement curatif et préventif par l'huile sur les feuilles détachées de la variété *Spunta* de pomme de terre *in vivo*; un pourcentage d'inhibition, de cette espèce étudiée a été estimé de l'ordre de 100 % qui s'est répercuté sur la structure du pathogène par la lyse de son mycélium, ainsi qu'une importante inhibition de la sporulation. Selon ces observations, on peut spéculer que la forte activité antifongique observée chez l'huile essentielle de *Laurus nobilis* L., peut être due à l'effet volatil du milieu où peuvent exister dans le principe actif défavorable à un développement normal de la croissance et de la reproduction de ces champignons. Il peut être attribué seulement au 1,8-Cinéole, car il s'est avéré notamment qui se présente en fraction considérable dans l'extrait total de l'huile des feuilles ou d'autres composés antifongiques présents en faible quantité comme elle peut être le résultat de synergie entre les différents constituants de cette huile (Celimen et al 1999). En général, les activités antifongiques ont été principalement traduites par les composés terpènes avec les cycles aromatiques (Aust, 2009 ; Basic et al., 2009).

Les substances de l'extrait aqueux de cette plante médicinale a permis la réduction du mildiou de la pomme de terre (*P. infestans*) de manière significative dans les expériences en chambres humides (Krebs et al., 2006). Le pouvoir antifongique de l'extrait aqueux a été suivi par la plus forte inhibition de la croissance mycélienne de *P. infestans* à l'état pure et aux concentrations minimales.

L'extrait aqueux de *L. nobilis* a totalement inhibé la croissance mycélienne de champignons pendant 7 jours de la période *in vitro*. L'activité antifongique de l'extrait a été

renforcée par l'augmentation de la concentration de l'extrait aqueux. Parmi les dilutions testées, les deux premières dilutions minimales ont été sélectionnées *in vitro* pour une forte activité antifongique contre *P. infestans* plus les teneurs en Cinéol sont élevées, plus l'efficacité antifongique de l'extrait est grande selon Mohammedi et al(2010) et Lazouni (2011).L'extrait aqueux de cette plante a été choisi en fonction de la littérature au hasard dans la flore locale et mondiale pour la lutte biologique. Le dépistage a révélé que l'extrait des feuilles de *L. nobilis* a complètement inhibé la croissance mycélienne de *P. infestans* à une concentration de 4%. Ces résultats sont en accord avec des études précédentes montrant l'activité antifongique des extraits de feuilles ou de fruits de cette espèce végétale à l'égard des espèces de *Phytophthora* (Kim et al, 2002 ; Blaeser et al., 2002 ; Dorn et al, 2007; Azeez Al et.Nezam, 2009).

Le traitement préventif par l'extrait aqueux a révélé une forte activité antifongique contrairement au traitement curatif qui a permis l'expression de légères nécroses qui ne tardent pas à se développer rapidement ; *in vivo* parallèlement les analyses statistiques nous ont permis de distinguer deux principaux effets semblables par rapport aux taux d'infections, la culture et le mode de traitement surtout la concentration classés comme suit :

Le trempage des feuilles détachées de pomme de terre dans l'extrait aqueux pure et ses dilutions: 1/10, 1/50 et 1/100 de *Laurus nobilis* L. Ces paramètres étaient ceux qui ont donné la meilleure efficacité sur le champignon. On parle donc d'un pouvoir antifongique très fort sur l'isolat traité en mode préventif par trempage en culture *in vivo*.

Le traitement où les feuilles détachées étaient imbibées par les dilutions de l'extrait aqueux qui n'avaient pas agit sur la souche A2, ainsi qui n'ont pas donné une efficacité totale avec le mode curatif où les symptômes de mildiou étaient visibles.

Cependant, le pouvoir antifongique de Laurier sauce n'est pas limité à aucun type d'extrait ou produit naturel ; comme les huiles essentielles peuvent montrer un pouvoir antifongique les extrait aqueux également, ni spécifique à aucun mode de traitement, cette activité n'est pas due aux composés majoritaires mais à une synergie entre les différentes composantes des huiles. Le 1,8-Cinéole, principal constituant de l'extrait de *Laurus nobilis* L., est toxique pour plusieurs champignons pathogènes : Kim et al., (2002) ont rapporté que le même extrait des feuilles de *Laurus nobilis* L., inhibe efficacement la croissance et la germination des zoospores de *Phytophthora drechsleri*.

1. Généralités sur la plante

1.1 Historique

Avant d'être Laurier-sauce, il s'appelait Laurier commun, Laurier d'apollon ou Laurier-noble, un arbre vénéré par les romains et béni par les chrétiens, aux jeux pythiques grecs les vainqueurs recevaient une couronne de laurier. On nomme aussi "lauréat", celui qui réussit ses examens : il reçoit une couronne de laurier, non pas avec des feuilles, mais avec des baies (*bacca laurea*), d'où "baccalauréat", littéralement "baies de laurier" (Hurtel., 2002).

1.2 Répartition géographique

Le *Laurier noble* ou (*Laurier sauce*) est répandu dans les régions tempérées et subtropicales, en Asie, dans les pays d'Amérique donnant sur l'Atlantique et en Afrique, il a envahi tout le bassin méditerranéen et les régions d'Europe. Le laurier sauce constitue l'espèce dominante des pourtours de la Méditerranée. Il se présente sous forme d'arbrisseaux ou de petits arbres de 3 à 6m de hauteur en formation dense. (SAGE, 2012).

En Algérie, Le *Laurier noble* c'est une espèce spontanée qui pousse dans les lieux humides et ombragés (Iserin, 2001). Il est le plus commun dans les forêts à climat caractérisé par des précipitations concentrées pendant la période hivernale, s'étalant du mois d'Octobre au mois d'Avril (Beloued, 1998).

C'est une espèce pionnière qui se régénère abondamment dans les vieux jardins. Elle apprécie les terrains relativement fertiles (terre de jardin, terreau de fumier décomposé), et bien drainés exemple : (le Jardin d'Essai d'El Hamma) où elle est cultivée comme plante ornementale (Iserin, 2001).

1.3 Description botanique de *Laurus nobilis* L.

Laurus nobilis L., membre de la famille des lauracées qui renferme 32 genres et environ 2000-2500 espèces (Barla et al ., 2007). *Laurus*, nom latin, d'origine celte qui veut dire « toujours vert » allusion au feuillage persistant de la plante (Pariante, 2001).

Laurus nobilis L., arbuste à petit arbre mesurant de 2 à 10 mètres de haut (Ducatillion, 2010) aromatique, glabre, vert, très rameux, à tige dressé droite grise dans sa partie basse et verte en haut à pollinisation entomogame (Iserin, 2001 ; Demir et al., 2004 ; Beloued, 2005).

Il est intéressant de noter que cette plante qui était pendant longtemps employée dans la nourriture comme condiment et en médecine traditionnelle a, en faite, des propriétés qui peuvent suggérer de nouvelles applications (Ferreira et *al.*, 2006).

1.3.1 Feuilles de *Laurus nobilis* L.

Les feuilles sont alternées, coriaces et légèrement ondulées sur les bords, lancéolée en court pétiole, à penne innervées, de 16 cm de longueur sur 8 cm de largeur, rigides et persistantes. Elles sont luisantes vert foncées et glacées sur leur face supérieure mais plus pales en dessous (Demir et *al.*, 2004).

Elles sont assez touffues, dégageant une forte odeur aromatique agréable si on les froisse, c'est la conséquence de l'existence de grosses cellules sécrétrices éparses dans le mésophile des limbes (Mitchell, 1993).



Figure 1 : Feuilles de *Laurus nobilis* L., (plantes-et-jardins.com)

1.3.2 Fleurs de *Laurus nobilis* L.

Les fleurs de *Laurus nobilis* L. sont petites dioïques, d'un blanc crème virant au jaune, odorantes groupées par 4 à 5 en petites ombelles axillaires pédonculées apparaissent en mars-avril (Neves et Valente, 1992).

Des fleurs involuquées et périanthe pétaloïde à 4 divisions obovales égales ; les fleurs mâles ont 8 à 12 étamines disposés sur 2 rangs, à anthères s'ouvrant de la base au sommet par des valvules ; 1 style court et épais, à stigmate subcapité ; ovaire libre, entouré de 2 à 4 staminodes tripartites ; drupe ellipsoïde, noire, à une seule graine (Godron, 1990).



Figure 2 : Fleurs de *Laurus nobilis* L., (Arbre-species.blogspot.com).

1.3.3 Fruits de *Laurus nobilis* L.

Les fruits sont des petites baies ovoïdes, de 2cm de longueur sur 1cm de largeur de couleur noire violacé vernissés à maturité et nus. (Iserin, 2001 ; Demir *et al.*, 2004 ; Beloued , 2005). Plus au moins sphériques à pédoncule très court, récoltés en Juillet – Août (Reynauds, 2002).



Figure 3 : Fruits de *Laurus nobilis* L., (Beloued, 2005)

1.4 Systématique de *Laurus nobilis* L.

Laurus nobilis L., est le seul arbuste comestible de la famille des *Lauracées*. Sa classification se réfère à celle proposée par Quezel et Santa (1962) synthétisée ci dessous (Tableau1).

Tableau 1 : Classification botanique de *Laurus nobilis* L.

Règne	Plantes
Sous règne	Plantes vasculaires
Embranchement	Spermaphytes
Sous embranchement	Angiospermes
Classe	Dicotylédones
Sous classe	Dialypétales
Ordre	Laurales
Famille	Lauracées
Genre	<i>Laurus</i>
Espèce	<i>Laurus nobilis</i> L.

En effet, on ne doit pas confondre ce laurier noble avec d'autres espèces ligneuses fâcheusement appelées *Laurier-noble*. Selon les variétés et les cultivars, on distingue :

- *Laurus nobilis* 'Aurea' (feuillage doré).
- *Laurus nobilis* 'Crispa' (feuilles au bord crispé).
- *Laurus nobilis* 'Bay Junior ' (croissance lente, port compact, petites feuilles : cultivar parfait en topiaire).
- *Laurus nobilis* 'Sunspot' (feuillage panaché de crème)

1.5 Multiplication et plantation de *Laurus nobilis* L.

Le laurier se plante de préférence en automne. Pour le rempotage des sujets en pot, cette période est également la plus propice (Wizelis, 2011).

La multiplication de *Laurus nobilis* L., se fait par semis en automne (possible mais difficile à réussir) (Hurtel ., 2002), ou à partir des semences (très astreignante) au printemps , on effectue la plantation dans un baquet qu'on rentre après les premières gelées nocturnes,

pour les conserver entre 4 et 6°C, l'arrosage doit être régulier, tout en évitant l'accumulation d'eau ; dès le début du mois d'Avril, on peut à nouveau sortir les plants, mais dans un endroit ensoleillé et abrité (Wizelis, 2011).

La multiplication par bouturage se fait en Août en terre de bruyère et sable, avec les sujets vigoureux à partir des boutures constituées de fragments de tiges portant 4 ou 5 feuilles, également par marcottage et division des rejets (Wizelis, 2011).

1.6 Exigences climatiques et édaphiques

Le laurier est généralement rustique. Il résiste jusqu'à -10°C ou -15°C. Il supporte les embruns marins et résiste simultanément à la sécheresse et à l'ombre. Il peut être exposé au plein soleil ou éventuellement mi-ombre, mais il aime la lumière à l'abri des vents froids. La plante supporte mal l'hiver (Teuscher et *al.*, 2005).

Il pousse idéalement dans un sol riche, léger et sablonneux, acide à calcaire et bien drainé (Wizelis, 2011).

1.7 Entretien de la culture

Laurus nobilis L., est une plante méditerranéenne : il n'a généralement pas besoin d'être arrosé (sauf pour les sujets en pots ou en bacs). Quelques arrosages en période de sécheresse, durant les premières années de l'arbre, peuvent cependant être nécessaires. Apportez du compost chaque année, au printemps. Rempotez le laurier en pot tous les 2 ou 3 ans (Wizelis, 2011).

La taille n'est pas obligatoire, mais on peut tailler en fin d'hiver afin de conserver une forme particulière à l'arbre. Enfin, il est conseillé d'installer un paillage au pied de l'arbre pour protéger ses racines en cas de gel si les parties aériennes de l'arbre sont détruites par le gel : on rabatte au ras du sol, la souche repartira par rejets. (Wizelis, 2011).

Le laurier sauce est très résistant aux maladies mais facilement contaminé par des cochenilles et/ou de la fumagine, ce qui lui donne un aspect disgracieux. (Ducatillion, 2010).

1.8 Pays producteurs et exportateurs de *Laurus nobilis* L.

Les principaux pays producteurs de *Laurus nobilis* L., sont : l'Italie, la Grèce, la Turquie, la Syrie, l'Espagne, le Maroc, l'Albanie et la France, mais aussi le Groupement des états indépendants (autre de la Mer noire).

Ainsi que l'Amérique centrale et l'Amérique du Sud. Les pays du bassin méditerranéen, notamment la Turquie, la Syrie sont les principaux pays exportateurs de cette plante (Teuscher et *al.*, 2005).

1.9 Mesures de conservation de *Laurus nobilis* L .

Vu la présence de la plus grande station de *Laurus nobilis* L., qui est une espèce protégée en Algérie et qui est aussi menacée par les coupes illicites, une protection plus vigoureuse serait nécessaire au niveau des forêts Algériennes.

Les sites de laurier pourraient, de ce fait, constituer un laboratoire pour des recherches surtout que nos connaissances sont préliminaires sur cette plante. Les études de cette espèce sont nécessaires afin de comprendre sa valeur.

Son classement sur la Liste RAMSAR permettra certainement d'y prévoir des mesures de conservation plus spécifiques et de dégager des financements pour réaliser des opérations de réhabilitation et de protection (FDR, 2008).

1.10 Utilisation des feuilles de *Laurus nobilis* L.

Les feuilles de *Laurus nobilis* L., sont parmi les assaisonnements les plus connus dans tous les pays, elles sont généralement utilisées comme épice valable en culinaire (en potages, ragoûts, sauce,...) et aromatisant en industrie alimentaire. Cette plante a aussi des applications importantes en médecine traditionnelle et représente récemment un sujet de recherche scientifique intéressant (Simi et *al.*, 2003), le laurier est principalement utilisé, par voie orale, dans le traitement symptomatique des troubles de l'appareil digestif supérieur tels que le ballonnement épigastrique (Iserin, 2001).

L'extrait aqueux est utilisé dans la médecine traditionnelle en tant qu'anti hémorroïdal, antirhumatismal, diurétique et comme un antidote dans des morsures de serpent et pour le traitement du mal d'estomac (Kivçak et Mert, 2002).

L'huile essentielle obtenue des feuilles de cette plante a été employée pour le soulagement d'hémorroïdes et des douleurs rhumatismales (Sayyah et *al.*, 2002). En outre, elle est employée par l'industrie cosmétique en parfumerie. Elle compte parmi les meilleurs moyens d'éloigner les insectes gênants (Demir et *al.*, 2004 ; Beloued .,2005).

2 Huile essentielle de *Laurus nobilis* L.

L'huile essentielle extraite des feuilles de Laurier est d'aspect liquide mobile limpide, de couleur jaune très pâle à jaune foncée, d'odeur aromatique, douce, fine, chaude ou épicée. (Castilho et *al.*, 2005).

2.1 Localisation des huiles essentielles de *Laurus nobilis* L.

L'huile essentielle de *Laurus nobilis* L., se situe sous l'épiderme supérieur de la feuille, une double, voire triple couche de parenchyme palissadique peut être observé, qui renferme comme le parenchyme médullaire de nombreuses cellules sécrétrices arrondies ; ces dernières sont de grandes tailles et particulièrement abondantes à proximité ; ces dernières sont de grandes tailles et particulièrement abondantes à proximité des épidermes, certaines contiennent du mucilage. Une coupe superficielle de l'épiderme supérieur montre des cellules polyédriques à parois épaisses, les parois cellulaires radiales sont ondulées à dentelées et apparaissent ponctuées (Figure 4 : A) (Peyron, 1970).

L'huile essentielle de *Laurus nobilis* L., se caractérise par la présence de fragments provenant de l'épiderme supérieur, formés des cellules de forme irrégulière, à parois épaisses et grossièrement ponctuées, d'où leur aspect en « collier de perles ». Les fragments provenant de l'épiderme inférieur se repèrent par la présence des cellules épidermiques à parois peu épaisses mais accompagnées de nombreuses stomates avec deux cellules annexes disposées dans un axe longitudinal parallèle à l'ouverture de l'ostiole, la poudre présente également des fibres lignifiées (Figure 4 : B), souvent accompagnée de faisceaux libéro-ligneux, cellules scléreuses et de grosses cellules sécrétrices ovale (Teuscher et *al.*, 2005).

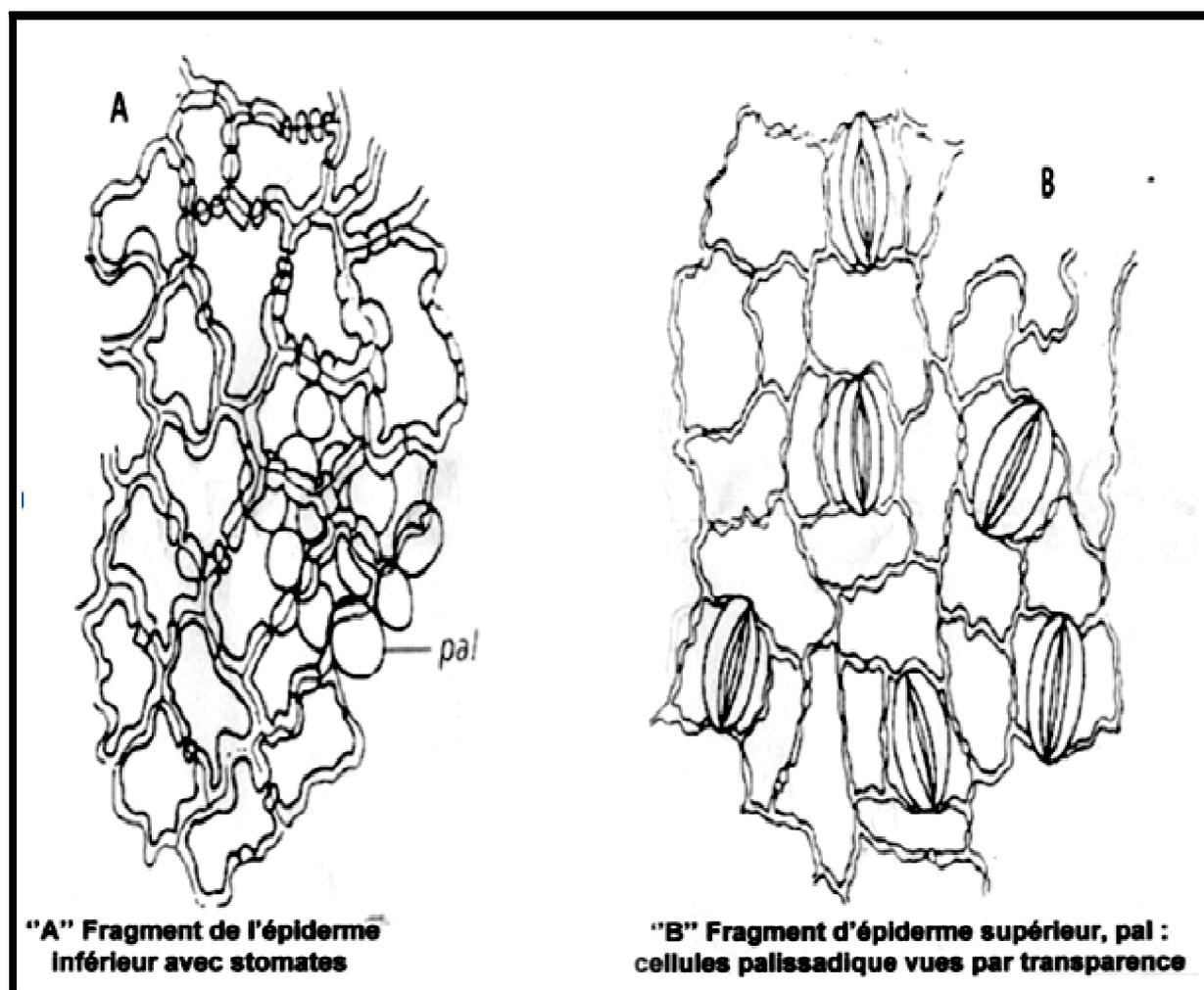


Figure 4 : Localisation des cellules contenant les huiles essentielles *Laurus nobilis* L. (Teuscher et *al.*, 2005).

2.2 Composition chimique de *Laurus nobilis* L.

La composition de l'huile essentielle de laurier est exprimée en pourcentage de divers composés des familles des oxydes terpéniques, des monoterpénols, des phénols des monoterpènes, des sesquiterpènes et des esters terpéniques (Flamini et *al.*, 2007).

L'analyse de l'huile essentielle des feuilles de laurier Algérien (Yakhlef, 2010) a identifié la présence d'une trentaine de composés, représentant un pourcentage de 73,24 % du volume total de l'huile essentielle. L'huile essentielle de laurier est riche en 1,8-cinéole (23,2%) et en acétate d' α -terpényle (19,5 %). Cette huile contient, aussi, un pourcentage de terpinène-4-ol (6%) et de limonène (3,6 %) ; Selon le (Tableau 2).

L'analyse de l'huile essentielle de *Laurus nobilis* L., en Algérie a révélé que cette huile essentielle a montré une tendance similaire à ceux publiés pour d'autres régions géographiques (Ozcan, 2005).

Tableau 2 : Composition principale de l'huile essentielle de *Laurus nobilis* L., cultivé en Algérie (Yakhlef, 2010)

Temps. Rét	Composant	%*	RI**
13,87	α -Terpinène	0,81	1179
14,3	2,3 Hydro-1,8-cinéole	0,48	1192
14,49	Limonène	3,58	1198
14,96	1,8-cinéole	23,17	1214
25,63	Terpinène-4-ol	6,03	1611
26,27	Myrténal	0,85	1639
26,73	Acétate de Terpinène	1,51	1659
27,23	α -Terpinéol	1,43	1680
27, 58	Acétate d'α-Terpényl	19,50	1706
27,95	Bornéol	0,34	1712
28,15	Carvone	0,25	1721
28,41	Valencène	1,96	1733

*Pourcentage basé sur l'aire normalisée du chromatogramme Moyenne de deux répétitions.

** Indice de rétention.

2.3 Domaines d'application des extraits de *Laurus nobilis* L.

La composition chimique de l'huile essentielle de *Laurus nobilis* L., offre des débouchés importants dans de nombreux domaines industriels, mais également en agriculture où elle est utilisée en tant que pesticides naturels:

2.3.1 Parfums et Cosmétiques

Dans le domaine des parfums et cosmétiques, l'huile de *L.nobilis* est employée en tant qu'agent conservateur grâce à ses propriétés antiseptiques qui permettent d'augmenter la durée de conservation du produit. Cependant, c'est surtout pour sa caractéristique odorante qu'elle est utilisée, notamment dans la formulation de parfums, de produits d'entretien personnels. (AFSSAPS, 2008).

2.3.2 Santé

En pharmacie, l'huile de *L.nobilis* est majoritairement destinée à l'aromatisation des formes médicamenteuses et à la production d'antiseptiques. (Bruneton, 1999). La propriété de cette huile telle que la pénétration aisément dans la peau (principalement due aux terpènes) permettrait de faciliter l'administration des médicaments par voie transdermique. (Bruneton et al., 2007).

2.3.3 Agro-alimentaire

L'ensemble des secteurs de l'agro-alimentaire sont consommateurs de l'huile essentielle de *L.nobilis* (Bruneton, 1999) vu leur efficacité et non toxicité (Rozman et al., 2007). L'utilisation traditionnelle des feuilles de cette plante dans l'industrie alimentaire est reliée non seulement à l'odeur et à l'arôme plaisant (Rozman et al., 2007) mais, aussi à ses propriétés conservatrices (Burt, 2004 ; Tiwari et al., 2009, Rozman et al., 2007).

2.3.4 Agriculture

La volonté de réduire l'utilisation des pesticides de synthèse dans l'agriculture moderne s'est affermie ces dernières années, notamment en Algérie avec l'intervention des politiques de l'Environnement est un bon exemple de la prise de conscience environnementale (MAP., 2008).

Dans ce contexte, les pesticides naturels basés, notamment, sur les huiles essentielles et les extraits aqueux des plantes aromatiques dont les extraits de *L.nobilis* représentent une alternative intéressante pour la protection des cultures contre les insectes mais également contre les adventices et les champignons (Dayan., 2009 ; Isman, 2000). Outre, leurs activités biologiques, les extraits naturels présentent d'autres caractéristiques qui en font des produits adaptés dans la lutte contre les nuisibles (Isman, 2010). Parmi celles-ci, on peut citer :

- leur prix faible et approvisionnement assurés par une production mondiale importante pour de nombreuses huiles essentielles,
- leurs multiples modes et sites d'action sur les insectes,
- leur faible toxicité pour les mammifères (à quelques rares exceptions près),
- leur faible persistance dans l'environnement due à leur volatilité (temps de demi-vie en extérieur < 24 h sur les surfaces, dans les sols ou l'eau) (Hernandez et al. , 2001).

2.4 Effets biologique des extraits des feuilles de *Laurus nobilis* L.

2.4.1 Effets fumigènes et insecticides

Récemment, il ya un intérêt croissant pour l'utilisation probable des extraits de plantes comme solution de rechange aux insecticides synthétiques. Treize huiles essentielles dont ceux de *Laurus nobilis* L., ont été examinées sous leurs formes de vapeur contre une espèce d'insecte attaquant les produits stockés, *Acanthoscelides obtectus* (bruche du haricot). Les résultats ont indiqués que l'huile essentielle des feuilles de *Laurus nobilis* L., a une action répulsive, réduit la fécondité, diminue la couvaison d'œufs, augmente la mortalité larvaire de nouveau-né et influence défavorablement l'apparition de progéniture. Une étude similaire a été réalisée par Erler et ses collaborateurs en 2006. De même, l'activité fumigène de certains composés qui se produisent naturellement dans les huiles essentielles des plantes aromatiques dont cinéol, eugénol et linalol, composés principales (Papachristos et Stamopoulos, 2002).

2.4.2 Effet antifongique

L'huile essentielle de *Laurus nobilis* L., a révélé son pouvoir inhibiteur *in vitro* sur la croissance mycélienne de *Phytophthora infestans* selon la méthode de contact directe d'une manière dose dépendante. En effet, l'inhibition totale a été enregistrée à 51,2 µg /ml (Soylu et al., 2006). Simic et al. (2004) ont affirmé que 1,8 – Cinéole semble être le constituant antifongique dominant de cette huile essentielle. En revanche, cette dernière a plutôt montré son effet stimulateur *in vitro* sur la croissance mycélienne d'*Aspergillus flavus* mais a réduit la concentration de son aflatoxine de 55.21% (Atanda et al., 2007).

2.4.3 Effet antioxydant

L'activité antioxydante des extraits méthanoliques (bruts et dégraissés) des feuilles, d'écorce et des fruits de *Laurus nobilis* L., ont été étudiés au niveau de la peroxydation des lipides (LP) dans les liposomes. Les résultats ont montré que tous les extraits testés possédaient une activité antioxydante.

L'extrait dégraissé des feuilles a montré une inhibition plus élevée du LP que l'extrait brut et les autres extraits. Le maximum de son activité (68,4%) a été atteint avec une plus petite quantité (2,0 mg) (Simi et *al.*, 2003).

Ferreira et *al.* (2006) ont étudié l'activité antioxydante de trois extraits (huile essentielle, extrait éthanolique et décoction) de dix espèces de plantes médicinales dont *Laurus nobilis* L., cette espèce a montré des valeurs élevées pour l'activité antioxydante pour chacun des trois extraits mais, elle a été plus importante pour les extraits polaires. Par ailleurs, Demo et *al.* (1998) ont mis en évidence la présence de la vitamine E dans la fraction apolaire obtenue par extraction d'hexane à partir des feuilles de *Laurus nobilis* L., Cette étude a affirmé que le contenu est strictement corrélé avec l'activité antioxydante de l'extrait hexane des feuilles.

3 Généralités sur la culture de la pomme de terre

3.1 Description botanique

La pomme de terre est une espèce herbacée, vivace par ses tubercules mais qui est généralement utilisée comme une plante annuelle. Elle se reproduit naturellement par multiplication végétative, grâce à un tubercule dit "mère" qui est planté. Il émet des ramifications à partir de ses bourgeons qui, dans leurs parties aériennes, produisent des feuilles, fleurs, graines et fruits. Les bourgeons souterrains émettent des ramifications appelées stolons au bout desquels se forment des tubercules, renflements où s'accumulent des réserves. Le tubercule mère, les tiges et les stolons émettent aussi des racines pour approvisionner la plante en éléments minéraux. En utilisant ce mode de reproduction, on obtient à chaque fois la même plante du point de vue génétique, que l'on peut appeler un clone. Ce phénomène est naturel chez les végétaux (Dorothee, 2011).

3.2 Taxonomie

Le genre *Solanum* auquel appartient la pomme de terre, rassemble environ mille espèces dont plus de deux cents sont tubéreuses présent un peu partout dans le monde (Cousin, 2011). En effet, la pomme de terre *Solanum tuberosum* L. est classée comme suit :

Tableau 3 : Classification botanique de *Solanum tuberosum* L. (Cousin, 2011).

Règne	végétal
Sous règne	Plantes vasculaires
Embranchement	Spermaphytes ou Phanérogames
Sous embranchement	Angiospermes
Classe	Dicotylédones
Ordre	Gamopétales ou Métachlamydées
Famille	Solanacées
Genre	<i>Solanum</i>
Genre et espèce	<i>Solanum tuberosum</i> L.

3.3 Historique de la pomme de terre

La pomme de terre existe depuis plus de 8000 ans. Elle est originaire d'Amérique du sud, plus exactement près du lac Titicaca dans les hauts plateaux andins de la cordillère des Andes au sud du Pérou et au nord de la Bolivie (Spooner et *al.*, 2005). Elle fut introduite en Europe par l'Espagne, il y a plus de quatre siècles en 1534, puis en France et en Angleterre (Cousin, 2006).

Propagée aussi bien par les Anglais que par les Espagnols, la pomme de terre a gagné le reste de l'Europe (Robuchon, 1994 ; Rousselle et *al.*, 1996). Depuis, elle s'est répandue dans le monde entier (Cousin, 2006).

Cette culture a été ramenée et propagée par les maures andalous en Algérie. Elle a été faite par les français en 1856 et en 1898, mais notre pays était déjà un pays importateur de pomme de terre de consommation (INVA, 2007 ; Carrier, 2008).

3.4 Exigences climatiques et édaphiques de la pomme de terre

La pomme de terre s'accommode à tous les types de sols, exception faite des sols salés et alcalins (Bamouh, 2003). La température optimale pour la végétation semble se situer entre 15,5 et 21°C (Clarys, 2005).

3.5 Importance Economique de la pomme de terre en Algérie

L'Algérie figure parmi les pays producteurs de la pomme de terre avec une production de 3.290.000 tonnes en 2010 sur une superficie d'environ 130 000 ha. L'importance de la production est due à la position géographique du pays qui permet une bonne acclimatation à la culture de pomme de terre. Cette dernière est largement répandue car, c'est un aliment de base après les céréales (FAO, 2010 ; Anonyme, 2012).

Ainsi, l'Algérie est le deuxième pays producteur de pomme de terre dans le monde arabe après l'Egypte et le quatrième producteur en Afrique (FAO, 2008).

La pomme de terre est cultivée sur tout le territoire, y compris dans les oasis du sud du pays, avec l'apparition récente du bassin spécifique d'El Oued, où la pomme de terre est devenue une spéculation majeure en quelques années. Cependant, si l'on retient les quinze wilayas où elle occupe plus d'un millier d'hectares, on pourra alors distinguer dans les zones du littoral et du sublittoral, trois bassins de production (Chehat, 2008) ; A l'Ouest, celui constitué par les wilayas de Tlemcen, Mostaganem et Chlef ; Au Centre, celui regroupant les wilayas d'Ain Defla, Tipaza, Alger, Boumerdes, Bouira et Tizi- Ouzou ; A l'Est, représenté par la wilaya de Skikda sur le littoral et de Guelma, Setif, Mila et Batna à l'intérieur. Les

wilayas d'El oued, Mascara, Mostaganem et Ain Defla représentent les principales localités productrices (Tableau 4). Les variétés Spunta, Désirée, Kondor, Batina, Timate et Atlas sont les plus cultivées (MADR, 2011).

Tableau 4 : Bilan global de production de la pomme de terre de consommation et de multiplication durant la campagne 2009/2010 (MADR, 2011).

Régions	Superficie réalisée	Superficie récoltée	Production obtenue	Rendement q/ha
S/T ouest	37359	37158	9173986	247
S/T Centre	44283	43633	12294888	282
S/T Est	18582	18398	4300905	234
S/T Sud	21349	21349	6830430	320
TOTAL GENERAL	121574	120537	32600208	270

* S / T : Superficie Total

3.6 Problèmes phytosanitaires de la pomme de terre en Algérie

Les cultures de pommes de terre sont très affectées par les maladies à virus. La pomme de terre est sensible aux maladies, aux ravageurs (Tableau 5) et aux fluctuations climatiques. (Changins et *al*, 2008).

Sans oublier les risques de contamination des productions sur champ dues à des pucerons vecteurs de viroses et qui sont la cause des déclassements des semences. (Bensemmane, 2008).

Tableau 5 : Principales maladies et principaux parasites limitant la culture de la pomme de terre (Anonyme, 2008).

	Maladie	Agent causal
Maladies bactériennes	Flétrissement bactérien de la pomme de terre	<i>Ralstonia solanacearum</i>
	Jambe noire de la pomme de terre	<i>Erwinia carotovora</i>
	Flétrissement bactérien de la pomme de terre	<i>Clavibacter michiganensis subsp. sepidonicum</i>
	Gales communes de la pomme de terre	<i>Streptomyces scabies</i>
Maladies fongiques	Mildiou de la pomme de terre	<i>Phytophthora infestans</i>
	alternariose	<i>Alternaria solani</i>
	Verticilliose	<i>Verticillium spp.</i>
	Gales argentées de la pomme de terre	<i>Helminthosporium solani</i>
	Gales poudreuses de la pomme de terre	<i>Spongospora subterranea</i>
	Dartrose	<i>Colletotrichum coccodes</i>
	Galles verruqueuses	<i>Synchytrium endobioticum</i>
	Flétrissement fusarien	<i>Fusarium spp</i>
	Taches noires de la pomme de terre	<i>Alternaria alternata</i>
Nématodes parasites	Nématodes à kyste	<i>Globodera pallida</i> , <i>Globodera rostochiensis</i>
	Nématodes à galles	<i>Meloidogyne spp</i>
Maladies virales	PVY genre <i>Potyvirus</i>	<i>Virus Y de la pomme de terre</i>
	PVX genre <i>Potexvirus</i>	<i>Virus X de la pomme de terre</i>
	PLRV genre <i>Luteovirus</i>	
	PVS genre <i>Potyvirus</i>	<i>Virus S de la pomme de terre</i>
Insectes parasites	doryphore de la pomme de terre	<i>Leptinotarsa decemlineata</i>
	Teigne de la pomme de terre	<i>Phthorimaea operculella</i>

4. Généralités sur l'agent pathogène

4.1 Systématique

L'agent phytopathogène responsable du mildiou est classé comme suit :

Tableau 6 : Classification de *Phytophthora infestans* (Legemle, 2008).

Classe	Oomycètes
Ordre	Péronosporales
Famille	Pythiacées
Genre	<i>Phytophthora</i>
Genre et espèce	<i>Phytophthora infestans</i>

4.2 Micromorphologie

Phytophthora infestans possède un mycélium coenocytique hyalin et à développement endogène (Chamont, 2010). Ces derniers en position terminale ont une forme et une taille variable selon les isolats. Les sporanges sont citriformes avec présence d'une papille apicale, et renferment des cellules mobiles appelées zoospores qui assurent la reproduction asexuée (Figure 5 : A). Ces zoospores se déplacent grâce à deux flagelles dissemblables, (Bouchet et *al.*, 2000). Les oospores sont pour la plupart de forme aplerotic avec un diamètre moyen d'environ 30 µm (Gallegly et Hong, 2008) (Figure 5 : B). Les oogones sont globuleuses, d'un diamètre de 37 µm, alors que les anthéridies sont amphygynes et généralement de forme allongée (Gallegly et hong, 2008).

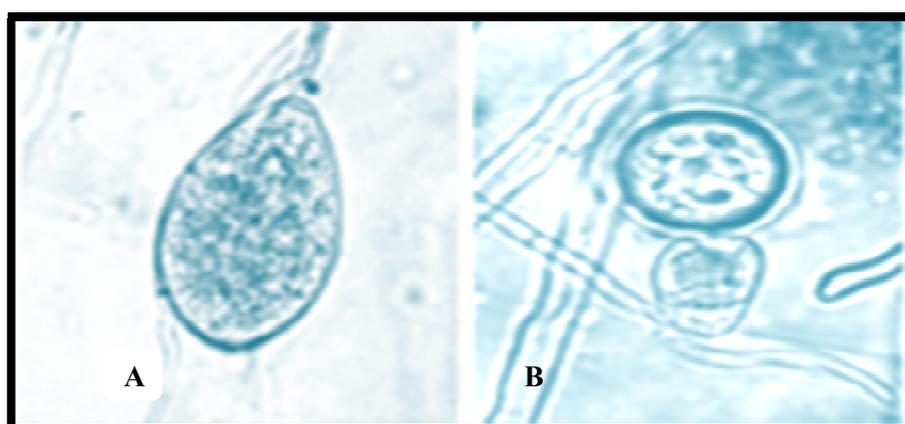


Figure 5 : Morphologie d'un sporange (A : structure asexuée) et d'une oospore (B : structure sexuée) de *P.infestans* (Legemle, 2008).

4.3. Spécificité parasitaire

L'agent phytopathogène *Phytophthora infestans* peut survivre entre les périodes de végétation sous forme de mycélium dans les tubercules et dans les tissus végétaux de la pomme de terre, ainsi que sur les hôtes facultatifs de la famille *Solanaceae* (Al-Mughrabi, 2011).

Le champignon survit pendant l'hiver dans les tubercules contaminés. Il se retrouvera donc au printemps dans les tas d'écartés de triage, les tubercules abandonnés au sol l'année précédente, les tubercules produits par les repousses sauvages et les plants.

La littérature et les observations des centres de recherches indiquent qu'il existe aussi une forme sexuée de reproduction du champignon. Quand une forme A1 est confrontée à une forme A2, dans des conditions propices, les mycéliums peuvent localement fusionner et produire des oospores, fruits d'un brassage génétique, source de variabilité des populations de mildiou. Les oospores peuvent survivre quelques années dans le sol (Ducattillon et *al.*, 2006).

5. Généralités sur le mildiou de la pomme de terre

5.1 Historique

Le mildiou causé par *Phytophthora infestans* est une maladie cryptogamique qui s'attaque aux feuilles, aux tiges et aux tubercules de la pomme. Dans les années 1840, *P. infestans* a provoqué la grande famine européenne marquée par la mort d'un million d'Irlandais et l'exil d'un autre million et demi (Mercure, 1998). Ces dernières années, des souches extrêmement virulentes de cette maladie la plupart insensibles aux fongicides synthétiques courants ont fait leur apparition, créant de nouveaux défis pour les producteurs de pommes de terre et de tomates (Powelson ; Debra, 1998).

5.2 Symptômes

Provoqué par *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary., le mildiou est l'ennemi numéro 1 de la pomme de terre. Il attaque toutes les parties de la plante ; les jeunes pousses, les feuilles, les pétioles, les bouquets terminaux, les tiges et les tubercules (Figure 6). Ses symptômes développés trois à cinq jours après l'infection initiale, se manifestent par des taches aqueuses circulaires ou irrégulières aux extrémités des feuilles basales, décolorées et entourées d'un halo jaune sur la face supérieure des feuilles, elles s'agrandissent et deviennent brun foncé. En conditions humides, les fructifications du champignon apparaissent sur le pourtour des taches et montrant un duvet blanchâtre (Paitier, 1980 ; Maaaro, 2010).

Sur tige, le symptôme typique est une nécrose brune violacée, s'étendant sur 2 à 10 cm à partir d'un nœud. Par temps humide, cette nécrose se couvre d'une pulvérulence blanche ou grisâtre, formant des organes de multiplication du pathogène (Rousselle et *al.*, 1996).

L'infection des tubercules se manifeste sur la peau par des lésions grisâtres irrégulières. Tandis que la chair présente une altération de couleur brunâtre avec une texture souvent granuleuse. Il en résulte une pourriture sèche (Thurston et Shultz, 1981 ; Henfling, 1987).



Figure 6 : Symptômes du mildiou sur tiges, tubercules et feuilles de la Pomme de Terre (Al-Mughrabi, 2011).

5.3 Importance économique de la maladie

Le Mildiou de la pomme de terre reste l'une des maladies les plus dangereuses des plantes cultivées. Une épidémie extrêmement rapide en conditions favorables augmente l'agressivité. En zone tempérée, les conséquences économiques sont fréquentes et graves. En effet, une attaque précoce peut entraîner des baisses de rendement de plus de 50 %, une attaque plus tardive détériore la qualité des tubercules (Cousin, 2011).

L'épidémie du mildiou évolue selon une progression géométrique de raison estimée à 100 % . Comme les cycles de multiplication asexuée sont courts (en pratique, de l'ordre de 4,5 à 7,0 jours durant la saison de production), les dégâts provoqués peuvent être rapidement très importants (Ducattillon et *al.*, 2006).

Une attaque précoce peut réduire fortement le rendement de la culture en tubercules voire même de la réduire à néant, alors qu'une attaque tardive déprécie la qualité du tubercule, donc sa valeur marchande (Moulai, 2010).

5.4 Le cycle évolutif de la maladie

L'évolution du mildiou peut évoluer en plusieurs phases résumées dans la Figure 7. Les sporanges sont disséminés dans la nature par le vent et la pluie et certains d'entre eux atteindront des plantes réceptives. Le sporange peut germer directement et pénétrer dans les tissus de la plante ; mais plus souvent, il subira des divisions cellulaires internes, aboutissant à la formation de 8 zoospores¹ flagellés mobiles dans l'eau. Ces zoospores germent et forment un appressorium en surface de la plante (feuille, tige, tubercule) ou pénètrent par les stomates et l'hyphe pénètre dans les tissus végétaux. Le mycélium envahit les cellules végétales, c'est l'incubation, non visible à l'œil nu. En fin d'incubation, la tache devient visible à l'œil nu, le mycélium est présent à l'extérieur des feuilles et des tiges et peut produire, si la durée de la période humide est suffisante, des sporangiophores produisant des sporanges. Le cycle estival est bouclé. (Ducattillon et *al.*, 2006).



Figure 7 : Cycle biologique du *Phytophthora infestans* (Ducattillon et *al.*, 2006).

Le mildiou causé par le *Phytophthora infestans* a une reproduction à la fois sexuelle et asexuelle. Il donne naissance à des oospores, des spores à la paroi épaisse pouvant survivre pendant des années dans le sol. Lors de leur germination, les oospores produisent des spores asexuelles appelées sporanges qui survivent seulement dans les tissus d'hôtes vivants, comme des pommes de terre rejetées. Ce sont souvent les sources de l'infection qui précèdent une flambée épidémique de la maladie (Ducattillon et al., 2006).

Une fois libérés, les sporanges sont disséminés rapidement par les éclaboussures de la pluie et sur de longues distances par le vent (Williams, 1994). Des conditions humides favorisent le développement de la maladie et une humidité élevée (supérieure à 90 %) accélère le développement des sporanges qui germent rapidement sur des feuilles humidifiées; des plants entiers peuvent ainsi être détruits en un très court laps de temps (Mercure, 1998).

5.5 Lutte contre le mildiou de la pomme de terre

Parmi les outils disponibles pour la lutte contre du mildiou, on compte les systèmes d'alerte au mildiou et les techniques de surveillance, les techniques culturales, la résistance génétique et la pulvérisation de produits de substitution aux produits chimiques et une gestion biologique.

5.5.1 Méthodes préventives et prophylactiques

Dans la lutte contre le mildiou, le dépistage sur le terrain est très important. Les producteurs devraient donc inspecter leurs champs deux fois par semaine. Les symptômes apparaissent d'abord autour des dépressions de terrain, des mares ou des ruisseaux, près des pivots des systèmes d'irrigation par aspersion et dans les endroits à l'abri du vent. Les champsensemencés tôt sont susceptibles d'être atteints les premiers (Bob et Whalen, 1998).

En effet, plusieurs méthodes peuvent être préconisées à titre préventif :

- Les rotations des cultures peuvent également aider, surtout lorsque les repousses spontanées de pommes de terre deviennent un problème (Caldwell et Brian ; Saling et Travis, 1998).
- L'utilisation de semences certifiées peut diminuer l'infestation causée par des semences malades.

- Le travail du sol visant à enfouir les plants infectés peut également donner des résultats. Il faut détruire tous les plants dans un rayon de 15 pieds du site d'infection (Caldwell et Brian, 1998).
- Ne pas mélanger les lots de semences.
- La plantation doit avoir lieu lorsque les températures du sol sont d'au moins 10 °C. Planter pour une récolte hâtive aide également à éviter l'infection (Caldwell et Brian, 1998).
- Les spores de mildiou peuvent aussi se disperser lors du tranchage et de la plantation des plantons. Un plantoir qui utilise la pression à vide au lieu des ergots ou des cuillères peut contribuer à prévenir l'infection des plantons.
- La profondeur d'enfouissement des plantons et le buttage doivent être surveillés avec soin.
- l'irrigation par aspersion doit être planifiée avec soin.

5.5.2 Lutte chimique

Un programme préventif de vaporisation est toujours recommandé. Une lutte efficace au moyen de fongicide nécessite une bonne couverture du feuillage, des doses convenables et un calendrier d'application adéquat. De manière générale, les fongicides sont plus efficaces aux premiers stades de l'infection, avant l'apparition des symptômes. Toutefois, aucun fongicide ne peut traiter une infection bien établie. Les fongicides contre le mildiou sont essentiellement des fongicides à action préventive et ne sont pas particulièrement persistants. Ils doivent servir à protéger les plants comme le ferait une pulvérisation prophylactique, dans le cadre d'une stratégie globale visant à empêcher que la maladie infecte la récolte (Al-Mughrabi, 2011).

On peut utiliser des traitements cupriques (de cuivre) de façon préventive pour éviter la propagation du mildiou. Plusieurs produits de cuivre commerciaux approuvés sont disponibles Depuis août 2003 (Al-Mughrabi, 2011).

4.5.3 Lutte génétique

Actuellement, il n'y a aucune variété de pomme de terre qui soit totalement résistante au mildiou. Quelques cultivars comme Kennebec, Elba, Onaway, Rosa et Sebago affichent cependant un certain degré de résistance (Anon, 2006 ; Greg et Williams, 1994) et font l'objet d'études approfondies dans les programmes de sélection.

La biotechnologie est également mise à profit dans la recherche sur la résistance au mildiou. On s'attend à voir apparaître bientôt des souches commerciales totalement résistantes génétiquement modifiées (Greg et Williams, 1994). Cependant, des OGM ne seraient pas acceptables en production biologique (Laura et *al.*, 1998).

5.5.4. Lutte biologique

C'est l'utilisation d'organismes vivants ou des substances qu'ils produisent pour limiter ou supprimer les activités et les populations des pathogènes (INRA, 2005).

Ses substances sont des pesticides préparés à partir de produits naturels comme les plantes. Ils sont généralement moins dangereux et sont plus spécifiques à la cible visée par rapport aux pesticides conventionnels. Ils sont efficaces à faible dose et se décomposent rapidement, d'où un impact environnemental moindre même si la matière active est toxique (Fredon, 2008).

2. Introduction

Ce présent travail vise l'étude du pouvoir antifongique *in vivo* et *in vitro* des extraits des feuilles de Laurier sauce (*Laurus nobilis* L.) à l'égard de *P.infestans* agent responsable du mildiou de la pomme de terre. Notre expérimentation s'est déroulée au niveau de la station régionale de la protection des végétaux (SRPV) de Boufarik (Wilaya de Blida). Elle a nécessité l'utilisation d'un matériel biologique et le suivi d'une méthodologie comportant six étapes essentielles :

- Collecte des échantillons de feuilles de la plante aromatique Laurier sauce et des feuilles de la variété *Spunta* de la pomme de terre.
- Préparation des extraits de l'huile essentielle et l'extrait aqueux de Laurier sauce.
- Détermination des rendements en l'huile essentielle et taux d'humidité des feuilles de Laurier sauce.
- Etude anatomique des feuilles de Laurier sauce.
- Etude de l'activité antifongique *in vitro* et *in vivo* des extraits de Laurier sauce à l'égard de *P.infestans*.
- Analyse statistique.

2.1 Matériel biologique

Le matériel biologique utilisé regroupe le matériel végétal représenté par les feuilles de *Laurus nobilis* L., les feuilles saines de la variété *Spunta* de pomme de terre et le matériel fongique représenté par une souche Algérienne A2 de *Phytophthora infestans*.

2.1.1 Matériel fongique

Un isolat fongique purifié de *Phytophthora infestans* ; sujet de traitement par les extraits en huiles essentielles et l'autre aqueux des feuilles de *Laurus nobilis* L.

L'isolat fongique a été prélevé de la collection des isolats Algériens des zones de production de la pomme de terre il a été isolé de la région de Meftah wilaya de Blida entretenu par repiquage sur milieu à base de petits pois agar (composition voir annexe) et incubé à 18°C pendant 21 jours (Hammi, 2003).

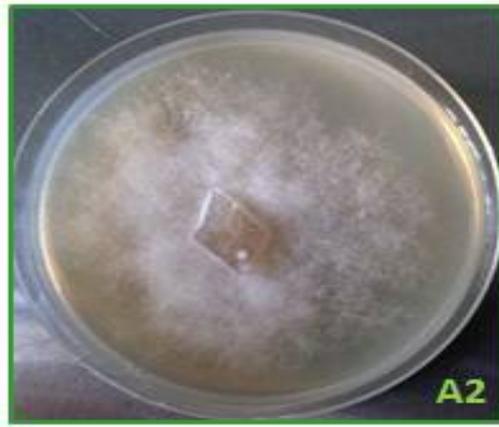


Figure 8 : Isolat de *Phytophthora infestans* (Souche A2) (Photo personnel)

2.1.2 Matériel végétal

2.1.2.1 Feuilles de *Laurus nobilis* L.

Le matériel végétal utilisé pour cette expérimentation est représenté par l'extrait d'huile essentielle et l'extrait aqueux des feuilles de *Laurus nobilis* L., appartenant au genre *Laurus*, de la famille des *Lauracées*, appelé communément : Laurier sauce. La récolte des feuilles a été réalisée, au jardin d'essai d'El Hamma au printemps sur cinq arbustes de laurier choisis d'une façon aléatoire. Ces arbustes se trouvent généralement en situation mi-ombragée, ils ne bénéficient d'aucun entretien, ils sont arrosés de temps à autres de façon irrégulière. Les échantillons des rameaux feuillés de 30 à 50 cm de long situés au sommet des arbustes ont été récoltés à l'état frais.



Figure 9 : Les feuilles récoltées du jardin d'essai d'El Hamma (Photo personnel).

2.1.2.2 Feuilles de pomme de terre

Des feuilles saines au stade début de floraison, de la variété *Spunta* de pomme de terre ont été récoltées à partir d'une parcelle, indemne de mildiou, située près de l'ITCMI de Staouli à la wilaya d'Alger.



Figure 10 : Feuilles de la variété *Spunta* de pommes de terre (Photo personnel).

2.2. Méthodes

2.2.1 Préparation du matériel végétal

2.2.1.1 Préparation des feuilles de *Laurus nobilis* L.

Après la récolte, les échantillons ont été lavés et triés pour garder seulement les feuilles saines et propres, ils ont été étalés sur les paillasses au laboratoire à l'air libre et retournées de temps à l'autre pour éviter l'attaque des moisissures. Après séchage les échantillons sont coupés en petits fragments pour l'extraction de l'huile essentielle et extrait aqueux.



Figure 11 : Feuilles de *Laurus nobilis* L., séchées. (Photo personnel).

2.2.1.2 Préparation des feuilles de Pomme de Terre

Selon la méthode de Klarfeld *et al.* (2000) ; Les feuilles saines, ayant un diamètre supérieur ou égale à 30 mm ont été choisies puis découpées à l'aide d'un emporte pièces en disques uniformes lavés à l'eau du robinet.



Figure 12 : Feuilles préparées pour le traitement et l'inoculation (Photo personnel).

2.2.2 Préparation des extraits de feuilles de *Laurus nobilis*

2.2.2.1 Extraction de l'huile essentielle

L'huile essentielle des feuilles de *Laurus nobilis* L., a été extraite par hydrodistillation. Son principe consiste à immerger la matière végétale directement à traiter dans un alambic rempli d'eau qui est en suite portée à ébullition. Les vapeurs hétérogènes sont condensées sur surface froide et l'huile essentielle se sépare par différence de densité (Bruneton, 1999).

2.2.2.2 Préparation de l'extrait aqueux

Après séchage à l'air libre, les feuilles de *Laurus nobilis* L., ont été broyées jusqu'à l'obtention de poudre, pesées et récupérées dans une boîte propre conservée à l'abri de la lumière et de l'humidité pour éviter toutes contaminations et dégradation de la matière active.

Les extraits aqueux ont été obtenus par décoction de 10 g de poudre végétale dans 100 ml d'eau distillée stérile. Cette opération a été réalisée au niveau de l'autoclave à 120°C pendant 20 minutes dans une fiole bien fermée et cela, afin d'éviter toute forme de contamination provenant des feuilles. L'extrait est récupéré par filtration sur papier Wattman stérile sous une hotte aspirante. Le filtrat obtenu a été récupéré dans des flacons en verres stériles hermétiquement fermés et conservés au réfrigérateur à 4°C jusqu'à son utilisation.

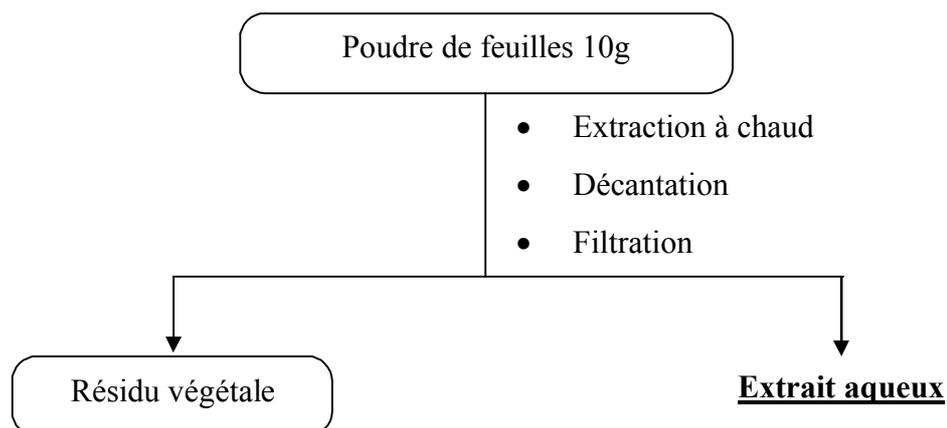


Figure 13 : Schéma de macération par l'eau distillée de la poudre de *Laurus nobilis* L.

2. 2. 3 Rendement et taux d'humidité

2.2. 3.1 Rendements en huiles essentielles

Le volume du distillat obtenu est mesuré soit V (ml), les rendements sont calculés selon la formule suivante :

$$\text{Rdt (\%)} = (V/Ps) \times 100$$

V : volume d'huile essentielle (ml).

Ps : poids sec de la prise d'essai (g).

2.2.3.2 Taux d'humidité des feuilles

Pour connaître le taux de la matière sèche contenue dans la poudre des feuilles sèches de *Laurus nobilis* L., on a appliqué la méthode rapporté par Lindon et Lorient (1994) basée sur la dessiccation à une température de 105°C dans une étuve isotherme, les résultats sont exprimés selon la formule suivante :

$$\text{MS (\%)} = (\text{PS/PF}) \times 100$$

- **MS (%)** : pourcentage de la matière sèche.
- **PS** : poids sec.
- **PF** : poids frais.

En effet, 50g de poudre de l'écorce et des feuilles de *Laurus nobilis* L., ont été placés dans l'étuve à 105 °C pendant 24h. Cette poudre a été retirée puis mise dans le dessiccateur afin d'éliminer l'humidité, puis mesurer la quantité d'eau qu'a perdu cette unité.

2.2.4 Etude anatomique de feuilles de *Laurus nobilis* L.

Afin de connaître la structure histologique responsable de la sécrétion des huiles essentielles, des coupes transversales des feuilles de *Laurus nobilis* L., ont été colorées selon la technique de double coloration (bleu de méthyle et rouge Congo) utilisée par de nombreux auteurs rapportés par la bibliographie (Boukhatem 2010 ; Madjene et Madani 2010). Cette technique comprend les étapes suivantes :

- Réaliser des coupes très fines à l'aide d'une lame.
- Mettre les coupes dans de l'eau javel durant 10 à 15 mn puis les rincer environ 10 à 20 mn.
- Les mettre à nouveau mais dans de l'acide acétique et pour 1 minutes avant de les rincer.
- Les laisser dans du bleu de méthyle pendant 20 minutes puis les rincer.
- Et enfin, dans du rouge Congo pour 5 minutes avant de les rincer.
- Les mettre entre lame et lamelle pour les observer au microscope photonique.

2.3 Etude du pouvoir antifongique *in vitro* et *in vivo* des extraits des feuilles de *Laurus nobilis* L., à l'égard de *Phytophthora infestans*

La lutte chimique contre le mildiou ou brûlure tardive causée par *Phytophthora infestans*, par l'utilisation de fongicides à base de metalaxyl lui a permis une certaine résistance avec l'apparition des souches agressives du type sexuel A2. (Alim, 2010).

Ainsi, dans le cadre de recherche de méthodes alternatives de lutte biologique contre cette maladie, qui a fait l'objet de plusieurs mémoire de fin d'étude (Serrir et Moussaoui, 2011 ; Saadoune, 2011 ; Bachir, 2011 ; Feniche, 2012 ; Zanoune, 2012). Notre travail représente consiste à étudier le pouvoir antifongique *in vitro* et *in vivo* d'huile essentielle et l'extrait aqueux de feuilles de *Laurus nobilis* L., à l'égard d'isolat Algérien A2 de *P. infestans*

La survie *in vitro* et *in vivo* de ces derniers traités par les extraits précédents permettra de confirmer leurs effets fongicides ou fongistatiques.

2.3.1 Etude du pouvoir antifongique *in vitro* des extraits des feuilles de *Laurus nobilis* L.

Le pouvoir antifongique *in vitro* a été basé sur l'inhibition de la croissance mycélienne de la souche A2 de *P. infestans* réalisé suivant la méthode de contact directe par Mishra et Dubey (1994) sur milieu PPA maintenu en surfusion à 45 °C, Les procédures microbiologiques, et La concentration minimale inhibitrice (CMI) de l'huile essentielle et celle de l'extrait aqueux ont été déterminées selon la méthode rapportée par Remmal *et al.* (1993), et Satrani *et al.* (2001) in El Ajjouri *et al.* (2008).

2.3.1.1 Préparation des traitements à base des extraits des feuilles de *Laurus nobilis* L.

Des émulsions diluées sont préparées de l'eau agar avec l'huile essentielle des feuilles de *Laurus nobilis* L., en mesurant à chaque fois et respectivement à l'aide d'une micropipette stérile 10 ml d'eau agar stérile contre 1000, 500 et 100 microlitre d'huile essentielle de *Laurus nobilis* L. Pour retenir les dilutions suivantes : 1/10, 1/50 et 1/100.

Ces derniers correspondent respectivement aux doses D2, D3 et D4. Dans des tubes à essais stériles qui ont été soumis à l'agitation à l'aide d'un agitateur de tubes vortex. En outre, l'huile essentielle pure D1 de la même espèce sera aussi appliquée.

On prépare parallèlement l'extrait aqueux à l'état pure et ses dilutions de : 1 /10, 1/50 et 1/100 correspondant respectivement aux doses : D1, D2, D3 et D4.

Pour chaque dilution 1,5 ml des extraits de la plante étudiée est versé dans des boîtes de Pétri à l'aide d'une micropipette stérile sur 13,5 ml du milieu PPA maintenu en surfusion à 45°C est ensuite coulé dans les boites contenant les extraits et leurs dilutions. Ces dernières sont légèrement agitées pour homogénéiser le milieu. En ce qui concerne les témoins, les extraits sont remplacés par l'eau distillée stérile. Chaque dilution sera répétée Cinq fois pour l'isolat phytopathogène.

Ainsi, à l'aide de pipettes Pasteur stériles, un disque d'inoculum de 5 mm de diamètre d'isolat A2 est prélevé puis déposé au centre des boites de pétri. Ces dernières seront bien fermées et entourées d'un para film. L'incubation des boites ainsi préparées se fait dans l'incubateur réglée à la température de 18°C pour évaluer la croissance mycélienne.

En calculant la moyenne des deux diamètres mesurés sur deux axes perpendiculaires tracés au revers des boites de culture, pendant une durée d'incubation de 15 jours.



Figure 14: L'incubation des boites dans l'incubateur (Photo personnel).

2.3.1.2 Croissance mycélienne

La concentration minimale inhibitrice de la croissance mycélienne (CMI) a été déterminée pour chaque extrait (d'huile et aqueux) des feuilles de *Laurus nobilis* L., et pour chaque dilution.

Ainsi, les taux d'inhibition de la croissance mycélienne ont été déterminés pour l'isolat de *P. infestans* selon la formule décrite par Sy (1976) et Rollan *et al.* (1999) in Ibarra-Medina *et al.* (2010) :

$$I (\%) = \frac{(DT - Dt)}{DT} \times 100$$

- I : Taux d'inhibition de la croissance en %.
- DT : Diamètre de la croissance mycélienne du champignon témoin (mm).
- Dt : Diamètre de la croissance mycélienne du champignon traité (mm).

2.3.1.3 Morphologie de l'isolat de *P. infestans* traité et témoin

Pour comprendre et pouvoir définir l'effet de l'huile essentielle et l'extrait aqueux sur l'isolat fongique. Une description structurale a été réalisée après 7 jours d'incubation, par observation directe des cultures traitées et témoins d'isolats A2 de *P. infestans* sous microscope photonique au grossissement (x 500).

2.3.1.4 Sporulation

Après incubation de 21 jours de croissance l'isolat fongique développé sur milieux traité et témoin à la température de 18°C, 15 ml d'eau distillée stérile sont versés dans chaque boîte de culture qui ont été raclées à l'aide d'un scalpel stérile pour récupérer les suspensions sporangiales dans des tubes à essai stérilisés. Ces derniers ont été soumis à l'agitation à l'aide d'un agitateur de tubes vortex. Les suspensions ainsi préparées de l'isolat A2 traité par les extraits ainsi que celles des témoins ont fait l'objet de détermination de la concentration en spores par le biais d'une cellule de Malassez pour déterminer l'inhibition de la sporulation de chaque extraits des feuilles de *Laurus nobilis* L., pour chaque concentration selon la formule de Pandey et al. (1982).

$$IS(\%) = \frac{(ST - St)}{ST} \times 100$$

- IS : Taux d'inhibition de la sporulation en %.
- ST : Concentration en sporanges de l'inoculum témoin (sporangies/ml).
- St : Concentration en sporanges de l'inoculum traité (sporangies/ml).

2.3.1.5 Survie de l'isolat de *P.infestans*

La survie de l'isolat phytopathogène de *P.infestans* soumis aux différents traitements à base des extraits des feuilles de *Laurus nobilis* L., a été appliquée sur feuilles détachées de pomme de terre. Afin de confirmer l'effet fongistatique ou fongicide des traitements testés, les extraits de plantes ayant montré une inhibition remarquable sur la croissance mycélienne de l'isolat de *P.infestans* ont été pris en considération, et l'observation a été suivie quotidiennement et prolongée jusqu'à 31 jours dans les boîtes où il n'y a pas eu de germination.

2.3.2 Etude de pouvoir antifongique *in vivo* des extraits de *Laurus nobilis* L.

Le pouvoir antifongique *in vivo* consiste à l'inoculation des folioles détachées récupérées de la pomme de terre qui ont subi deux modes de traitement : préventif par trempage et curatif.

2.3.2.1 Traitement préventif par trempage

Dans des boites transparentes et stériles, sont déposés respectivement du papier filtre (stérilisé à 120°C pendant 2 h dans un four Pasteur) et du grillage en plastique à la taille des boites. Après avoir imbibé le papier filtre d'eau distillée stérile. Les feuilles de pomme de terre détachées lavées et découpées en rond ont été placées en nombre de 5 par boite.



Figure 15 : Préparation des feuilles de Pomme de Terre (Photo personnel).

Les disques foliaires de chaque boite ont été soumis au trempage dans les extraits (l'huile essentielle et extrait aqueux) de *Laurus nobilis* L. pure et à différentes concentrations : 1/10, 1/50 et 1/100 durant une minute puis, placés sur la face supérieure dans les boites préalablement préparées.

Ainsi, l'inoculation se fait sur la face inférieure par dépôt de 100 µl de suspension sporangiale d'ordre de 3×10^5 sporanges/ml de l'isolat A2. En, outre une boite a été consacrée aux témoins positifs trempés dans l'eau distillée stérile.

2.3.2.2 Traitement Curatif

Ce mode de traitement est réalisé par inoculation des folioles détachées préparées précédemment dans les boites transparentes (Figure 15) et par dépôt de 100µl de suspension sporangiale sur leur face inférieure. Après 24h d'inoculation, 80µl des suspensions des extraits (huile essentielle et extrait aqueux) pures et à différentes dilutions : 1/10, 1/50 et 1/100 sont déposées sur les feuilles préalablement inoculées au même point de l'inoculation (Berber *et al.*, 2009).

Par ailleurs, une autre boîte dont les folioles inoculés avec les isolat A2 ont été considérées comme des témoins positifs traité par l'eau distillé stérile (Fontem et *al.*, 2005 ; Khair & Wafaa ; 2007).



Figure 16 : Inoculation des feuilles détache en mode curative. (Photo personnel).

2.3.2.3 Inhibition des symptômes

La lecture des résultats a porté sur l'expression des symptômes des deux modes d'application étudiés (préventif et curatif) en termes de pourcentage de superficie infectée par le mildiou de la pomme de terre, représentée par le nombre de feuilles présentant des symptômes typiques du mildiou. Ainsi, ont été déterminés les % d'inhibition d'expression des symptômes selon la formule proposée par Berber et *al.*(2009) :

$$Inf (\%) = \frac{(Inf T - Inf(t))}{Inf T} \times 100$$

- Inf : Taux d'infection des feuilles en %.
- Inf T : Taux d'infection des feuilles témoins positifs en %.
- Inf (t): Taux d'infection des feuilles traitées en %.

2.3.3 Analyse statistique

L'activité antifongique des deux extraits de *Laurus nobilis* L., a été indiquée par la mesure des diamètres des colonies fongiques à l'aide d'un double décimètre. Pour la détermination du pouvoir antifongique les Cinq répétitions ont été résumées par le calcul de la moyenne dans l'Excel, puis le calcul du pourcentage d'inhibition par la formule de Pandey *et al.* (1982).

Afin de vérifier une éventuelle efficacité des extraits vis-à-vis de la souche fongique testée et la comparaison entre le traitement par l'huile essentielle et l'extrait aqueux tout en considérant les dilutions, et le mode d'application des extraits de la plante, nous avons utilisé le logiciel SYSTAT, ver. 12, SPSS 2009, en déterminant la variance à l'aide du GLM (General Linear Model), les différences ont été considérées significatives à $P \leq 0.05$.

L'hypothèse de l'efficacité antifongique des extraits est testée par le modèle de la distance euclidienne à un facteur contrôlé par le logiciel PAST (Paléontological Statistics, ver. 1.81 (Hammer *et al.*, 2001).

3.1 Structure anatomique de la feuille de *Laurus nobilis* L.

La feuille de *Laurus nobilis* L possède un épiderme fortement cutinisé est présent sur les deux faces mais les stomates n'existent que sur la face supérieure. On qualifie cette disposition des stomates d'hypostomatique.

En dehors de la nervure principale, le mésophylle présente une structure bifaciale typique . Sous l'épiderme de la face inférieure se reconnaît un parenchyme palissadique formé de deux assises cellulaires. Nos coupes sont semblables à celles de Reille et Lavoie (2010).

Du côté de la face supérieure, le parenchyme est de type lacuneux, dans lequel s'ouvrent les chambres sous-stomatiques. De grosses cellules sécrétrices d'essence se rencontrent dans ces deux types de parenchyme (Figure17).



Figure 17 : Coupe transversale d'une feuille de *L. nobilis*. (Gr x 100)(Photo personnel).

3.2 Rendements en matière sèche, en huile essentielle et en extrait aqueux de *Laurus nobilis* L.

Un taux d'humidité ($6.79 \% \pm 0.18$) inférieure à 10% a été enregistré pour notre plante *Laurus nobilis* L., L'extraction des huiles essentielles a permis d'obtenir un rendement en huile essentielle des feuilles compris entre 0,5 et 1, 5%. Ces taux enregistrés sont supérieurs à ceux obtenus par Richard en 1992 (0,5 à 1%) et Plaque en 1997 (1%) pour les feuilles de la même espèce mais récoltées de différentes régions européennes. Mais proches de ceux de l'équipe Algérienne de Chaouche et *al.* (2011) (1,80 %). D'autre part, le rendement en extrait aqueux était de 15,2%.

La sporulation du champignon traité par l'huile essentielle pure et à différentes dilutions n'était pas marquée après l'observation par le microscope optique. Ainsi pour l'extrait aqueux pure et ses dilutions ; 1/10, 1/50. En effet, le pouvoir antifongique *in vitro* de l'huile essentielle de *Laurus nobilis* L., pure et diluée à 1/10, 1/50 et 1/100 a révélé une efficacité de 100% d'inhibition de la sporulation de l'isolat A2 de *P.infestans* avec l'extrait aqueux pure et dilué à ; 1/10, 1/50 mais par degré moindre de l'extrait aqueux à dilution 1/100 (Figure 24).

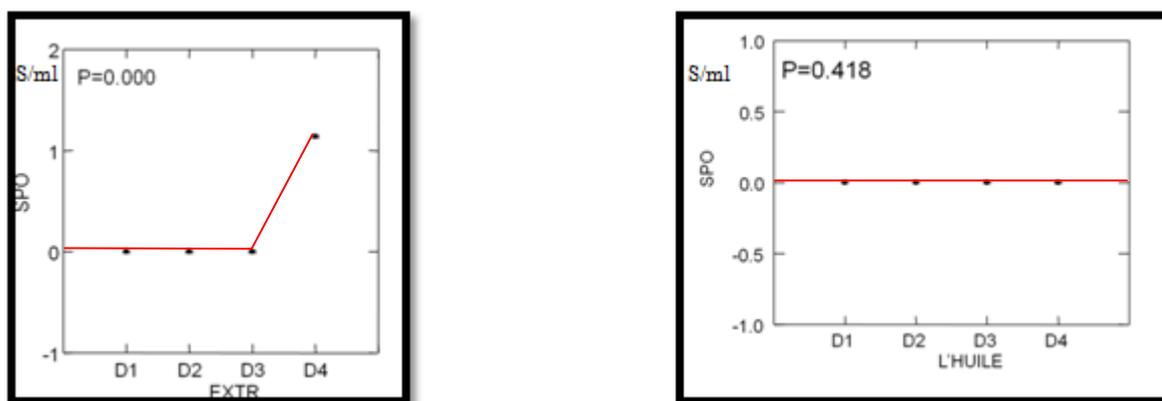


Figure 24 : Taux d'inhibition de la sporulation de *P.infestans* sous l'effet des extraits des feuilles de *Laurus nobilis* L., à différentes dilutions.

Cependant, il était important donc de déterminer leur effet fongistatique ou fongicide. (Tableau 11).

Tableau 11 : Effet des extraits des feuilles de *Laurus nobilis* L., sur la sporulation de la souche A2 de *P.infestans*.

Traitement	Taux de sporulation (x 10 ⁵ Sporangies/ml)
Témoin	0,4
L'huile pure	0
L'huile 1/10	0
L'huile 1/50	0
L'huile 1/100	0
Ex aqueux pure	0
Ex aqueux 1/10	0
Ex aqueux 1/50	0
Ex aqueux 1/100	0,2



Figure 25 : Morphologie des sporanges de *P.infestans* observée au microscope photonique (Gr : x 500).

3.3.1.4. Survie de *P.infestans* traité par l'huile essentielle et l'extrait aqueux de *Laurus nobilis* L.

En effet, les explants mycéliens de l'isolat A2 préalablement inhibé par l'huile pure et dilué, aussi l'extrait aqueux pure et dilué aux concentrations 1/10, 1/50 sur milieu PPA frais n'a pas permis la reprise de croissance de ces derniers jusqu'à même un mois d'incubation. Dans ce sens leur non survie affirme leur efficacité avec un effet fongicide par une forte inhibition de la sporulation de l'isolat A2 de *Phytophthora infestans*.

3.3.2 Pouvoir antifongique *in vivo*

Dans cette partie du travail, on compare l'effet des deux extraits des feuilles de *Laurus nobilis* L., testés à deux modes de traitements préventif par trempage et curatif sur la souche A2 de *P.infestans* qui a été estimé par rapport aux taux d'infection enregistrés sur les disques foliaires exprimant l'expression des symptômes du mildiou sur les feuilles de pomme de terre traitées par les deux extraits.

Tableau 12 : Analyse de la variance des taux d'infection *in vivo* en fonction de la nature des extraits , et le mode de traitement.

Facteurs	Somme des carrés	d.d .l	Carrés moyens	F-ratio	P
Mode de traitement	2787.840	1	2787.840	9.811	0.002
Traitement Préventif	0	1	0	0	1
Traitement Curatif	840.500	1	840.500	1.593	0.213

L'analyse de la variance des pourcentages du pouvoir infectieux de *P.infestans* a montré une différence significative entre les deux modes de traitements. L'analyse de la variance des taux d'incidence n'a pas montré des différences significatives entre la nature des extraits appliqués au mode préventif. Parallèlement, une différence significative a été révélée pour le mode curatif entre ses derniers (Tableau 12).

En modèle GLM, les taux d'incidence des symptômes ont permis le classement des modes d'application dans l'ordre décroissant suivant (Figure 26).

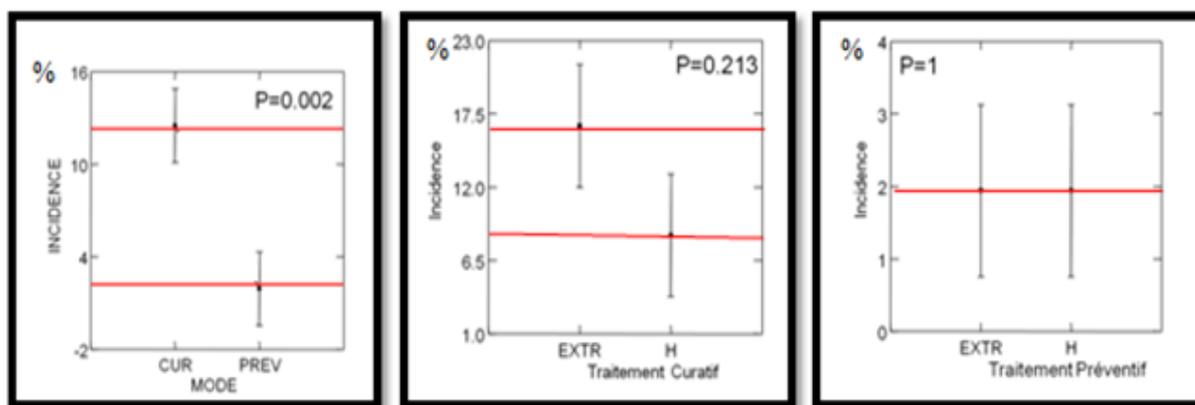


Figure 26 : Analyse de la variance en modèle GLM de l'apparition des symptômes selon les modes d'application des traitements.

3.3.2.1 Traitements Préventifs

Tableau 13 : Variabilité de taux d'incidence de la souche A2 de *P.infestans* sous traitements des extraits de *Laurus nobilis* L., testées par le mode préventif.

Facteurs	Somme des carrés	d.d.l.	Carrés moyens	F-ratio	P
HU (Traite Préventif)	7056.000	4	1764.000	6.481	0.002
EA (Traite Préventif)	376.360	4	94.090	4.027	0.015

Les traitements préventifs avec l'extrait aqueux et l'huile essentielle de *Laurus nobilis* L., pure et à différentes dilutions ont montré un pouvoir antifongique contre l'isolat A2. Le témoin (+) a considérablement révélé des signes de la maladie par rapport au mode de traitement utilisé et les deux extraits étudiés ; nous a renseigné sur l'état des feuilles, et sur la virulence du champignon. (Tableau 13).

En modèle GLM, l'absence des symptômes de la maladie selon ce mode d'application par les deux extraits de *L.nobilis* est comprise entre 2.5 et 5 jours. Le témoin a montré des symptômes rapidement. Ainsi, le classement des dilutions applique a été établi dans l'ordre suivant (Figure 27).

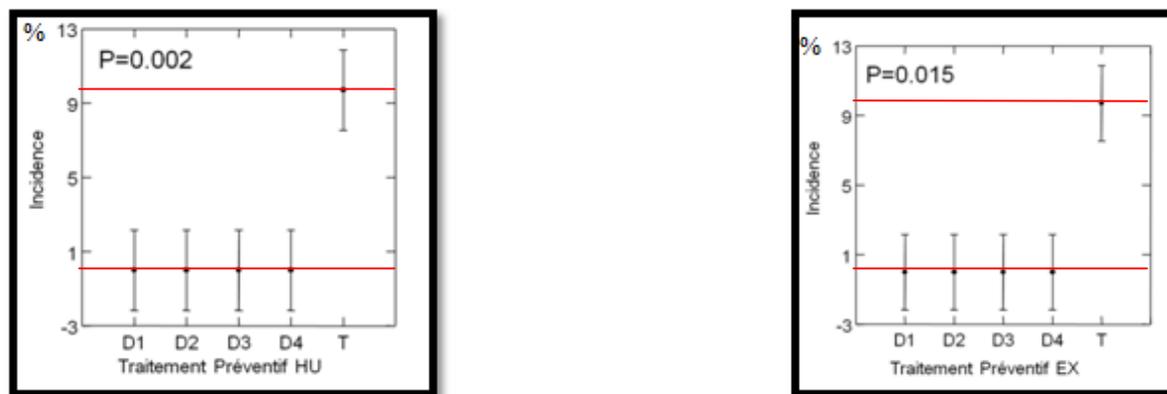


Figure 27 : Taux d'incidence des symptômes de *P.infestans* sous l'effet des extraits de *Laurus nobilis* L., à différentes dilutions au traitement préventif par trempage.

3.3.2.2 Traitements Curatifs

Le traitement curatif avec l'extrait aqueux de *Laurus nobilis* L., à différentes dilutions a montré un développement des symptômes. Ce développement s'est prononcé par de légères nécroses, chloroses, accompagnés d'un léger brunissement suivies d'un duvet blanchâtre. Les mêmes résultats ont été visibles sur les témoins (+) inoculés et imbibés par de l'eau distillé stérile.

Tableau 14 : Taux de l'incidence des Symptômes du mildiou sur les feuilles de pomme de terre traitées par les différentes doses d'extrait aqueux sur le *P.infestans* au mode curatif.

Dilutions de l'Extrait Aqueux	Taux de l'Incidence des Symptômes (%)
1/10	4.1
1/50	15.6
1/100	21.3

En terme de dose, l'infection progresse pour atteindre en moyenne de 13.33 %, cela peut s'expliquer par la croissance du champignon qui augmente avec la diminution des concentrations de l'extrait aqueux. Cette différence s'est avérée très hautement significative (Tableau 14).

Tableau 15 : Variabilité de taux d'incidence des symptômes de la maladie sur les feuilles sous traitements à base des extraits de *Laurus nobilis* L., testées selon le mode curatif à plusieurs dilutions.

Facteurs	Somme des carrés	d.d.l.	Carrés moyens	F-ratio	P
HU (Traite Curatif)	376.360	4	94.090	4.027	0.015
EA (Traite Curatif)	5500.300	4	1375.075	3.758	0.019

L'analyse de la variance de taux d'incidence des symptômes a montré une différence hautement significative entre la nature des deux extraits, les dilutions testées et le témoin incorporé. L'ensemble des feuilles testées par l'extrait aqueux de *Laurus nobilis* L., ont montré les mêmes symptômes que celles de témoin. (Tableau15).

En modèle GLM, une grande variabilité des taux d'incidence de la souche A2 a été révélée entre les deux extraits des feuilles de *Laurus nobilis* L., l'incidence était plus importante pour les dilutions de l'extrait aqueux contrairement à l'huile essentielle qui a enregistré le 0% d'incidence de la maladie. (Figure 28).

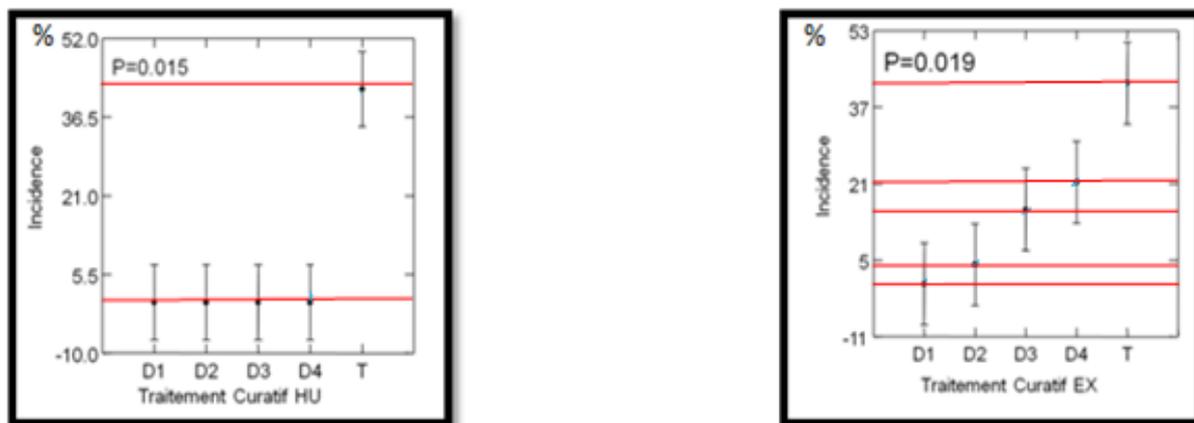


Figure 28 : Variabilité de taux d'incidence des symptômes du mildiou sous l'effet des extraits de *Laurus nobilis* L., à différentes dilutions au traitement curatif.

3.3.2.3 Description des symptômes foliaires

Sur les disques des feuilles inoculées, le premier signe macroscopique de l'infection est l'apparition de taches humides juste au point de l'inoculation. Ces taches devenant brunes. Les nécroses se développent et s'élargissent différemment. Après une semaine d'incubation, et avec les conditions optimales de température et d'humidité, quelques feuilles nécrosées se recouvrent non pas sur leurs faces inférieures qui sont au contact avec le grillage de séparation, mais sur leurs faces supérieures libres, elles se recouvrent par une fructification blanchâtre abondante du pathogène (Figure 29).

Conclusion

Ce présent travail a révélé un effet antifongique très fort sur l'isolat Algérien A2 de: *Phytophthora infestans* suite à un test *in vitro* et *in vivo* de l'huile essentielle de feuilles de *Laurus nobilis* L. par la technique de contact direct sur un milieu à base de petits pois Agar *in vitro*, aussi l'inoculation du champignon et son traitement curatif et préventif par trempage *in vivo* par le même huile sur les feuilles détachées de pomme de terre de variété *Spunta* ; un pourcentage d'inhibition, a été estimé de l'ordre de 100 % avec différentes dilutions qui s'est répercuté sur la structure du pathogène par la lyse de son mycélium, ainsi que la sporulation été totalement stoppée.

Suivant nos résultats, nous pouvons prédire que l'extrait aqueux étudié c'est un agent antifongique naturel efficace et peuvent être une source très importante de lutte biologique préventif utilisé pour limiter les pourritures d'origine fongique *P.infestans*.

Cependant, il faut signaler que les activités biologiques de l'huile essentielle ou l'extrait aqueux de notre plante ne sont pas seulement dues aux composés majoritaires mais à l'ensemble des composés de base. Egalement la technique d'extraction par hydrodistillation semble un procédé qui permet d'améliorer la stabilité de l'huile essentielle et son disponibilité biologique. D'autres procédés plus élaborés, comme l'addition de la poudre des feuilles à l'eau distillée stérile avec la méthode de conservation sous atmosphère modifiée permettent de bénéficier d'une plus longue conservation.

Les résultats obtenus *in vitro et in vivo* ne constituent qu'une première étape de recherche et qui ne sont pas tout à fait les mêmes résultats obtenus une fois appliquée au champ. Cette étude mérite :

- Une analyse approfondie des mécanismes d'action des ces composés purifiés, et une recherche plus avancée sur la synergie de ces derniers.
- Il faut mener une étude détaillée sur la composition qualitative et quantitative de ces extraits par le couplage de la CPG/SM.
- Des études ultérieures plus approfondies doivent être effectuées afin de cerner l'activité antifongique des huiles essentielles dans les cultures menacées leur tests de toxicité semble d'une grande importance.
- Tester leur pouvoir antifongique vis-à-vis d'autres agents phytopathogènes redoutables.

- De plus, il est impératif de bien conditionner l'huile essentielle, et le végétal étudié ; Il s'agit là de l'incidence des facteurs environnementales, géographiques et édaphiques.
- Valoriser le patrimoine forestier Algérien et élaborer de nouveaux produits à haute valeur ajoutée, de *Laurier Sauce* (*Laurus nobilis* L.). Ce dernier représente une famille de molécules naturelles abondantes, de faible cout et possédant des propriétés biologiques notables.

Introduction

Partie bibliographique

Matériels et méthodes

Résultats et discussions

Références bibliographiques

Annexes

Conclusion

Références bibliographiques

- **AFNOR , 2000** : Association Française de Normalisation, Tome 2 – Volume 2, Monographies relatives aux huiles essentielles, 6ème édition. AFNOR, Paris.
- **AFNOR , 2000** : Recueil de normes : les huiles essentielles. Tome 1. Echantillonnage et méthodes d'analyse. AFNOR, Paris : 440 p.
- **AFSSAPS, 2008** : Recommandations relatives aux critères de qualité des huiles essentielles.
- **Ahmed-Serir, B. & Moussaoui, A., 2011** : Le mildiou de la pomme de terre *Solanum tuberosum* L. en Algérie : Caractérisation culturelle et pathogénique de trois isolats Algériens de *Phytophthora infestans* (Mont.) De Bary. Th. Ing.Univ. Saad Dahleb de Blida, Algérie : 47 p.
- **Alim, Y. 2010** : La filière de pomme de terre en Algérie: 12-13 p.
- **Al-Mughrabi Kh ., 2011**: Président de Groupe de travail national sur le mildiou - Centre de développement de la pomme de terre. Ministère de l'Agriculture, de l'Aquaculture et des Pêches du Nouveau-Brunswick Canada.
- **Anon ., 2006** : Cultural Cultivars. Oregon State University, Corvallis, OR.
- **Anonyme., 2008** : Maladies, ravageurs et désordres de la pomme de terre. Guide d'identification et fiches descriptives. Co-edition: Fnpppt, Gnis et Arvalis : 192 p.
- **Anonyme., 2012** : salon international de la pomme de terre Mosta batatis spécial quatrième édition : 4-6 p.
- **Atanda ., 2007** : Plantes aromatiques. Epices, aromates, condiments et huiles essentielles. Tec & Doc, Paris, 522 p.
- **Al-'Azîz A, Nezam Z ., 2009** : Efficacité des extraits d'eau de certains plantes pour le contrôle des maladies gommose Citrus par la peinture sur Cultivar dans la province côtière de Tartous Région 2007-2008. Septième Conférence de la Commission générale pour la recherche scientifique agricole Recherche Damas, 3-4.
- **Bamouh A ., 2003** : Fiche technique, l'abricotier, le prunier, le poirier et le pommier. Bulletin mensuel d'information et de liaison du PNTTA, Transfère de technologie en agriculture, n° 107 Arboriculture., Ministère de l'agriculture et de développement rural, Maroc : 4 p.

- **Barla A., Topçu G., Öksüz S., Tümen G., Kingston D.G.I., 2007:** Identification of cytotoxique sesquiterpènes from *Laurus nobilis* L., *Food chemistry* **104**: 1487-1484.
- **Beloued A., 2005 :** Plantes médicinales d'Algérie. Office des publications universitaires. Alger : 124 p.
- **Beloued A., 2001:** Plantes médicinales d'Algérie. Office des publications universitaires, Alger : 5-10 p.
- **Beloued A., 1998 :** Les plantes médicinales d'Algérie, Edit BORDAS, Paris : 118p.
- **Berber F., Ouazzani Touhami M., Badoc A. & Douira A. (2009).** Antagonisme *in vivo* de deux Trichoderma à l'égard de quatre espèces de *Bipolaris* pathogènes sur le Sorgho., Bull. Soc. Pharm. Bordeaux, **148**, 93-114 p.
- **Bensemmane A., 2008 :** union des opérateurs économiques pour le Renouveau du Monde Agricole et Rural – Revu ÉDITORIAL : l'Algérie célèbre l'année internationale de la pomme de terre _ Etat des lieux de la filière de la pomme de terre et recommandations N° 3.
- **Blaeser P & Steiner U., 2002:** Antifungal activity of plant extracts against potato late blight (*Phytophthora infestans*). Modern Fungicides and Antifungal Compounds 11-12th. International Reinhardtbrunn Symposium, Friedrichrode, Germany, 24-29th May, 1998:491- 499.
- **Bob M., and Whalen J., 1998:** Late Blight Control Update. University of Delaware, Newark.
- **Bruneton J., 1993 :** Pharmacognosie - photochimie, plantes médicinales. Tec & Doc. Lavoisier, Paris : 915 p.
- **Bruneton J., 1997 :** Element de phytochimie et de pharmacologie. Edition Lavoisier. Techniques et documentation, Paris : 75p.
- **Bruneton J., 1999 :** « Pharmacognosie, Photochimie, Plantes médicinales ». Editions Tec & Doc, Paris, éditions médicales internationales : 483-560 p.
- **Bruneton J., 2007 :** Pharmacognosie - Photochimie, plantes médicinales; 3e éd.; Tech & Doc./Lavoisier.
- **Bruneton J., 2009 :** Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales. 4 éme édition. Paris & Doc (Editions).
- **Burt S., 2004:** Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods a review. *Int. J. Food Microbiol.* **94**: 223-253.
- **Burt S., 2004:** *International Journal of Food Microbiology.*

- **Caldwell et Brian ., 1998** : Late Blight. Organic Farms, Folks & Foods. January-February : 9 p.
- **Castilho P.C., Costa M.D., Rodrigues A., Partidario A., 2005**: Characterization of laurel fruit oil from Madeira Island, Portugal. J. Am. Oil Chem. Soc : 82 - 83.
- **Changins,W. et Reckenholz, T .,2008** : La Pomme de terre – Journée Information Agriculture La pomme de terre dans la coopération au développement.
- **Chamont, S., 2010** : Le micro-organisme pathogène de la culture description de l'agent pathogène,. Perspectives Agricoles 236:1-20 p.
- **Chehat, F., 2008** : Revue Agricole ; La filière pomme de terre Algérienne : une situation précaire. Journée d'étude sur la filière pomme de terre : Situation actuelle et perspectives. I.N.A. El Harrach, le 18 Juin 2008, Alger : 1-11 p.
- **Clarys L., 2005** : La pomme de terre de contre saison dans le Sud EstMalgache. Inter aide, Programme Agricole MANAKARA : 3p
- **Cousin S., 2011** : Le grand livre des variétés de la pomme de terre éditions AD Hoc Editeur : 324p.
- **Cousin S ., 2006** : Arômes alimentaires. Techniques de l'ingénieur, F 4 100, Paris.
- **Dayan F. E ., Cantrell C. L ., Duke S. O ., 2009** : *Bioorganic & Medicinal Chemistry*.
- **Demir V., Guhan T., Yagcioglu A.K., Ddegirmencioglu A., 2004** : Mathematical modeling and the Determination of some Quality Paramaters of Air-dried Bay leaves. *Biosystems Engineering*. **88** (3): 325-335.
- **Dorn B ., Musa T., H Krebs ., Fried PM ., Forrer HR ., 2007** : Contrôle de fin brûlure dans la production de pommes de terre biologiques: évaluation de cuivre-libre préparatifs en champ croissance, chambre de e et des conditions de laboratoire. EUR. J. Plant Pathol. : 217-240 p.
- **Ducatillon C., 2010** : Les Plantes aromatiques *Laurus nobilis* L., 22 – 23 p.
- **Ducatillon C., Van Koninckxloo M., Van Koninckxloo K., Vandemeulebroecke ., 2006** : Le mildiou de la pomme de terre - Stratégies de lutte.
- **FAO., 2010** : Faostat, produit par pays <http://faostat.fao.org/site/339/default.aspx>
- **FDR , 2008** : Fiche descriptive sur les zones humides Ramsar.
- **Fehrat A.,2006** : Vapo-Diffusion assistée par Micro-ondes : Conception, Optimisation et Application , l'Ecole Nationale d'Ingénieurs de Gabès.

- **Ferreira A., Proença C., Serralheiro M.L.M., Araújo M.E.M ., 2006** : The *in vitro* screening for acetylcholinesterase inhibition and antioxidant activity of medicinal plants from Portugal. *J.Ethnopharmacology*. **108**: 31-37.
- **Flamini G., Tebano M., Cioni L., Ceccarini L., Ricci A.S., Longo I ., 2007** : Comparison between the conventional method of extraction of essential oil of *Laurus nobilis* L. and a novel method which uses microwaves applied in situ, without resorting to an oven. *J. Chromatogr. A* 1143 : 36-40.
- **Fontem, D. A., Olanya O.M., Tsopmbeng G.R. & Owona M.A.P., 2005** : Pathogenicity and metalaxyl sensitivity of *Phytophthora infestans* isolates obtained from garden huckleberry, potato and tomato in Cameroon. A Plant Protection Department, University of Dschang, Box 208, Dschang, Cameroon, bUSDA-ARS, New England Plant, Soil and Water Lab, University of Maine, Orono, ME 04469 USA.
- **Fredon ., 2008** : stratégie de lutte contre le mildiou de la pomme de terre (*Phytophthora infestans*) établie par : le S.P.V. / ARVALIS - I.T.P.T. / F.R.E.D.O.N. Note commune établie par le Service de la Protection des Végétaux, ARVALIS institut du végétal- pour l'Institut Technique de la Pomme de Terre et les Fédérations Régionales de Défense contre les Organismes Nuisibles.
- **Gallegly M. E. & HongC., 2008** : Phytophthora: Identifying species by morphology and DNA Fingerprints. The American Phytopathological Society. St. Paul, Minnesota USA. 157 p.
- **Godron H., 1990** : Reproduction du *Laurus nobilis* sous le climat de Rouen - *laurus, nobilis, laurier*.
- **Haddad M ., 2009**: revue ÉDITORIAL : 15p.
- **Hammer O., Harper D.A.T. & Ryan P.D., 2001**: PAST, Paleontological Statistics Software Package for Education and Data Analysis. *Palaeontologia Electronica* **4**: 1-9. http://palaeo-electronica.org/2001_1/past/issue1_01.htm
- **Hammi A., 2003**: Caractérisation de population de *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary, these de doctorat en phytopathologie, université de Fes, Maroc, 224p.
- **Henfling J. W., 1987** : Le mildiou de la pomme de terre. Bulletin d'information technique, C. I. P, Lima Pérou: 23-30 p.
- **INPA , 2011** : Institut national des plantes aromatiques. Maroc - généralité des plantes aromatique : p23.

- **INRA , 2005** : Institut Nationale des Recherches Agronomique.
- **INVA , 2007** : La culture de la pomme de terre. Agriculture et développement n°08. Revue de vulgarisation et de communication éditée par l'INVA : 49-60 p .
- **Iserin P., 2001** : Encyclopédie des plantes médicinales. 2ème Ed. Larousse. Londres : 143 et 225-226 p.
- **Isman M. B., Miresmailli S., Machial C., 2010** : *Phytochemistry Reviews*.
- **Isman, M. B., 2000** : *Crop protection*, 19, 603–608.
- **Khair AH., Haggag WM ., 2007** : Application de certains médicaments égyptienne extraits de plantes contre Brûlure de pommes de terre tardives . Rés. J. Agric.Biol. Sci. 3: 166-175.
- **Klarfeld, S.; Avia, R. & Cohen. Y., 2009** : Pathogenic Fitness of Oosporic Progeny Isolates of *Phytophthora infestans* on Late-Blight-Resistant Tomato Lines. The Mina & Everard Goodman Faculty of Life Sciences, Bar-Ilan University, Ramat-Gan, Israel. The American Phytopathological Society.
- **Kim DK , CK Shim, Bae DW, Kawk YS, Yang M, Kim Hong Kong ., 2002** : Caractéristiques d'identification et biologique d'un antifongique composé extrait de Lampourde (*Xanthium strumarium*) et (*Laurus nobilis*) contre *Phytophthora drechsleri*. Plant Pathol. J. 18: 288-292.
- **Krebs H., Dorn B., & Forrer H.R., 2006** : Lutte contre le mildiou de la pomme de terre avec des préparations à base de plantes. Revue suisse Agric. 38 (4): 203-207p.
- **Latten J ., 1994** : Biologische Bekämpfung phytopathogener Pilze mit Hilfe von Pflanzensextrakten, Justus Liebig University, PhD thesis : 121.
- **Laura, Hager M, Springen K, and Hayden T., 1998** : Is organic better? Newsweek. June 1. p. 54-57.
- **Legemble E., J., 2008** : Le mildiou de la tomate (*Phytophthora infestans*), Fiche Technique du service régionale de la protection des végétaux de haute-Normandie. srvp.DRAF-HAUTE-NORMANDIE@agriculture.gouv.fr consulté le 10/05/2011.
- **MADR., 2011** : Services de statistiques des cultures, ministère d'agriculture et de développement rural.
- **MAP., 2008** : *Agro-économiste -INA d'El Harrach* . Fiches pratiques En Agriculture biologique, BSTITUT Valoriser l'Expérience Transfrontalière en Agriculture Biologique.

- **Marzouki H., Khaldi A., Chamli R., Bouzid S., Piras A., D. et B. Falconieri Marongiu., 2008** :Évaluation de l'activité biologique des huiles de *Laurus nobilis* de la Tunisie et de l'Algérie extrait supercritique par le dioxyde de carbone. *Nat. Prod. Rés.* sous presse; ID: 297806 (NPR Je 2107178).
- **Mercure Pam., 1998** : Early Blight and Late Blight of Potato. University of Connecticut, Integrated Pest Management : 2p.
www.hort.uconn.edu/IPM/VEG/HTMS/BLTPOT.HTM.
- **Meinck S., 1999** : Speisekart offelanbau im Ökologischen Landbau: Optimierung des Anbauverfahrens durch Sortenwahlund Phytophthora-Prophylaxe, Diss Universität Gesamthochschule Kassel., P. 201.
- **Mishra A-K., Dubey N-K., 1994**: Evaluation of some essential oils for their toxicity against fungi causing deterioration of stored food commodities *Applied and environmental microbiology* 60 : 1101-1105p.
- **Mohammedi Z ; Bachik S et Belkaroube N., 2010** : Potentiel antifongique et antiaflatoxinogène des huiles essentielles d'une plante endémique *Thymus fontanesii* Boiss. et Reut. Volume 5, N°19.
- **Ozcan, M et J. Chalchat, 2008** : Effet de différents endroits sur la composition chimique de l'essentiel .Les huiles de la baie (*Laurus nobilis* L.) laisse à l'état sauvage en Turquie. *J. Med. Alimentair*
- **Neves, H.C, Valente, A.V. Conhec.a., 1992** : Parque Natural da Madeira. Parque Natural da Madeira, Funchal.
- **Paitier, G., 1980**. Le mildiou de la pomme de terre. *Phytoma* (4): 23-27.
- **Pariente L., 2001** : Dictionnaire des sciences pharmaceutiques et biologique. *2ème Ed. Académie nationale de pharmacie. Paris* 1643 p.
- **Paris R, H. Moyse., 1965** : Précis de Matière médicale , Masson.
- **Peyron L., 1970** : Techniques classiques actuelles de fabrication des matières premières naturelles aromatiques, Chapitre 10, 217 – 238 p. *Cité In : Les arômes alimentaires. Coordinayeurs H. Pharmacopée Européenne, 2010*).
- **Powelson Mary., and Debra Ann., 1998** : Potato Late Blight: Live on the Internet. American Phytopathological Society, St. Paul, MN.
- [http : //www.apsnet.org/online/feature/lateblit/](http://www.apsnet.org/online/feature/lateblit/)
- **Quezel P et Santa S., 1963** : Nouvelle flore d'Algérie et Régions désertiques méridionales .Tome II.

- **Reill M et Lavoie M ., 2010** : Image d'anatomie des végétaux vasculaires :56.66.76 p.
- **Remmal A., 1993** : Activités antibactériennes et antivirales des huiles essentielles d'origan, de girofle et de thym. Thèse de doctorat d'état ès-sciences naturelles. Faculté des sciences Dhar El Mehraz. Fés : 126p.
- **Rohner E, A Carabet, Buchenauer H ., 2004** : L'efficacité de l'usine les extraits de *Paeonia suffruticosa* et *Hedera helix* contre les maladies causée par *Phytophthora infestans* sur les tomates et *Pseudoperonospora* .
- **Rousselle P; Robert Y& Grosnier J.C. 1996** : La pomme de terre, amélioration, ennemis, maladie et utilisation. I.N.R.A. Paris : 607 p.
- **Roux D., 2008** : Conseil en aromathérapie, 2ème édition Pro-officina.
- **Saadoune A., 2011** : Antagonisme des isolats algériens de *Trichoderma sp.* à l'égard des isolats algériens de *Phytophthora infestans* agent responsable du mildiou de la pomme de terre *Solanum tuberosum* L. en Algérie. Th.Ing. Univ. Saad Dahlab de Blida : 63 p.
- **SAGE, 2012**: Ouvrage Patrimoine : 224 p.
- **Simi F., Arnold NA ., Piozzi F., 2003** : Chemical composition of the essential oil of *Salvia multicaulis* Vahl. var. *simplicifolia* Boiss. growing wild in Lebanon *J Chromatogr A.* **1052** : 237-240.
- **Simic A., Sokovic M. D., Ristic M., Grujic-Jovanovic S., Vukojevic J., and**
- **Skoog D.A., Holler F.J. & Nieman T.A., 2003** : Principes d'analyse instrumentale. Boeck Université : 945 p.
- **Soylu E. M., Soylu S., and Kurt S., 2006**; Antimicrobial activities of the essential oils of various plants against tomato late blight disease agent *Phytophthora infestans*. *Mycopathologia* 161.
- **Spooner D. M., Mc Lean K., Ramsay G., 2005** : A single domestication for potato based on multilocus amplified fragment length polymorphism genotyping. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 102 : 14694-14699 p.
- **Teuscher E. et Anton R et Lobstein A., 2005** : Plantes aromatiques épicées, aromates, condiments et huiles essentielles, Edit. LAVOISIER, Paris: 522p.
- **Thurston, H. D. & Schultz, O ., 1981** : Late blight in compendium of potato disease. Hooker Eds. APS Press Michigan (USA): 40-42p.

- **Tiwari B. K ., Valdramidis V. P ., O'Donnell C. P ., Muthukumarappan K., Bourke P., Cullen P. J., 2009:** Journal of agricultural and food chemistry 57, 5987–6000.
- **Williams Greg and Pat Williams., 1994:** Watch out for late blight on potatoes. HortIdeas. August. 95 p.
- **Williams Greg and Pat Williams ., 1994 :** More on late blight of potatoes. HortIdeas. September. 103 p.
- **Williams Greg and Pat Williams ., 1994 :** Still more on late blight of potatoes. HortIdeas. October. 111 p.
- **WIZELIS ., 2011 :** Editions Tec & Doc, Editions médicales internationales Paris. Lavoisier : 563p.
- **Yakhlef G., 2010 :** Etude de l'activité biologique des extraits de feuilles de *Thymus vulgaris* L. et *Laurus nobilis* L., these de Magister en biochimie appliqué, université de Batna : 78p.
- **Yanar Y ; Kadioglu I ; Gökçe A , Demirtaş D , Gören N , Çam H et Whalon M ., 2011 :** revues académiques *Activité in vitro* antifongiques de 26 extraits de plantes sur croissance du mycélium de *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary .

Annexe

Annexe : Composition du milieu petit pois.

Selon Hammi (2003), Le milieu petit pois est un milieu naturel à base de :

- 140 g de petit pois de conserve gélosé.....quantité utilisé : (140 x 2) g.
- 20 g agar agarquantité utilisé : (20g x 2) g.
- 1000 ml de l'eau distillée stérile. quantité utilisé : (1000 x 2) ml.