

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

**CONTRIBUTION A L'ETUDE DES HUILES ESSENTIELLES DE TROIS  
ESPECES DE CITRUS : *sinensis* Cadenera, *limon* Eureka, *bergamia*  
Castagnarro. ET LEUR POUVOIR ANTIFONGIQUE SUR LE *Phytophthora*  
*infestans* (Mont.) De Bary. AGENT RESPONSABLE DU MILDIOU DE LA  
POMME DE TERRE EN ALGERIE.**

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

Filière d'Agronomie.

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

Présenté par : BACHIR Kamilia.

Devant le jury composé de :

Mme Houmani Z.	Pr.	USDB	Présidente
Mr El Hadi D.	MCA	USDB	Promoteur
Mme Moumene S.	MAA	USDB	Co-promotrice
Mr Bendali A.	MAA	USDB	Co-promoteur
Mr Badis A.	MCA	USDB	Examineur
Mr Mokadem Y.	MA	USDB	Examineur

Promotion 2006-2011

## *Dédicaces*

*Je dédie ce modeste travail :*

*A ceux qui m'ont transmis l'éducation, le sérieux, et beaucoup de valeurs humaines ;*

*Mme & Mr: Daouia & Ali BACHIR.*

*A mon frère et mes deux sœurs. Et à mes deux familles Bachir & Koudil.*

*A mon Amie Imene, et toute la promotion Biotechnologie des plantes aromatiques et médicinales de 2006 à 2011.*

*A tous ceux que ma mémoire porte et mon mémoire ne peut supporter.*

*\* Kamilia \**

## Remerciements

*\* Notre spécialité, le Master de l'option, et le laboratoire de recherches (de biotechnologie des plantes médicinales de l'université de Blida) où s'est déroulée une partie de ce modeste travail, n'auraient jamais existés sans les efforts du Professeur Mme Houmani Z. à qui j'exprime ma gratitude, et à qui j'adresse mes vifs remerciements.*

*\* Je remercie mon promoteur Mr El Hadi D. maitre de conférences à l'université de Blida, d'avoir proposé le thème de ce modeste travail tout en assurant son évolution, par sa disponibilité et ses conseils.*

*\* Je remercie Mme Moumene S. chargée de cours à l'université de Blida d'avoir accepté de me parrainer dans la réalisation de toute une partie de ce modeste travail. Ce, en me préparant les conditions nécessaires à la pratique des expériences, en me prêtant du temps, et d'attention, et surtout en me transmettant les modalités de la recherche, et de l'interprétation.*

*\* Je remercie mon Co-promoteur Mr Bendali A. maitre assistant à l'université de blida qui a suivi la progression de ce travail, par ses conseils et encouragements.*

*\*Je tiens à remercier aussi Mme Chabata N. et Mme Ghanai R. d'avoir toujours été omniprésentes pour nous répondre et nous faire part de leur savoir et de leur savoir faire.*

*\* Je remercie les deux instituts ITAF.V et INPV de Boufarik ainsi que le département de chimie industrielle (de l'université) de m'avoir permis respectivement de : réaliser la cueillette des échantillons d'agrumes, et la pratique de la partie d'application des huiles essentielles sur le champignon, ainsi que quelques analyses Physico-chimiques des huiles essentielles obtenues.*

*\* Mes sincères remerciements aux membres de jury : Mr Badis A., et Mr Mokadem Y. ; de m'avoir fait l'honneur d'examiner ce modeste travail.*

## **Résumé**

### **CONTRIBUTION A L'ETUDE DES HUILES ESSENTIELLES DE TROIS ESPECES DE CITRUS : *sinensis* Cadenera, *limon* Eureka, *bergamia* Castagnarro. ET LEUR POUVOIR ANTIFONGIQUE SUR LE *Phytophthora infestans* (Mont.) De Bary. AGENT RESPONSABLE DU MILDIU DE LA POMME DE TERRE EN ALGERIE.**

Ce modeste travail se veut une plaidoirie pour booster la production des huiles essentielles d'agrumes en Algérie vu l'intérêt que représentent ces produits, tout en s'intéressant aux essences de trois espèces de *Citrus* : l'Oranger *sinensis* Cadenera, le citronnier *limon* Eureka, et le Bergamotier *bergamia* Castagnarro ; utilisés de longues dates pour se soigner, cette étude consiste plutôt à leur trouver une implication dans la lutte biologique comme une alternative à l'utilisation des substances chimiques à base de metalaxyl qui demeurent inefficaces contre les souches algériennes agressives A2 de *Phytophthora infestans* ; agent responsable du mildiou de la pomme de terre. Ainsi, l'étude du pouvoir antifongique *in vitro* et *in vivo* a porté sur deux isolats collectés de deux zones productrices de pomme de terre Bourkika et Bouira , purifiés et identifiés respectivement comme A2 et A1 par les travaux précédents, après avoir définie l'espèce et la partie d'agrumes la plus charnue en huiles essentielles, les cellules où on les trouvent , ainsi qu'un mode d'extraction adéquat pour leur obtention entre l'Ether de pétrole et l'hydro distillation.

La caractérisation physico-chimique a indiqué toutefois que l'huile issue de l'écorce de bergamote qui peut atteindre jusqu'à 29% par solvant est plus dense et de moins colorée par rapport à celles obtenues par hydro distillation voir jusqu'à 3,48% avec le limonène un composé majeur, identifié par chromatographie en phase gazeuse.

Un contact direct *in vitro* sur milieu à base de petits pois agar, à révélé que l'efficacité de ces trois huiles à différentes concentrations réside dans l'inhibition de la croissance mycélienne qui n'a pas dépassé 20% avec une sporulation négligeable de 0 à  $1,5 \times 10^5$  sporange/ml et une non survie suite à la lyse du mycélium, ce qui s'est traduit *in vivo* sur les feuilles détachées de la variété *Spunta* de pomme de terre trempées à différentes doses dans les huiles d'agrumes ; par un développement rudimentaire de symptômes voir de légères nécroses, et chloroses de 0 à 25% ; nous permettant de suggérer la présence d'une certaine résistance de ce champignon aux essences naturelles d'agrumes, mais aussi dans une plus faible mesure d'un pouvoir antifongique de ces derniers qui peut être lié à leur composition chimique.

**Mots clés :** *Citrus* ; huile essentielle; composition chimique; *Phytophthora infestans* ; propriétés antifongiques ; maladie fongiques; principes actifs, lutte biologique.

## ***Abstract***

**The contribution of studies of three Citrus's essential oil : *sinensis* Cadenera, *limon* Eureka, *bergamia* Castagnarro. And Their antifungal power against *Phytophthora infestans* (Mont.) de Barry. Agent responsible of potato's mildiou in Algeria.**

This modest work would be a plea to boost the production of citrus fruit's essential oils in Algeria regarding the importance of these products with the interest to the essences of the three kinds of citrus: *sinensis* Cadenera, *limon* Eureka, *bergamia* Castagnarro; used since a long time ago for the cure, this study consists rather to find their implication in the biologic fight as an alternative for the chemical substances based on the metalaxyl use which stay not efficient against the Algerian aggressive stumps A2 of *Phytophthora infestans*; the responsible agent of mildiou of the potato, so the antifongic power study in vitro and in vivo conducted to two isolates picked up from two productive zones of potatos: Bourkika and Bouira, purified and identified respectively as A2 and A1 by the previous works.

After the definition of the sort and the most fleshy part on essential oils of the citrus fruits, the cells where they are found and the adequate extraction mode to obtain between the Oil Ether and the hydro distillation ,however, the physical-chemical characterization indicated that the oil comes from the bergamot bark and can reach 29% per solvent, its more dense and low coloured comparing to those obtained by the hydro distillation which reach until 3.48%, with the limonene; a major corposant identified by chromatography in the gaseous phase.

A direct contact in vitro in this place based on agar peas has revealed that the efficiency of these three oils with different concentrations lies in the inhibition of the mycelienne growth which didn't accede 24% with a unimportant sporulation of 0 to 1.5 sporanges/ml and a non follow after a mycelium lyses, which is shown by an in vitro on the detached leaves of the variety of *spunta* potatoes put on different doses of citrus fruits oils; by a rudimentary development of symptoms till a light necrosis and chloroses from 0% to 25 %.

This allows suggesting the presence of some fungi resistance to the citrus fruits essences but in a more weak measure of an antifungal power of these which could be linked to their chemical composition.

**Key words:** Citrus; essential oils; chemical composition; *Phytophthora infestans*; antifungal proprieties; fungi seek ; active principles; biologic fight.

## ملخص

مساهمة في دراسة الزيوت الأساسية لثلاث فصائل من السيتروس " سينونسييس كادينيرا - ليمون أوريكا - بيرغاميا كاستانيارو". و قدرتها ضد فطرية على "فيتوفتورا انفستانس" العامل المسبب لمرض الميلديو للبطاطا في الجزائر.

هذا العمل البسيط يرمي الى الزيادة في انتاج الزيوت الأساسية للحمضيات في الجزائر نظرا للأهمية التي تمثلها هذه المواد المستعملة مند القديم للعلاج ، مهتمين بثلاث فصائل مختلفة من صنف سيتروس " سينونسييس كادينيرا - ليمون أوريكا - بيرغاميا كاستانيارو".

هذه الدراسة تكمن قبل ذلك في ايجاد لها دخلا في المكافحة البيولوجية كبديل لاستعمال المواد الكيميائية المرتكزة على الميتالاكسيل و التي تبدوا غير فعالة ضد سلالتين جزائريتين خطيرتين من فيتوفتورا انفستانس، العامل المسؤول عن مرض الميلديو للبطاطا. بهذا دراسة القدرة ضد فطرية في المخبر و في الوسط الحي تفتحت على معزولين من منطقتين منتجتين للبطاطا ، استخلصا، صفيا و عرفا على الترتيب ك 1 و 2 خلال أعمال سابقة.

بعد التعريف عن الفصيلة، و العضو الأكثر غناء بهذه الزيوت، الخلايا المسؤولة عن فرزها و الطريقة المثلى لاستخلاصها بين المحلل البترولي' أو التقطير المائي ، تقديرا فيزيوكيماويا أبرز أن زيت البرغموث المقدر انتاجها ب 29 % بالمحلل العضوي أكثر كثافة من المتحصلة بالتقطير مع احتوائها الليمونيين مكون أساسي لهذه الزيوت أبرزه التحليل الكروماتوغرافي.

تلامس مباشر في وسط من البازل و الأغار أظهر أن الفعالية لهذه الزيوت بمختلف التراكيز تكمن في تقليص النمو ب 24% لميسليوم الفطر

مع الحد من خلاياه التكاثرية و غير متابعة للميسليوم الذي تم حله. الأمر الذي ترتب عنه في الوسط الحي بتراكيز مختلفة للزيوت، ظهور أعراض بسيطة كبعض فراغات الخلايا الميتة' انتزاع التلوين و اصفرار الأوراق. من 0-الى 25 بالمئة هذا قد يفسر بوجود نوع من المقاومة للفطر في زيوت الحمضيات لكن في نفس الوقت وبمقدار صغير يوجد قدرة ضد فطرية بسيطة قد تعود الى مكونات هذه الزيوت الكيميائية.

**مفتاح الكلمات:** الحمضيات - السيتروس - الزيوت الأساسية - التركيبة الكيميائية - فيتوفتورا انفستانس - الخصائص ضد فطرية - الأمراض الفطرية - المفعول الأساسي - المكافحة البيولوجية.

## Liste des tableaux :

<b>Tableau 1 :</b> Quelques maladies microbiennes de dépérissement des agrumes.....	07
<b>Tableau 2 :</b> Production mondiale d'agrumes en millions de tonnes.....	07
<b>Tableau 3 :</b> Evolution des rendements d'agrumes de 2010 en Mitidja par qx/ha.....	08
<b>Tableau 4 :</b> Avantages et inconvénients des procédés d'extraction.....	13
<b>Tableau 05 :</b> Parcelles de prélèvement des espèces étudiées.....	27
<b>Tableau 06 :</b> Données climatiques annuelles du lieu de prélèvement.....	29
<b>Tableau 07 :</b> Etude biométriques des trois espèces étudiées.....	44
<b>Tableau 08 :</b> Taux de matière sèche des trois espèces séchées à l'étuve en (g).....	45
<b>Tableau 09 :</b> Rendement des huiles essentielles d'agrumes sur 100g de MS de poudre.....	46
<b>Tableau 10 :</b> L'évolution de La moyenne des volumes récupérés avec le temps sur les 3heures d'extraction par hydro distillation.....	47
<b>Tableau 11 :</b> Les caractéristiques organoleptiques des huiles essentielles des trois espèces d'agrumes obtenues par hydro distillation .....	51
<b>Tableau 12 :</b> caractères organoleptiques des huiles essentielles des trois espèces d'agrumes obtenues par solvant .....	51
<b>Tableau 13 :</b> L'indice de réfraction des huiles essentielles obtenues à 26°C.....	52
<b>Tableau 14 :</b> La densité relative des huiles essentielles obtenues à 20°C.....	53
<b>Tableau 15 :</b> Identification approximative des composés des trois huiles essentielles après comparaison des temps de rétention.....	54
<b>Tableau16:</b> Analyse de la variance des différents paramètres étudiés.....	58
<b>Tableau 17:</b> Effet de l'huile essentielle d'oranger sur le développement des deux isolats...	61

<b>Tableau 18 :</b> Effet d'huile de Bergamote sur le développement des souches A1 et A2.....	61
<b>Tableau 19 :</b> Effet d'huile de citron sur le développement des isolats A1 et A2.....	62
<b>Tableau 20:</b> L'effet des huiles essentielles sur la sporulation des souches A1 et A2 de <i>P.infestans</i> .....	67
<b>Tableau 21:</b> Analyse de la variance du taux d'infection <i>in vivo</i> en fonction des huiles, des doses, des souches et le mode de traitements.....	70
<b>Tableau 24 :</b> la moyenne de la croissance du champignon traité par les huiles en mm et des témoins des deux isolats .....(Annexe 3)	
<b>Tableau 23 :</b> pourcentages d'inhibition moyenne des deux isolats <i>in vitro</i> et <i>in vivo</i> ...(Annexe 4)	



## Liste des figures :

<b>Figure 1 :</b> le greffage des agrumes.....	06
<b>Figure 02 :</b> poches sécrétrices chez les végétaux .....	10
<b>Figure. 03 :</b> Biosynthèse du limonène.....	11
<b>Figure. 04 :</b> Appareillage de la chromatographie sur phase gazeuse.....	14
<b>Figure 10.</b> Les fruits récoltés des trois espèces étudiés.....	26
<b>Figure 11 :</b> Présentation de l'annexe I de Bouamrous « Halwya » .....	28
<b>Figure 12.</b> La poudre des écorces et feuilles des trois espèces étudiés.....	30
<b>Figure 13.</b> La coloration des coupes selon la technique de double coloration .....	31
<b>Figure 14.</b> Montage de l'hydro distillation.....	32
<b>Figure 15 :</b> Collage du champignon sur boites de Pétri.....	37
<b>Figure 16 :</b> le champ de récolte des feuilles de pomme de terre à tester.....	40
<b>Figure 17 :</b> Les feuilles préparées pour le traitement.....	40
<b>Figure 18 :</b> Préparation du milieu pour le traitement.....	41
<b>Figure 19 :</b> Trempage dans les huiles essentielles et inoculation de <i>P.infestans</i> .....	42
<b>Figure 20:</b> Histogrammes représentatifs des températures et pluviométrie annuels de la zone .....	43
<b>Figure 21 :</b> Volume des huiles essentielles d'écorces et de feuilles obtenues en moyenne des trois espèces d'agrumes en (ml).....	45
<b>Figure 22 :</b> l'influence du temps d'extractions sur le volume des huiles essentielles obtenues.....	47
<b>Figure 23 :</b> coupe transversale du péricarpe de l'orange montrant le flavédo observé au microscope photonique G : 100X.....	48

<b>Figure 24:</b> coupe transversale du péricarpe de l'orange montrant le flavédo observé au microscope photonique G : 100X.....	48
<b>Figure 25 :</b> coupe transversale du péricarpe de la bergamote montrant le flavédo observé au microscope photonique G : 100X.....	49
<b>Figure 26 :</b> coupes transversales du péricarpe du citron montrant le flavédo observé au microscope photonique G : 100X.....	49
<b>Figure 27 :</b> coupe transversale du péricarpe du citron montrant le flavédo observé au microscope photonique G : 100X.....	50
<b>Figure 28 :</b> Le parenchyme étoilé, et les cristaux ressemblants aux oxalates de Calcium du péricarpe de Citrus limon Eureka observé au microscope photonique à G : 400X.....	50
<b>Figure 29:</b> Chromatogramme de l'huile essentielle des écorces de l'orange extraite par hydro distillation.....	54
<b>Figure 30:</b> Chromatogramme de l'huile essentielle des écorces du citron extraite par hydro distillation.....	55
<b>Figure 31:</b> Chromatogramme de l'huile essentielle des écorces de la bergamote extraite par hydro distillation.....	55
<b>Figure 32 :</b> Pouvoir antifongique des huiles d'agrumes en modèle GLM selon la nature des huiles, leurs dilutions, les souches et le temps d'incubation.....	59
<b>Figure 33 :</b> variabilité de la croissance mycélienne des souches A1 et A2 de <i>P.infestans</i> sous traitements des trois huiles essentielles d'agrumes testées.....	60
<b>Figure 34 :</b> Pouvoir antifongique de l'huile d'orange en modèle GLM selon les dilutions de l'huile, les souches et le temps d'incubation.....	61
<b>Figure 35 :</b> Pouvoir antifongique de l'huile de bergamote en modèle GLM selon les dilutions de l'huile, les souches et le temps d'incubation.....	62
<b>Figure 36 :</b> Pouvoir antifongique de l'huile de citron en modèle GLM selon les dilutions de l'huile, les souches et le temps d'incubation.....	63

<b>Figure 37:</b> Analyse en composante principale (ACP) des différents paramètres en fonction des huiles et des souches A1 et A2.....	64
<b>Figure 38:</b> Classification hiérarchique des différents paramètres en fonction des huiles et des souches A1 et A2.....	64
<b>Figure 39:</b> Morphologie d'un isolats de <i>P.infestans</i> témoins (Gx100).....	65
<b>Figure 40 :</b> Morphologie des isolats de <i>P.infestans</i> traités par l'huile essentielle de bergamote pure (Gx100).....	65
<b>Figure 41 :</b> Morphologie des isolats de <i>P.infestans</i> traités par les huiles essentielles d'agrumes observés au microscope à (Gx100).....	66
<b>Figure 42 :</b> Morphologie d'un sporange de <i>P.infestans</i> observée au microscope photonique (GX100).....	66
<b>Figure 43:</b> le Taux d'inhibition de la sporulation de <i>P.infestans</i> sous l'effet des huiles d'agrumes.....	67
<b>Figure 44 :</b> Les témoins positifs et négatifs de la souche A1.....	68
<b>Figure 45 :</b> Effets des huiles essentielles d'agrumes sur les souches A1 et A2 de <i>P.infestans in vivo</i> .....	69
<b>Figure 46 :</b> Taux d'infection du mildiou sur les feuilles de pomme de terre trempées et traitées par les différentes huiles à différentes doses sur les deux souches de <i>P.infestans</i> .....	70
<b>Figure 47 :</b> Chromatogramme de l'étalon (Limonène pure dilué dans le n-hexane).....(Annexe2)	

## Table des matières :

**Introduction.....01**

### Partie bibliographique

#### Chapitre I :

**I.1 Généralités sur les agrumes.....03**

**I.1.1** Définition et Etymologie.....03

**I.1.2** Origines et diffusion des agrumes.....03

**I.1.3** Description botanique et développement des agrumes.....04

**I.1.4** Classification et systématique des agrumes.....04

**I.1.5** Exigences climatiques des agrumes.....05

**I.1.6** Exigences édaphiques des agrumes.....06

**I.1.7** Techniques de multiplications des agrumes.....06

**I.1.8** Phytopathologie des agrumes.....06

**I.1.9** Importance économique des agrumes.....07

**I.1.10** Importance industrielle.....08

**I.1.11** Caractéristiques des variétés étudiées.....08

**I.2. Les huiles essentielles.....09**

**I.2.1** Définition et historique des huiles essentielles.....09

**I.2.2** Localisation des huiles essentielles.....09

<b>I.2.3</b>	Facteurs de variabilité des huiles essentielles.....	10
<b>I.2.4</b>	Propriétés physiques des huiles essentielles.....	10
<b>I.2.5</b>	Composition chimique des huiles essentielles.....	10
	a) Les terpènes .....	11
	b) Composés aromatiques dérivés du Phényle-propane .....	11
<b>I.2.6</b>	Rôles des huiles essentielles.....	12
<b>I.2.7</b>	Les procédés d'obtention des huiles essentielles.....	12
	a) La distillation.....	12
	b) L'extraction par solvant.....	12
	c) Autres modes d'extraction des essences végétales.....	13
<b>I.2.8</b>	Méthodes d'identification, de séparation et d'analyse des huiles essentielles.....	13
<b>I.2.9</b>	Conservation des huiles essentielles.....	14
<b>I.2.10</b>	Huiles essentielles des espèces d'agrumes étudiées.....	14
	a) huiles essentielle de bergamote.....	14
	b) Huile essentielle d'orange douce.....	14
	c) Huile essentielle de citron.....	15
<b>I.2.11</b>	Pouvoir antimicrobien des huiles essentielles.....	15

## **Chapitre II :**

<b>II.</b>	Importance des huiles essentielles dans la lutte biologique .....	16
------------	---	----

<b>II.1</b>	<b>Généralités sur la pomme de terre</b> .....	17
-------------	--	----

<b>II.1.1</b>	Description botanique et généralités sur la pomme de terre .....	17
---------------	--	----

<b>II.1.2</b>	Histoire de la pomme de terre et son introduction en Algérie .....	17
<b>II.1.3</b>	Exigences climatiques et édaphiques de la pomme de terre .....	18
<b>II.1.4</b>	Importance Economique de la pomme de terre en Algérie .....	18
<b>II.1.5</b>	Les problèmes phytosanitaires de la pomme de terre en Algérie .....	18
<b>II.2</b>	<b>Généralités sur l'agent pathogène</b> .....	19
<b>II.2.1</b>	Systématique .....	19
<b>II.2.2</b>	Morphologie .....	19
<b>II.2.3</b>	Spécificité parasitaire .....	19
<b>II.3</b>	<b>Généralités sur le mildiou de la pomme de terre</b> .....	20
<b>II.3.1</b>	Historique .....	20
<b>II.3.2</b>	Symptômes .....	20
<b>II.3.3</b>	Impact de la maladie sur l'économie .....	21
<b>II.3.4</b>	Le cycle évolutif de la maladie .....	22
<b>II.4</b>	<b>Lutte contre le mildiou de la pomme de terre</b> .....	23
<b>II.4.1</b>	Méthodes préventives et prophylactiques .....	23
<b>II.4.2</b>	Lutte chimique .....	24
<b>II.4.3</b>	Lutte génétique .....	24
<b>II.4.4</b>	Lutte biologique .....	25
<b>II.5</b>	Effet antifongique des huiles essentielles d'agrumes sur le <i>Phytophthora</i> .....	25

## Partie expérimentale

### Matériels et méthodes :

<b>I.</b>	<b>l'étude des huiles essentielles de trois espèces d'agrumes</b>	26
<b>I.1</b>	Le choix, l'identification, et la récolte du matériel végétal	26
<b>I.2</b>	Présentation du lieu de prélèvement des échantillons d'agrumes	27
<b>a)</b>	Présentation du verger	27
<b>b)</b>	Les parcelles de prélèvement	27
<b>c)</b>	Les Données climatiques du verger	28
<b>I.3</b>	Préparation du matériel végétale	29
<b>a)</b>	Analyse du matériel végétale	29
<b>b)</b>	Détermination de la matière sèche	30
<b>I.4</b>	Réalisation de coupes histologiques sur les écorces d'agrumes	30
<b>I.5</b>	Extraction des huiles essentielles	32
<b>I.5.1</b>	Extraction par hydro distillation	32
<b>I.5.2</b>	Extraction par solvant organique	32
<b>I.6</b>	Evaluation du rendement en huile essentielles	33
<b>I.7</b>	caractérisation physicochimique des huiles essentielles	33
<b>I.7.1</b>	propriétés organoleptique et physiques	33
<b>I.7.2</b>	Mesure de l'indice de réfraction	33

<b>I.7.3</b>	Mesure	de	la	
densité .....				34
<b>I.8</b>	Analyse	chimique	par	chromatographie
CPG.....				phase gazeuse
				35
<b>II. Etude du pouvoir antifongique <i>in vitro</i> et <i>in vivo</i> des huiles essentielles d'agrumes</b>				
<b>extraites</b>				
<b>sur</b>				
<b><i>Phytophthora</i></b>				
<b><i>infestans</i> .....</b>				
				36
<b>II.1</b>				
végétal .....			Matériel	36
<b>II.2</b>				
fongique .....			Matériel	36
<b>II.3 Etude du pouvoir antifongique <i>in</i></b>				
<b><i>vitro</i> .....</b>				
				37
<b>II.3.1</b>	Morphologie	des	isolats	de <i>P.infestans</i>
témoins .....				traités et
				38
<b>II.3.2</b>				
Sporulation .....				38
<b>II.3.3</b>				
<i>P.infestans</i> .....	Survie	des	isolats	de
				39
<b>II.4 Pouvoir antifongique des huiles essentielles d'agrumes <i>in</i></b>				
<b><i>vivo</i> .....</b>				
				39
<b>II.4.1</b>	Récolte	des	feuilles	de
terre .....				pomme
				de
				39
<b>II.4.2</b>	Préparation	d'inoculum	à	partir
A2 .....				des
				isolats
				A1
				et
				40
<b>II.4.3</b>	Inoculation			des
détachées .....				feuilles
				41
<b>II.4.4</b>	Trempe	dans	les	huiles
champignon .....				et
				inoculation
				du
				41
<b>II.5 Analyse</b>				
statistique .....				42

## Résultats et interprétations :



<b>I. L'extraction, l'identification, et la caractérisation des huiles essentielles des trois espèces d'agrumes</b> .....	43
<b>I.1</b> Analyse des conditions climatiques .....	43
<b>I.2</b> Etude des paramètres biométriques des fruits et feuilles utilisés à l'extraction .....	43
<b>I.3</b> Détermination de la matière sèche .....	44
<b>I.4</b> Production des huiles essentielles .....	45
<b>I.5</b> L'influence du temps d'extraction sur le rendement en huiles essentielles .....	47
<b>I.6</b> Etude histologique des écorces d'agrumes .....	48
<b>I.6.1</b> Structure du péricarpe de l'orange .....	48
<b>I.6.2</b> Structure du péricarpe de la bergamote .....	49
<b>I.6.3</b> Structure du péricarpe du citron .....	49
<b>I.7</b> Les caractéristiques organoleptiques .....	51
<b>I.8</b> Analyses physico-chimiques .....	52
<b>I.8.1</b> L'indice de réfraction .....	52
<b>I.8.2</b> La densité relative .....	53
<b>I.9.</b> Résultats d'analyse chromatographique .....	53
<b>II. Activité antifongique des huiles essentielles d'agrumes sur <i>Phytophthora infestans</i></b> .....	58
<b>II.1.</b> Pouvoir antifongique <i>in vitro</i> .....	58

<b>II.1.1</b>	Pouvoir antifongique des huiles d'agrumes sur la croissance mycélienne de <i>P. infestans</i> .....	58
<b>II.1.2</b>	Etude des corrélations des taux d'inhibition de la croissance mycélienne en fonction des trois huiles d'agrumes et des souches de <i>P. infestans</i> .....	63
<b>II.1.3</b>	Aspect morphologique des souches de <i>P. infestans</i> traitées par les huiles d'agrumes .....	65
<b>II.1.4</b>	Pouvoir antifongique des huiles d'agrumes sur la sporulation de <i>P. infestans</i> .....	66
<b>II.1.5</b>	Survie de <i>P. infestans</i> traité par les huiles d'agrumes .....	67
<b>II.2</b>	Test de l'efficacité antifongique in vivo .....	68
<b>II.2.1</b>	Effet des huiles d'agrumes sur le pouvoir infectieux de <i>P. infestans</i> .....	68
<b>II.2.2</b>	Pouvoir inhibiteur des huiles essentielles d'agrumes sur <i>P. infestans in vivo</i> .....	71
<b>II.2.3</b>	La corrélation entre le pouvoir anti infectieux <i>in vivo</i> en fonction des différents paramètres étudiés.....	71
<b>Conclusion</b>	.....	76

## Liste des abréviations

**A1** : souche de *Phytophthora infestans* du type sexuel A1 isolée de la région de Bouira.

**A2** : souche de *Phytophthora infestans* du type sexuel A2 isolée de la région de Bourkika.

**AFNOR** : ASSOCIATION FRANÇAISE DE NORMALISATION.

**B** : bergamote

**C** : citron.

**cm** : centimètres

**CPG** : CHROMATOGRAPHIE EN PHASE GAZEUSE.

**D1** : la première dose « pure » des huiles essentielle

**D2** : la deuxième dose « 1/10<sup>ème</sup> » des huiles essentielles

**D3** : la troisième dose « 1/1000<sup>ème</sup> » des huiles essentielles.

**DT** : Diamètre de la croissance mycélienne du champignon témoin .

**Dt** : Diamètre de la croissance mycélienne du champignon traité .

**FAO** : FOOD AND AGRICULTURE ORGANISATION

(**G :X100**) : au grossissement 100 du microscope photonique.

(**G :X400**) : au grossissement 400 du microscope photonique.

**g**: gramme.

**H.E** : HUILE(S) ESSENTIELLE(S)

**Inf** : infection.

**I** : inhibition de la croissance mycelienne du champignon..

**INPV** : INSTITUT NATIONAL DE PROTECTION DES VEGETAUX

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

**ITAF.V** : INSTITUT TECHNIQUE DE L'ARBORICULTURE FRUITIERE ET DE LA VIGNE.

**L** : litre.

**mn** : MINUTES.

**MS** : matière sèche.

**O** : orange

**PF** : poids frais.

**PPA** : milieu de culture à base de petits pois Agar.

**PS** : poids sec

**qx/ha** : quinto sur hectare

**R** : production d'huile essentielle en ml par apport à 100g de matière sèche.

**ST** : Concentration en sporanges de l'inoculum témoin (sporangies/ml).

**St** : Concentration en sporanges de l'inoculum traité (sporangies/ml).

**T** : trempés

**T. max** : température maximal.

**T. min** : température minimal.

**T. moyenne** : température moyenne.

**TEM** : les feuilles temoins

**TRT** : les feuilles à champignons traités.

**KPa** : Kilo pascalle

**Nm** : nanomètre.

## Glossaire :

**Acre** : piquant, irritant au goût, et à l'odorat.

**Alambic** : appareil pour distiller.

**Anthéridies** : organes où se forment les gamètes mâles chez les végétaux.

**Antiseptiques** : agent d'un médicament propre à prévenir les infections.

**Aromathérapie** : thérapeutique par les huiles essentielles végétales.

**Baies** : fruits charnues à graines ou à pépins (sans noyau)

**Biotope** : aire géographique de dimensions variables offrant des conditions constantes ou cycliques aux espèces constituant la biocénose.

**Carminatif** : remède qui favorise l'expulsion des gaz intestinaux

**Caustique** : qui attaque les tissus organiques comme la soude. (Mordant).

**Collenchyme** : tissus de soutien des végétaux supérieurs, formés presque uniquement de cellulose.

**Cuprique** : de la nature du cuivre ; ou qui contient un sel de cuivre.

**Digestif** : qui aide et concourt à la digestion.

**Diurétique** : qui stimule la sécrétion de l'urine.

**Gamétocystes** : cellules germinales produisant lors de la gaméto-genèse un ovule ou un spermatozoïde.

**Glandes** : organe ayant pour fonction d'élaborer certaines substances et de les déverser soit à l'extérieur de l'organisme, ou dans une cavité de celui-ci.

**Hybridation** : croisement entre deux variétés, deux races d'une même espèce ou entre deux espèces différentes.

**Inhibition** : phénomène d'arrêt, de blocage ou de ralentissement d'un processus chimique, ou physiologique.

**Isolats** : espèce complètement isolée, au sein de laquelle n'existe aucun échange génétique avec le reste du monde et menacée ainsi par le confinement.

**Limpide** : clair, transparent.

**Néroli** : huile essentielle obtenue par distillation des fleurs du bigaradier et certains orangers (prénom d'une princesse qui a inventé ce parfum)

**Oogones** : organe dans lesquels se forment les oosphères chez certains thallophytes.

**Oospores** : œufs des thallophytes.

**Parenchyme** : tissu formé de cellules différenciées, doué d'une fonction physiologique spécifique ; Tissus fondamental des végétaux supérieurs, formés de cellules vivantes peu différenciées, aux parois minces et assurant différentes fonctions.

**Péronosporales** : ordre des champignons inférieurs comprenant de nombreuses espèces parasites des plantes, nettement les agents des mildious, des siphonomycètes.

**Pucerons** : petit insecte homoptère qui vit souvent en colonies sur les végétaux dont il puise la sève

**Sédative** : toutes substance qui agit contre la douleur, l'anxiété, l'insomnie, ou qui modère l'activité d'un organe.

**Souches** : ensemble d'individus issues de repiquage successif d'une colonie microbienne.

**Sporange** : urne contenant les spores chez les mousses, moisissures, champignons....

**Spores** : éléments unicellulaire, produits et disséminés par les végétaux et dont la germination donne soit un nouvel individu, soit une forme préparatoire à la reproduction sexuée (mousse, mycélium primaire...).

**Stomachique** : médicament pour l'estomac

**Tonique** : se dit d'un remède qui fortifie ou stimule l'activité d' l'organisme ; ou d'une lotion destinée à raffermir les muscles du visage.

**Vermifuge** : remède propre à faire évacuer les vers intestinaux.

**Zoospores** : cellules reproductrices nageuses, ciliées, existants chez les algues, et certains champignons.

# Introduction

## Introduction

Les plantes aromatiques et médicinales qu'a utilisées l'Homme pour se soigner depuis la nuit des temps, deviennent aujourd'hui d'authentiques médicaments jadis du développement exponentiel des biotechnologies végétales, convertissant ainsi l'ancienneté des huiles essentielles qui remontent à l'aromathérapie en une brûlante actualité (Boukhatem, 2010).

L'Algérie, bastion de la méditerranée de part sa position géographique, recèle multiples facteurs de pédogenèse, de variations climatiques, et de ressources hydriques, tous favorables à une culture intensive de cette flore parfumée, notamment de celle qui flatte aussi délicieusement la vue, le goût et l'odorat issue de l'agrumiculture (Jacquemonod *et al.* 2010).

Les citrus ou agrumes, renferment un genre d'arbustes exotiques fournissant à notre pays à l'instar de la plaine de la Mitidja une production phare en matière de fruits (Imache *et al.*, 2010) ; ces derniers sont très répandus par leur richesse en vitamines, oligo-éléments et huiles essentielles (Madjene & Madani, 2010).

Aussi dits hespéridés, leurs essences naturelles affichent plusieurs rôles biologiques édictées par les guérisseurs traditionnels voir stomachiques, toniques, anti-inflammatoires, et antipelluculaires (Praloran, 1971), avec en amont un pouvoir antiseptique ou antimicrobien étant des promoteurs de pénétration (Roux, 2008), rapporté dans la littérature en faveur de l'environnement, de la pharmacie, et de l'agronomie. (Chemat *et al.*, 2010).

Au Maghreb comme en Algérie, et dans le cadre de la recherche des méthodes alternatives de lutte antimicrobienne, le règne végétal offre beaucoup de possibilités ; de nombreuses études se développent actuellement pour isoler et identifier des composés de plantes qui ont une activité antibactérienne, anti-oxydantes, antifongiques, et insecticides (Djenane *et al.*, 2002 ; Chami, 2005 ; Bouzouita *et al.*, 2008; Hellal, 2011).

Parmi les problèmes phytosanitaires des cultures, le mildiou ou brûlure tardive causée par *Phytophthora infestans*, son nom s'est relié à la famine dans le monde, considéré comme une majeure contrainte qui menace la croissance et la production de la pomme de terre (Alim, 2010). En Algérie, la superficie affectée par cette maladie a été estimée entre 1.200 et 2.000 ha, soit près du tiers de la superficie globale consacrée à la culture de pomme de terre qui est de près 6.000 ha. En effet, les plaines d'El Attaf, Arib, Aïn Sultan, Amra et Rouina réputées comme principales zones productrices de ces solanacées ont été dévastées par le mildiou durant la campagne 2005-2006 (Sofiane, 2007 in Ahmed-Serir&Moussaoui, 2011).



Toutefois, l'utilisation massive de fongicides systémiques a conduit à la sélection d'isolats résistants à ces matières actives, qui appartiennent principalement au groupe des phénylamides (métalaxyl) (Gisi & Cohen., 1996) d'où, la lutte qui est menée actuellement repose sur l'utilisation par alternance de produits chimiques de contact et d'autres systémiques en tenant compte des conditions climatiques (Beninal, 2011).

Pour minimiser tous les effets néfastes de toxicité, les risques sur la vie de l'homme et des animaux et empêcher la dégradation constante du milieu biotique, il est impérieux que l'on fasse davantage appel à des méthodes de lutte phytosanitaire moins toxiques. En plus, les recherches orientées sur les dérivés et les composés secondaires fongicides des plantes et leur application possible dans l'agriculture sont intensifiées en influençant la recherche moderne en agro-chimie (Costa *et al.*, 2000 ; Negi *et al.*, 2005).

A cet effet, et vue l'importance des agrumes comme plantes ou comme produits dérivés tels que les huiles essentielles, ce modeste travail consiste à une contribution à l'étude des huiles essentielles de trois citrus : *sinensis* Cadenera, *limon* Eureka, et *bergamia* Castagnaro selon Tanaka (1961) ; ou *aurantium* L ssp *bergamia* selon Swingle (1967). Et de leur pouvoir antifongique pour les utiliser pour la première fois comme un moyen de lutte biologique sur le redoutable pathogène *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary. Agent responsable du mildiou de la pomme de terre en Algérie.

Cette étude s'articule en deux volets principaux :

- Extraction, caractérisation et identification des huiles essentielles de trois citrus obtenues par deux procédés d'extraction à partir des feuilles et de l'épicerpe des fruits.
- Tester le pouvoir antifongique de ces huiles essentielles *in vitro* et *in vivo* sur deux isolats de *Phytophthora infestans* agent causal du mildiou de la pomme de terre.

# Partie bibliographique

## **I.1 Généralités sur les agrumes**

### **I.1.1 Définition et Etymologie :**

Le terme agrumes dérive du Latin « Acrumen » qui désignait acides (Ménage, 1750). Aussi dits hespéridés, ils renferment à la fois les fruits, et les arbres qui les portent, appartenant à l'un des trois genres de la famille des rutacées (Poncirus, Fortunella et Citrus), qui elle comporte 900 espèces ligneuses (Polèse, 2008), produisant des fruits comestibles considérés comme baies, charnus contenant peu ou nombreuses graines, une pulpe acidulée organisée en quartiers, et une peau (zeste) riche en glandes à huiles essentielles aromatiques (Jacquemond *et al.*, 2009).

### **I.1.2 Origines et diffusion des agrumes :**

En provenance probable du Sud-Est Asiatique, l'histoire des agrumes mérite un suivi antique depuis leur sélection, migration, naturalisation, multiplication jusqu'à nos jours ; ce au gré des invasions et des grandes conquêtes du monde (Risso et Poiteau, 1822).

Il ya 1000 ans avant J-C les chinois qui connaissaient les kumquats et pomelos savaient déjà cultiver les agrumes pour leurs parfums, chose qui ne s'est disséminée que vers le XVème siècle en Europe grâce au cédratier ramené de La Perse où il existait depuis l'an 1400, ce même cédratier sera acclimaté en méditerrané par les Israélites (Loussert, 1989). Ces plantes se sont propagées donc dans le monde à partir de la méditerranée, et elles ont gagnées l'Amérique après le second voyage de Christoph Colomb en 1493 (Loussert, 1989).

Au début du moyen âge, les arabes introduisent les citrons et bigarades en méditerrané vers le XIème siècle, et le mandarinier au XIXème siècle. A la fin du moyen âge, l'orange douce de chine arriva en Europe grâce aux navigateurs portugais (Polèse, 2008).

Et c'est comme un hybride, qu'on considère le bergamotier apparu en Calabre au XVIème siècle. Et suite à un croisement entre oranger et mandarinier, le clémentinier nait en Algérie au XIXème siècle, voir d'autres croisements et mutations pour qu'il y'est aujourd'hui des agrumes dans toutes les zones du monde qui bénéficient de chaleur (Jacquemond *et al.*, 2009).

### **I.1.3 Description botanique et développement des agrumes :**

Ce sont des plantes à cycle de développement annuel, arbres de taille moyenne comprise entre 2 à 10m de hauteur, ramifiés par de charpentières branches à tronc court limité en une dizaine de cm pour conduire la sève, et à rameaux souvent épineux (Loussert, 1989).

Leur croissance végétative débute par de jeunes ramifications, de Février à Mai au printemps, jusqu'au mois d'Aout en été, et de Octobre à Décembre en automne (Loussert, 1989). Leur feuillage est dense à l'exception du genre *Poncirus*, les feuilles sont persistantes, entières, d'un vert vif brillant, et à pétiole développé orné d'ailettes (Polèse, 2008).

Leurs fleurs qui apparaissent de mars à Juillet en fonction de l'espèce et du climat, elles sont selon Chemat *et al.* (2010) blanches, nombreuses, isolées ou disposées en grappes ; composés de 4 à 8 pétales, 3 à 5 sépales, et de 20 à 40 étamines. La pollinisation se fait par le vent, et par les insectes, la nouaison et la maturation des fruits s'étale de Novembre à Mars après floraison.

Passant par toutes les nuances du jaune et de l'orange, la forme des fruits vari selon l'espèce, la chaire est riche en pulpe, les écorces sont épaisses, pourvues de poches sécrétrices d'huiles essentielles, constituées d'un albédo interne et d'un flavédo externe. Et en dépit des travaux réalisés sur la parthénocarpie (avoir de fruits sans pépins), les pépins sont nombreux ; jusqu'à 10 graines par fruit selon l'espèce, la variété et les conditions de pollinisation (Polèse, 2008).

Selon Loussert (1989), Leur système racinaire se localise essentiellement dans les premiers 100cm de profondeur où l'âge de l'arbre est fonction caractéristique du sol, de 2 à 3 racines principales fixatrices pouvant atteindre deux mètres de profondeur et des fines chevelus de racines secondaires nutritives.

### **I.1.4 Classification et systématique des agrumes :**

La majorité des taxonomistes considèrent que les agrumes dérivent du rang suivant :

***Embranchement : Spermaphytes***

***Sous-embranchement : Angiospermes.***

***Classe : Dicotylédones.***

**Sous-classe : Disciflores.**

**Ordre : Géraniales.**

**Famille : Rutacées.**

**Sous-famille : Aurantioideae.**

**Tribu : Citreae.**

**Genre : Citrus / Poncirus / Fortunella (Ahmad Khan, 2007).**

Faute d'ambiguïté de caractères due au greffage, à l'hybridation interspécifique ou résultant de mutations accidentelles qui ont eu lieu sur des milliers d'années auparavant; une diversité variétale caractérise chaque espèce dont 156 dénombrées du genre Citrus selon la classification de Tanaka en 1961 et 16 seulement selon la classification de Swingle et Reece en 1967 ( in Gallais, 1992). Ces deux classifications restent les plus communément utilisées car la taxonomie des agrumes ne demeure toujours pas stabilisée.

**Exemple : Nomenclature de deux variétés d'orangers (genre, espèce, variété)**

\* *Citrus sinensis* Cadenera. Et \* *Citrus sinensis* Sanguinelli (Loussert, 1989).

### **I.1.5 Exigences climatiques des agrumes :**

\* La température optimale permettant la croissance des agrumes ne dépasse pas 25°C à 30°C. Bien que l'idéal pour les Citrus est une gamme de températures à moyenne variant entre 10°C-12°C en hivers et de 22°C-24°C en périodes estivales (Loussert, 1989).

\* La gelée tue les arbres, quant aux températures trop élevées ; elles maintiennent les fruits déjà mures d'une couleur vert-jaunâtre (Van Ee, 2005).

\* Pour prospérer, les Citrus réclament une bonne irrigation voir jusqu'à 1000mm d'eau par an. En outre, l'eau de pluies qui stimule ces arbres est néfaste pour leurs cultures quand elle est abondante par excès (Loussert, 1989). En matière d'hygrométrie, les orangers et mandariniers nécessitent 2mois de sécheresse pour fleurir, les pamplemoussiers poussent bien sous les tropiques humides. (Van Ee, 2005).

### **I.1.6 Exigences édaphiques des agrumes :**

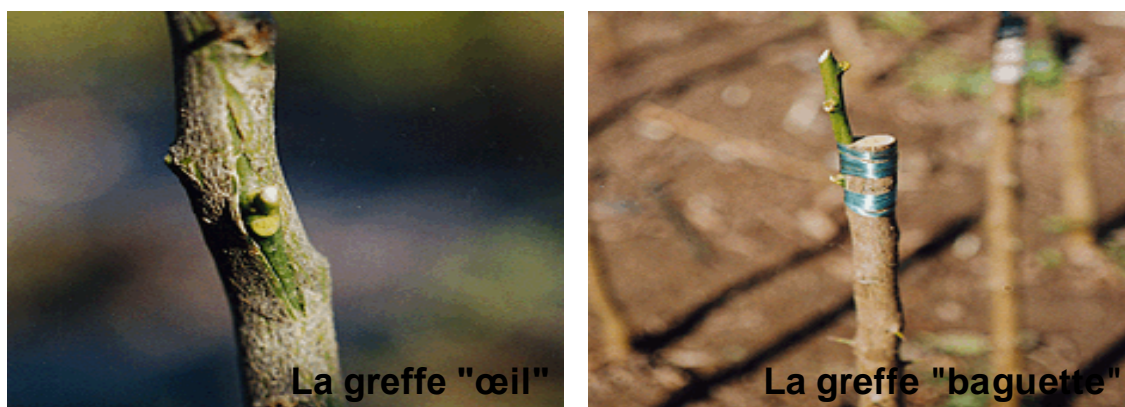
Du sable à l'argile lourde, les agrumes peuvent se cultiver, mais le sol argileux est le mieux adapté sur le plan fertilité. Un sol sableux grâce aux pores qu'il contient permet à la fois le passage de l'air et des solutés perméables ; aussi il confère aux racines un bon développement en profondeur. (Loussert 1989). Un bon drainage est recommandé pour leur développement, néanmoins ils doivent être abrités ou protégés car le vent fort abîme les arbres (Van Ee, 2005).

Un pH adéquat compris entre 5 à 6, et un apport important de matières organique et minérale doivent être connus (Loussert 1989).

### **I.1.7 Techniques de multiplications des agrumes :**

**a) Sexuée par semis :** repose sur la faculté germinative des graines, employée de Mars à Avril pour obtenir des nouvelles variétés ou des arbres francs pied ou porte-greffes (Loussert, 1989).

**b) Végétative par greffage :** De Mars à Juin, elle repose sur l'activité de la sève suite à une sorte de soudure de greffon sur porte greffe, soit en écusson dite à œil, ou en baguette (Loussert, 1989).



**Figure 1 : Le greffage des agrumes (Djaijaa, 2006).**

### **I.1.8 Phytopathologie des agrumes :**

Au de la des insectes et ravageurs favorisés par leur biotope, les agrumes sont confrontés à des maladies microbiennes causant leur dépérissement (voir tableau 01).

**Tableau 1** : Principales maladies de dépérissement des agrumes (Jamoussi, 1955)

Nature de la maladie	Nom ; et Agent causal	Vecteurs et contamination	Symptômes	Recommandations préventives et curatives
Virale	Tristeza	Pucerons	Décoloration, flétrissement, nécrose du phloème, tronc troué.	Garantir l'état sanitaire du plan mère. Ou brûler l'arbre contaminé.
Bactérienne	Bactériose ; <i>Pseudomonas syringae</i> .		Tache noirâtre qui s'agrandit sur feuilles jusqu'à nécroser.	Traiter par un produit cuprique pour limiter son extension.
Fongique	Gommose ; <i>Phytophthora</i> .	* Le sol. * l'eau.	Sécrétion de gommages acides ; dessèchement.	Greffer sur bigaradier. Et utiliser un fongicide

### I.1.9 Importance économique des agrumes :

La production d'agrumes se place en amont de la chaîne agricole fruitière mondiale ; malgré leur culture limitée dans la ceinture terrestre du 40° parallèle Nord et Sud (Polèse, 2008). Où le Brésil, et les pays méditerranéens sont leaders selon le tableau 2.

**Tableau 2** : Production d'agrumes en millions de tonnes (FAO, 2005 in Jacquemond *et al.*, 2009).

Méditerranée	19,5	Brésil	18,9	Chine	15,2
USA	10,5	Mexique	6,9	Espagne	6,2
Italie	3,3	Iran	3	Japon	1,3

Vue leur consommation estimée à 59% en 2005, ces produits agricoles font l'objet d'importants échanges internationaux car on a enregistré 11% d'exportations dans la même année (Jacquemond *et al.*, 2009). L'agrumiculture Algérienne a connu quant à elle une régression significative au XX<sup>ème</sup> siècle, à l'instar de la plaine de La Mitidja, qui fut mieux servir la métropole et qui aujourd'hui tend à évoluer pour occuper le 10<sup>ème</sup> rang des producteurs d'agrumes méditerranéens 48 ans après l'indépendance (Chemat *et al.*, 2010).

**Tableau 3** : Evolution des rendements d'agrumes (qx/ha) dans la Mitidja (ITAFV, 2010)

Wilaya	2005	2006	2007	2008	2009	2010
Blida	2055110	2474960	2298150	2273641	2660519	3056000
Alger	501170	511190	535690	6666584	659820	704000
Tipaza	375730	485680	504135	618645	680000	695000

### I.1.10 Importance industrielle :

En dehors de la comestibilité du fruit, les sous produits d'agrumes obtenus de l'écorce ou de la pulpe à 30% de la production totale en 2005, ont trouvés des vocations multiples. Avec une demande accentuée sur les jus de fruits en industrie alimentaire ; les huiles essentielles servent comme aromatisants en parfumerie, et pour l'industrie des détergents. La pulpe agglomérée du jus d'oranges est utilisée pour l'alimentation animale (Jacquemon *et al.*, 2009).

### I.1.11 Caractéristiques des variétés étudiées :

**a) Le bergamotier :** « *Citrus bergamia Castagnaro* » Espèce selon Poiteau et Risso et Tanaka en 1961 ; ou « *Citrus aurantium L.* » variété de bigaradier selon Swingle en 1967. Hybride à parents méconnus, arbre de 3 à 5m, d'origine incertaine entre l'Asie et l'Orient, il tire son nom de Bergame en Italie (Chemat *et al.*, 2010). À feuilles persistantes, et à fleurs blanches. Fructifie de novembre à Décembre, à fruits jaunes pales, amères, en forme de poire à chair lisse, et d'un arôme agréable utilisé en parfumerie (Baba Aissa, 1999).

**b) Le citronnier :** « *Citrus limon Eureka* » Originaire de Californie 1858, arbre de 3 à 5m à feuilles persistantes, odorantes, lancéolées, à floraison remontante permettant des fruits de moyen calibre (Loussert, 1989). Fleurs blanches nombreuses, rosées et parfumées, à 5 pétales charnus et 10 étamines (Baba Aissa, 1999). Ecorce jaune vif au printemps et en été (Loussert, 1989 ; Polèse, 2005). Ses fruits utilisés comme antiseptiques, cicatrisants (Bardin, 2004), stomachique, carminatif, et diurétique (Bardeau, 1976), Les feuilles sédatives en infusion.

**c) L'oranger :** « *Citrus sinensis cadenera* » Originaire d'Espagne, se développe dans des terres légères et fumées (Loussert, 1989). Feuilles aigues d'un vert foncé, fleurs blanches à court calice, parfumées fournissant l'essence de néroli. Des fruits petits, arrondis dès Décembre, à pulpe fine et juteuse. (Polèse, 2005). A effet : Digestif, tonique, vermifuge, antiseptique, et sédatif (Bardeau, 1976).



## **I.2. Les huiles essentielles**

### **I.2.1 Définition et historique des huiles essentielles :**

A partir de toute matière première parfumée et botaniquement définie, s'expriment des produits odorants d'un mélange organique dits huiles essentielles (Milpied, 2009). C'est un ensemble de substances huileuses complexes et très volatiles, rassemblées par un mode d'extraction, soit par distillation à l'eau ou à la vapeur d'eau, par solvant, ou bien mécaniquement par distillation sèche à partir de l'épicarpe des Citrus (Bruneton, 1993).

Ces essences ont fait l'objet d'une discipline antique nommée « Aromathérapie », cette dernière doit son nom à Gattefossé en 1927 (Fesneau, 1999), son utilisation datant de 7000 ans avant J-C au Pakistan, et de 4000 ans avant J-C en Egypte ; consiste à remédier aux maladies par le biais des essences parfumées des plantes (Yuredon, 2004).

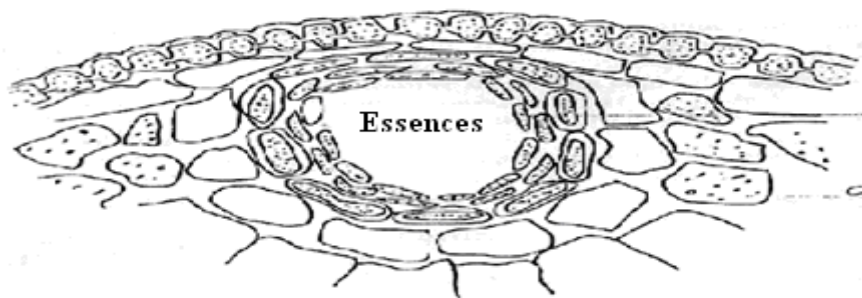
Au XIX<sup>ème</sup> siècle, la chimie organique est parvenue à identifier et isoler certaines molécules de ces produits que la chimie industrielle a ultérieurement imités au XX<sup>ème</sup> siècle (Valnet, 1980). Cependant, depuis le remarquable alambic arabe du 13<sup>ème</sup> siècle, les techniques d'extraction des huiles essentielles tendent à évoluer suivant les progrès de la technologie (Odoul, 2003).

### **I.2.2 Localisation des huiles essentielles :**

Lamiacées, Myrtacées, Rutacées et Poacées,...etc. plusieurs familles botaniques en contiennent suffisamment d'huiles essentielles ; probablement dans toutes leurs parties (Roux et Cartier, 2007).

Néanmoins, il existe des structures tissulaires spécialisées pour leur sécrétion : cellules sécrétrices isolées ou épidermiques, poils épidermiques, poches sécrétrices comme pour les agrumes, et canaux excréteurs (Bendriss, 2003)..

La biosynthèse terpénique de ces essences se déroule au niveau du compartiment cytosol-réticulum endoplasmique (Douglas *et al.*, 1995).



**Figure 02 : poches sécrétrices chez les végétaux (Bendriss, 2003)**

### **I.2.3 Facteurs de variabilité des huiles essentielles :**

Qualitativement selon Bruneton (1999), les huiles essentielles varient selon l'espèce, la variété (origine botanique), selon le cycle végétatif et la génétique d'une plante, et selon l'environnement à savoir : le sol, la lumière, le climat, les prédateurs et microorganismes adhérents au végétal. En outre, l'époque de la récolte qui liée au cycle physiologique d'une plante, ainsi que la technique et le temps d'obtention influent directement les rendements en huiles essentielles (Flück, 1977).

### **I.2.4 Propriétés physiques des huiles essentielles :**

- Ce sont des produits très odorants, âcres, caustiques, non visqueux, et volatils à température ambiante. Ils sont sensiblement solubles à l'eau, et très solubles à l'alcool et l'éther où ils forment des esprits ou teintures (Edouard et Méneville, 1838).
- A l'état solide ou en cristaux, les huiles essentielles ont un point de fusion et un point de congélation précis (Garnero, 1985). Leur point d'ébullition est toujours supérieur à 100°C. (Duraffourd et Lapraz, 2002).
- De densité généralement inférieure à 1 car la plus dense reste l'huile essentielle de wintergreen à 1,187 (Duraffourd et Lapraz, 2002), Ce sont des liquides mobiles entraînés à la vapeur d'eau (Roux, et Cartier, 2007).
- Généralement Incolores, hydrophobes, inflammables, et oxydables (Milpied, 2009).

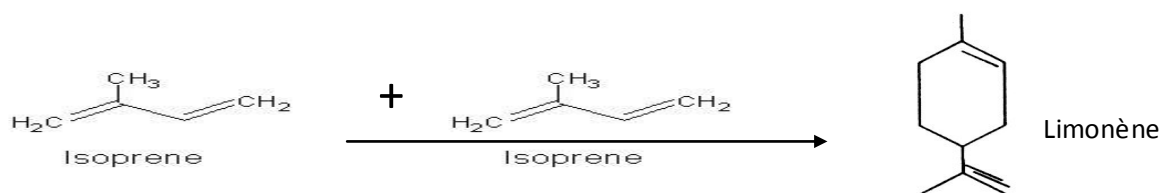
### **I.2.5 Composition chimique des huiles essentielles :**

La diversité des composés chimiques des huiles essentielles fait intervenir 3000 constituants de structures confondus. A côté des composés majoritaires (de 2 à 6

généralement) on trouve d'autres composés à l'état de traces, tous se répartissent sur deux grands groupes ; entre terpènes et composés aromatiques dérivés du phényle propane (Bruneton, 1999). En outre, il est admis que divers molécules comme certains carbures, acides...etc. sont entraînés lors de la distillation ; voir des impuretés comme les pesticides utilisés à la culture qui peuvent se retrouver dans une huile essentielle (Milpied, 2009).

### a) Les terpènes :

Ce sont des molécules bioactives, hydrocarbures naturels issues du métabolisme secondaire des végétaux, à formule brute de  $(C_5H_8)_n$  dont  $x$  vari de 1 à 8 selon l'insaturation de la molécule (Malecky, 2008), à la base ils dérivent d'une condensation « tête à queue » d'un nombre variable d'unités isopréniques  $(C_5H_8)_n$  à une ou plusieurs fonctions chimiques distinctes et des masses moléculaires peu élevées (Gaucher et Lusson, 2000).



**Figure. 03 :** Biosynthèse du limonène (Malecky, 2008).

Parmi les terpènes les plus rencontrés dans les huiles essentielles :

- **Les mono-terpènes :** Leur précurseur est le géranyl pyrophosphate (Malecky, 2008). Ils représentent le premier maillon de biosynthèse des terpènes des végétaux (Milpied, 2009). Ils peuvent être un carbure acycliques comme le « myrcène », monocyclique tels que le « Limonène », Et bicyclique voir le « Camphre » à fonction cétone (Bruneton, 2007).
- **Les sesquiterpènes :** A trois unités isopréniques  $(C_5H_8)_3$ , ils sont l'objet d'une ou de plusieurs cyclisations et réarrangements. Soit monocycliques comme le « Atlantone » à fonction cétone, bicyclique à citer le « Carotol » à fonction alcool, ou polycycliques (Milpied, 2009).

### b) Composés aromatiques dérivés du Phényle-propane :

Ce sont des allyles et des propényl phénols responsables de l'arôme des essences. Comme

les terpènes, ces composés sont classés selon leurs fonctions (Lutige *et all.*, 2002). Moins fréquents que les précédents, ils dérivent du phényle-propane C6-C3 (Milpied, 2009).

### **I.2.6 Rôles des huiles essentielles :**

- Malgré que le rôle physiologique exact des huiles essentielles reste inconnu, Elles demeurent attractifs d'insectes en matière de pollinisation, et protecteurs en étant répulsifs contre prédateurs (Sallé, 1991), antiseptiques et inhibiteurs d'évaporation (Mainbeau, 1994).
- Des propriétés thérapeutiques sont reconnues à l'usage d'un nombre important d'essences : antiseptiques vis-à-vis des germes pathogènes y compris les plus antibiorésistants, spasmolytiques et sédatives (Bruneton, 1999), antioxydantes en rapport à leur teneur en phénol (Seiller *et all.*, 2003).

### **I.2.7 Les procédés d'obtention des huiles essentielles :**

On estime plusieurs modes d'extraction des essences naturelles, parmi lesquels :

#### **a) La distillation :**

Illustré par Garnier en 1891, elle sert à séparer l'huile essentielle des autres composés naturels selon la divergence de densité, elle demeure un mode d'extraction ancien et efficace malgré la possibilité d'entraîner des molécules indésirables (Bruneton, 1993). Elle sépare les principes volatils d'un mélange, de ceux qui ne le sont pas, selon les propriétés de ses vapeurs qui après chauffage à ébullition dans une enceinte d'eau, se condensent sur les parois plus froides d'un récipient relié à cette enceinte (Duraffourd et Lapraz, 2002). On parle d'hydro distillation indirecte quand le végétal baigne à l'eau bouillante, et directe ou « D'entraînement à la vapeur » si le végétal est traversé par un courant de vapeur d'eau. Dans les deux cas l'huile est entraînée vers le haut et récupérée par décantation (Boukhatem, 2010).

#### **b) L'extraction par solvant :**

Extraction chimique qui consiste à séparer une substance donnée d'un mélange par un solvant où la molécule cible est très soluble. L'espèce à extraire abandonne ce mélange par diffusion pour se dissoudre dans le solvant où sa solubilité est plus grande, ce dernier s'évapore et quitte la solution après passage au rotavapeur ou au Soxhlet (Bendriss, 1997 ; Biallo *et all.*, 2004 ; Yakhlef, 2010). Le choix du solvant est important car plusieurs facteurs

causent la rupture solvant-solution aqueuse : structure moléculaire, composition ionique, température, sélectivité (Calvet, 2005).

### c) Autres modes d'extraction des essences végétales :

**Expression à froid:** Procédé mécanique. Par écrasement des péricarpes des fruits, en particulier ceux des Citrus ou en pressant carrément les fruits charnus, l'essence est séparée du produit par centrifugation (Martini et Seiller, 1999).

**Enfleurage ou macération à chaud :** Consiste à extraire les principes aromatiques des plantes sur des corps gras jusqu'à saturation, et les récupérer après dissolution à l'alcool (Duraffourd et Lapraz, 2002). Voir tableau 04 les avantages inconvénients de ces techniques.

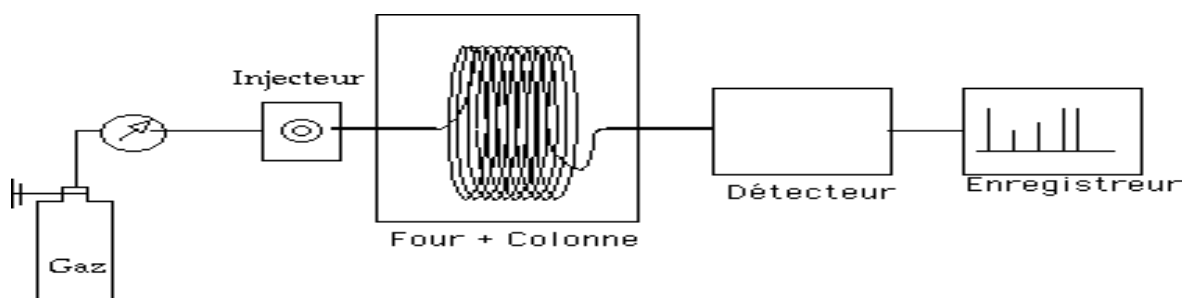
**Tableau 4 :** Avantages et inconvénients des procédés d'extraction (Richard et Multon, 1992).

Procédés	Avantages	Inconvénients
Hydro-distillation	Essence concentré de bonne qualité	Evaporation
Expression	Essence non altérables de bonne qualité	Diffusion lente
Enfleurage	Pommade gardant la finesse de l'odeur	Cout très élevé
Solvant organique	Rendement élevé, essence olfactivement proche du végétal	Essences impures Evaporation et cyclisation

### I.2.8 Méthodes d'identification, de séparation et d'analyse des huiles essentielles :

La chromatographie est une méthode analytique qui est largement utilisé pour la séparation, l'identification et le dosage des constituants chimiques dans des mélanges complexes, il n'existe aucune autre méthode de séparation aussi puissante à application ci générale (Douglas et al, 1997). On distingue plusieurs types de chromatogrammes :

- La chromatographie sur couche mince.
- La chromatographie liquide à haute performance.
- La chromatographie en phase gazeuse « CPG ou CG ».
- La chromatographie gazeuse liée à une spectroscopie de masse « GC-MS) (Lafont, 2005).



**Figure. 04 :** Appareillage de la chromatographie sur phase gazeuse (Lafont, 2005).

### **I.2.9 Conservation des huiles essentielles :**

Selon Bruneton (1999), les risques de leur altération sont élevés : photo isomérisation, photo cyclisation, peroxydation des carbures et décomposition en cétone et alcool. Ce qui modifie leurs propriétés si elles ne sont pas enfermées dans des flacons appropriés en acier inoxydable, en verre teinté ou aluminium. À l'abri de la lumière et de la chaleur, ces flacons doivent être secs et propres pour éviter les contaminations (Valnet, 2000).

### **I.2.10 Huiles essentielles des espèces d'agrumes étudiées :**

#### **a) huiles essentielle de bergamote :**

Obtenue des feuilles ou du zeste par expression à froid, par distillation ou par solvant, de densité entre 0,875 à 0,883 ; son pouvoir rotatoire de  $+4^{\circ}$  à  $+28^{\circ}$  (Sallé, 1991). Son profil chimique différencie des huiles essentielles d'agrumes et comporte: du limonène, terpinène, linalol, acétate de linalyle, géraniol, bergaptène, et bergamotène (Sallé, 1991 ; Bruneton, 1999). Très utilisée en parfumerie, toutefois on la mélange au lait ou au miel pour son pouvoir stomachique, vermifuge et stimulant ; ou on l'applique sur la peau vu son effet antiseptique et antispasmodique (Sallé, 1991).

#### **b) Huile essentielle d'orange douce :**

Obtenue de même que la précédente, sa densité est de 0,845 à 0,860, son pouvoir rotatoire est de  $+95^{\circ}$  à  $+99^{\circ}$ , au même usage que celle de la bergamote, elle règle les contractions cardiaques, indiqué dans les cas d'insomnie, de fièvre, de coliques et contre les rides car elle contient : du limonène, Aldéhydes, Géraniol, linalol, Citral, citronellal, et terpinéol (Sallé, 1991).

**c) Huile essentielle de citron :**

Extraite par les mêmes procédés que les précédentes, sa densité est comprise entre 0,850 et 0,870, à un pouvoir rotatoire de +57° à +68°, riche en : pinène, limonène, linalol, acétate de linalyle, citral, citronellal, vitamine A et vitamine B. Indiqué en cas : d'infection pulmonaire, d'anémie, de parasites intestinaux, et pour l'entretien de la peau. En outre, il est admis qu'en 15 minutes elle neutralise les méningocoques, et en 1 heure les bacilles typhiques (Sallé, 1991).

**I.2.11 Pouvoir antimicrobien des huiles essentielles :**

L'effet antimicrobien des huiles essentielles est connu depuis longtemps. En 1919, Gattefossé a montré que le bacille de Koch était détruit en 5 minutes par une émulsion à 1% d'huiles essentielles de pin. Beylier-Maurel (1976) rappelle qu'en 1887, Chamberland rapporta l'activité antimicrobienne des essences de cannelle, d'origan et de girofle. Plus tard, d'autres auteurs ont montré que les huiles essentielles étaient efficaces sur les germes résistants aux antibiotiques et qu'elles ont un spectre d'action assez large puisqu'elles agissent aussi bien sur les bactéries, les levures, les moisissures que sur les virus (Valnet *et al.*, 1978; Janssen *et al.*, 1987; Remmal, 1994).

Leur composition et, en particulier, la nature de leurs composés majoritaires sont responsables de cette activité antimicrobienne (Simeon *et al.*, 1976). En effet, il est admis que l'activité antimicrobienne des huiles essentielles se classe dans l'ordre décroissant selon la nature de leurs composés majoritaires: phénols > alcools > aldéhydes > cétones > oxydes > hydrocarbures > esters (Lee *et al.*, 1971; Inouye *et al.*, 2001).

En effet, d'après Hulin *et al.* (1998), le carvacrol semble être un puissant inhibiteur de croissance de bactéries telles que *Baccillus cereus* et *Salmonella*. De même, Bagamboula *et al.* (2004) ont récemment montré un effet inhibiteur du carvacrol sur deux espèces de *Shigella*. D'autre part, les citrals et quelques principes actifs d'agrumes ont approuvé une efficacité contre les méningocoques, et les bacilles typhiques détruits en 15mn (Sallé, 1991), sur des staphylocoques, sur *E.coli*, et sur des espèces fongiques du type *Saccharomyces cerevisiae* et *Candida albicans* qui ont atteint jusqu'à 20mm des zones d'inhibition (Chemat *et al.*, 2010; Chami, 2005). Cependant, l'effet des composés quantitativement minoritaires n'est pas forcément négligeable (Lattaoui, 1989).

**II. Importance des huiles essentielles dans la lutte biologique :**

Les interventions phytosanitaires présentent des effets néfastes sur l'environnement, et favorisent le développement de souches résistantes aux matières actives utilisées face à ces problèmes. À l'attitude des consommateurs sensibilisés aux problèmes de santé liés aux résidus pesticides dans les denrées alimentaires, et exigeant des produits de qualités, de nouvelles stratégies de protection vis à vis des parasites des cultures, basées sur l'utilisation de bio pesticides à base d'huiles essentielles tentent d'émerger, et visent à assurer une rentabilité pour l'agriculteur en faveur de l'environnement (El-Guili *et al.*, 2009).

Les extraits naturels issus des végétaux contiennent une variété de composés phénoliques ainsi que des huiles essentielles auxquelles on attribue un pouvoir inhibiteur des micro-organismes (Hellal, 2010). Ils commencent à avoir beaucoup d'intérêts comme sources potentielles de molécules bioactives pour faire l'objet d'éventuelles utilisations comme alternative pour le traitement des maladies infectieuses car elles développent naturellement des procédés de protection contre de nombreuses agressions.

Ces essences affichent des comportements différents face aux maladies. Ainsi, la sélection végétale permet d'avoir aujourd'hui des sujets moins sensibles aux maladies, limiter les contagions, et empêcher les épidémies. Leur utilisation permet donc de diminuer les traitements phytosanitaires. Et même si les termes biologiques et pesticides semblent contradictoires, les organismes de certification permettent le recours à certains pesticides naturels, tels que les huiles essentielles qui demeurent des solutions prometteuses de traitement par excellence (Hmiri *et al.*, 2011).

Multiples travaux, ont porté sur la vérification du potentiel antifongique de ces substances, cette hypothèse a été confirmé sur plusieurs souches de moisissures et de levures grâce à leur richesse en agents antifongiques voir : le thymol, le carvacrol, l'eugénol, les citrals, et d'autres phénols (Alilou *et al.*, 2009).

Néanmoins, la littérature n'a pas cité beaucoup de travaux sur l'utilisation des huiles essentielles, pour lutter contre la plus grave maladie de la pomme de terre; nutrition de base pour l'Homme (Strand, 2006), surtout avec l'apparition de nouvelles souches de brûlures tardives plus virulente causant de sérieuses pertes de sa culture (Alim, 2010).



## II.1 Généralités sur la pomme de terre :

### II.1.1. Description botanique et généralités sur la pomme de terre :

La pomme de terre (*Solanum tuberosum* L.) est un tubercule comestible produit par l'espèce *Solanum tuberosum*, appartenant à la famille des solanacées, plante herbacée, vivace et annuelle à port dressé, qui peut atteindre un mètre de hauteur pour devenir plus ou moins étalée avec l'âge (Rousselle *et al.*, 1996).

Son système racinaire est fasciculé et très ramifié. Il est constitué de racines adventives qui apparaissent à la base des bourgeons du tubercule ou sur les nœuds des tiges enterrées ; pour cette raison, le tubercule doit être planté à une profondeur telle qu'elle permette une formation adéquate des racines et des rhizomes (Fig.05).

Les racines connaissent une croissance rapide depuis les premiers stades de développement jusqu'au moment où commence la formation des tubercules (Bernhards, 1998).

Les feuilles sont caduques, alternes, de forme lancéolée et de taille hétérogène. De toutes petites folioles s'intercalent par paires entre les plus grandes.

Les inflorescences sont des cymes axillaires. Les fleurs sont autogames : ne contiennent pas de nectar, elles sont donc peu visitées par les insectes et la fécondation croisée est presque inexistante dans la nature (Soltner , 1988).

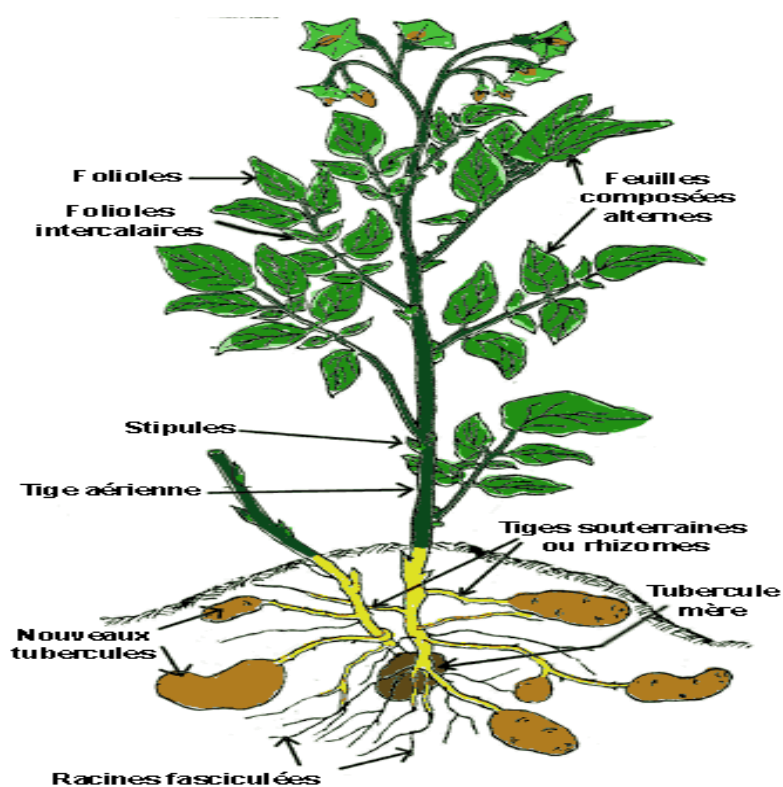


Figure 05. L'appareil végétatif de *Solanum tuberosum* (Soltner, 1988)

**II.1.2. Histoire de la pomme de terre et son introduction en Algérie :**

La pomme de terre existe depuis plus de 8 000 ans. D'après les recherches réalisées, l'Amérique du Sud serait la terre natale de ce légume. Au XVIème siècle, à la recherche de trésors et du pays d'El Dorado, En Algérie, la pomme de terre a probablement, été introduite une première fois au XVIème siècle par les Maures andalous qui ont propagé les autres cultures dans la région comme la tomate, poivron, maïs, tabac... puis, elle est tombée dans l'oubli n'ayant pas suscité d'intérêt. Dans la deuxième moitié du XIXème siècle, les colons l'ont cultivé pour leur usage, car les algériens y sont réticents malgré les disettes successives. C'est la dernière grande famine des années 30/40 qui est venu à bout de cette opposition (Meziane, 1991).

**II.1.3. 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. C'est une plante de saison froide, préférant un climat frais. L'optimum de germination des semences est de l'ordre de 12 à 15°C et l'optimum de croissance est compris entre 16 et 20°C (Bamouh, 2003).

**II.1.4. Importance Economique de la pomme de terre en Algérie :**

La pomme de terre est l'un des produits les plus importants pour l'alimentation de la population algérienne : elle occupe la deuxième place après le blé. Sa production en Algérie a atteint 3,2 millions de tonnes en 2010 alors qu'en 2009 elle a avoisinée les 2,67 millions de tonnes, et 2,2 millions de tonnes en 2008. La wilaya de Aïn De fla est classée première ville productrice de pomme de terre au niveau national avec un taux de 14% (Rayan, 2011).

**II.1.5. Les problèmes phytosanitaires de la pomme de terre en Algérie :**

Actuellement en Algérie, les maladies de la pomme de terre sont responsables pour une part importante des faibles rendements et de la qualité médiocre du produit obtenu. Les dégâts sont occasionnés par des agents parasitaires (fongiques ,bactériens , virales et ravageurs). Plus d'une vingtaine de maladies pouvant affecter la culture de pomme de terre, outre le mildiou qui se manifeste chaque année de façon plus au moins intense selon les conditions climatiques. Une attaque précoce du champignon 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).

## II.2. Généralités sur l'agent pathogène :

### II.2.1. Systématique :

Le genre *Phytophthora* qui signifie destructeur de plantes, avec environ 35 espèces, il appartient au groupe de champignons des oomycètes qui sont essentiellement terrestres, mais en présence d'eau, il produit encore des zoospores mobiles (Peter et al., 2003). Ils forment un genre important responsable de nombreuses maladies des végétaux au sein de la famille des Pythiacées, de l'ordre de Péronosporales, et de la classe des oomycètes. *Phytophthora infestans*, a été longtemps considéré comme tous les oomycètes un champignon, cependant il a été récemment classé comme protiste fongiforme (Legembre, 2008). Les oomycètes présentent une croissance filamenteuse qui les fait ressembler à des champignons mais les connaissances actuelles sur leur structure amène à les apparenter plutôt aux algues bien que, contrairement à ces dernières, ils n'aient pas de chlorophylle (Rohner, 2002).

### II.2.2. Morphologie :

La morphologie de *Phytophthora infestans* est représentée par un mycélium coenocétique hyalin, à développement endogène (intercellulaire et intracellulaire) via la formation d'haustoria (Chamont, 2010). Ce pathogène présente de renflements au niveau des sites de ramification, en particulier aux points de la formation des sporocystes (Thurston & Shultz, 1981). Ces derniers en position terminale ont une forme souvent citronnée (Fig.7) et possèdent une papille apicale. Leur paroi est mince de l'ordre de 21 à 38  $\mu\text{m}$  de longueur et 12 à 23  $\mu\text{m}$  de largeur (Thurston & Shultz, 1981).



Figure 06. Morphologie de *P.infestans* au G :X400 (Ahmed- serrir&Moussaoui, 2011).

### II.2.3. Spécificité parasitaire :

Cet agent phytopathogène provoque des dégâts très répandus chez de nombreuses plantes cultivées, comme le cacaoyer, les ananas, les tomates, l'Hévéa, Les papayers, les oignons, les

fraisiers, les pommiers, le soja, le tabac, et les citrus. L'espèce la plus connue de ce genre est *Phytophthora infestans*, responsable du mildiou de la pomme de terre (Peter et al., 2003).

*Phytophthora infestans* peut aussi être responsable du mildiou d'autres solanacées cultivées comme la tomate, l'aubergine, le poivron et sauvages comme les morelles (Legemle, 2008). Aux États-Unis, plusieurs investigations ont confirmé que la morelle (*Solanum. sarachioides*), petunia : (*Petunia hybrida*) et l'aigre-doux : (*Solanum. bulcamara*) constituent aussi des hôtes pour ce pathogène (Laing, 1998). Cette pathogénicité ne se limite pas seulement aux grandes cultures naturelles. Cependant, plusieurs autres cultures appartenant à d'autres genres et espèces d'arbres tropicaux et arbustes se sont révélées des hôtes pour ce pathogène (Vartanian & Endo., 1985 ; Erwin & Ribeiro, 1996). Christine et al. (2000) ont conclu que la large apparition de nouveaux génotypes de *Phytophthora infestans* a contribué à l'élargissement de la gamme hôtes de ce pathogène.

### **II.3. Généralités sur le mildiou de la pomme de terre :**

#### **II.3.1. Historique :**

De nombreux auteurs pensent que le centre d'origine du mildiou de la pomme de terre serait la vallée de la Toluca au Mexique (Grünwald et al., 2000 ; Grünwald & Flier, 2005), où la diversité des populations de *Phytophthora infestans* est maximale (Niederhauser, 1991), alors que la première épidémie en Europe remonte à 1845. Cette maladie est aujourd'hui présente de façon quasi mondiale. L'épidémie démarra en Belgique, puis se propagea, via la Suisse, la France et le sud de l'Angleterre. Cette maladie, combinée à la réquisition du Blé, elle cause la famine Irlandaise de 1845 et reste une maladie sérieuse aujourd'hui (Giguere, 2002). Entre 1846 et 1851, la famine qui a fait plus d'un million de morts et a émigré un autre million d'Irlandais aux USA et au Canada (Woodham-Smith, 1962 ; Hampton, 1992).

#### **II.3.2. Symptômes :**

Le mildiou, causé par *Phytophthora infestans*, engendre la brûlure tardive de la pomme de terre et de la tomate. Ses symptômes affichés trois à cinq jours après l'infection initiale, se manifestent par des taches aqueuses circulaires ou irrégulières aux extrémités des feuilles basales, elles s'agrandissent et deviennent brun foncé. Sur la face inférieure des feuilles apparaît un duvet blanc-grisâtre qui dissémine les spores (Paitier, 1980). Une seule lésion foliaire peut produire jusqu'à  $7 \times 10^5$  spores qui propagent la maladie. Cette maladie redoutable peut toucher tous les organes de la plante : jeunes pousses, feuilles et pétioles, bouquets terminaux, tiges et tubercules (Maaarro, 2010).

Sur les tiges attaquées se manifestent des nécroses qui se repartissent longitudinalement en différentes zones noircissent et la plante peut dépérir en quelques jours (Paitier, 1980).

De plus, des taches diffuses brunâtres sur l'épiderme du tubercule et des particules (fructifications) à l'aspect d'une substance blanche, dégageant une odeur nauséable. La maladie se manifeste donc par des pustules noir violacées et irrégulières reconnu sous microscope par des zones aqueuses d'un tissu granuleux rouillé et de 2cm de profondeur, Lorsque ces tubercules germent, les jeunes pousses seront infectées (Rousselle *et al.*,1996). Avec le temps, d'autres micro-organismes peuvent s'associer et entraîner la pourriture du tubercule s'exprimant par des lésions foncées mêlées à une substance blanche à la base des feuilles (Rock Giguere, 2002).



**Fig.07. Taches brunes sur feuilles et tubercules (Rousselle *et al.*, 1996).**

### **II.3.3. Impact de la maladie sur l'économie :**

Le Mildiou de la pomme de terre reste l'une des maladies les plus dangereuses des plantes cultivées car une épidémie en conditions favorables induit une importante sporulation en une durée d'incubation très courte. L'évolution des souches est caractérisée par une adaptation facile aux variétés et aux fongicides ce qui augmente leur agressivité. En zone tempérée, les conséquences économiques sont fréquentes et graves. Une attaque précoce peut entraîner des baisses de rendement de plus de 50 %, une attaque plus tardive détériore la qualité des tubercules (Dubois, 2009).

Ces pertes de rendement peuvent atteindre les 100% ; en moins de trois semaines une culture de pomme de terre peut être entièrement détruite (Gaucher *et al.* ,1998), notons que toutes les attaques n'ont pas les mêmes conséquences sur le rendement: les attaques précoces induisent surtout une diminution de la photosynthèse, alors que les attaques tardives conduisent à une baisse de la qualité des tubercules (Radtke & Rieckmann, 1991).

L'installation et l'évolution de la maladie sont largement définis par les conditions climatiques, notamment l'humidité et la température (Harrison, 1992). Une température comprise entre 15 et 25°C et une humidité relative supérieure à 90% sont favorables au développement du mildiou (Krause *et al.*, 1975).

#### II.3.4. Le cycle évolutif de la maladie :

Le champignon passe l'hiver sur les pommes de terre oubliées en terre, réapparaissent à l'air libre au printemps suivant ; il émet des spores qui vont se propager sur d'autres plants si les conditions sont favorable, à savoir une humidité élevée, une température d'environ 20°C. la propagation est alors rapide, le feuillage se dessèche, les spores tombent au sol et se fixe au tubercule pour l'infester (Polèse, 2006).

Sur les cellules des feuilles, il existe deux possibilité pour la germination des spores, soit par les zoospores libérés des sporanges qui nagent jusqu'à l'endroit où germer, ou bien par germination directes des sporanges à travers un tube germinant (Peter et all, 2003).

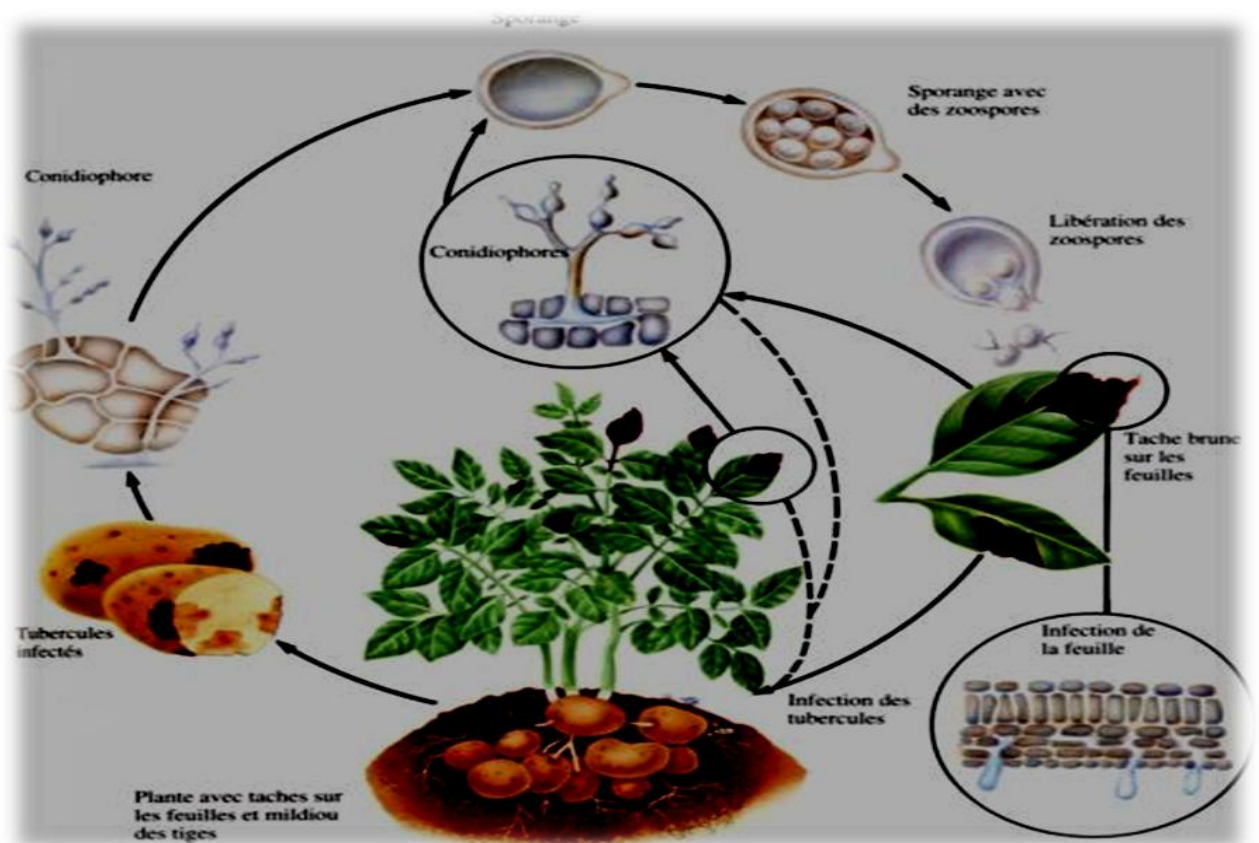
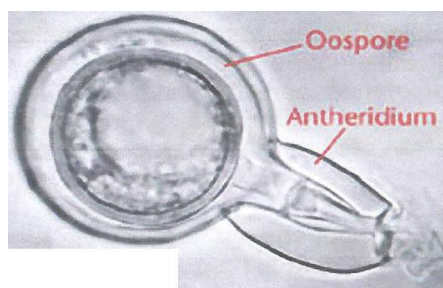


Figure .08.Cycle biologique asexué de *Phytophthora infestans* (Radtke & Rieckmann,1991).



Les sporocystes constituent l'unité de la reproduction asexuée. Ces organes sont facilement détachés des sporangiophores qui constituent un duvet blanc autour des lésions. Les sporocystes germent soit directement par émission d'un ou de plusieurs tubes germinatifs soit indirectement par production des zoospores (Harrison, 1990). Ces propagules seront à l'origine des contaminations secondaires. L'infection des tubercules se fait souvent par les zoospores de *Phytophthora infestans* qui sont facilement drainés avec l'eau d'irrigation ou les précipitations (Fig.08).

La reproduction sexuée requiert la présence simultanée de souches des deux types sexuels complémentaires (Smart *et al.*, 2000). En effet, *P. infestans* est hétérothallique et présente deux types sexuels A1 et A2 (Gallegly & Galindo, 1958., Smoot *et al.*, 1958). Après confrontation entre les gamétocystes anthéridies (males) et les oogones (femelles), les oospores sont formés. Ces dernières peuvent être formées selon trois mécanismes différents : par apomixie, auto fertilité ou par reproduction sexuée croisée, cependant l'importance relative des oospores formées par ces trois voies reste indéterminée (Christine *et al.*, 2000).



**Figure 09. Morphologie de l'oospore de *P.infestans* (Ahmed-Serir&Moussaoui,2011).**

#### **II.4. Lutte contre le mildiou de la pomme de terre :**

Plusieurs méthodes de lutte peuvent être préconisées contre le mildiou de la pomme de terre .

##### **II.4.1. Méthodes préventives et prophylactiques :**

Le meilleur moyen préconisé actuellement est d'abord de limiter au maximum les sources d'inoculum primaire en éliminant principalement les tas de déchets, et en effectuant des rotations culturales pour éviter les infections par les oospores. La prophylaxie contre cette maladie doit se raisonner sur le long terme. Il faudrait que l'ensemble des producteurs, évite de laisser pendant l'hiver, des organes contaminés susceptibles de rester vivants et de se développer au printemps suivant (Legemble, 2008).

- Pratiquer une rotation chaque 4 à 5 ans.

- Pulvériser de la bouillie bordelaise ou une autre spécialité à base de cuivre comme le manébe ou le zinébe.
- Ne traiter que si le temps se met à la pluie, si le temps pluvieux persiste, traiter en prévention tous les 10 jours.
- Si la maladie a gagné votre culture, employez des produits chimiques de synthèse.
- A la récolte, brûlez les fanes desséchées.

#### **II.4.2. Lutte chimique :**

Les traitements chimiques utilisés contre le mildiou de la pomme de terre sont des produits de contacts, des produits pénétrants dont la matière active est le cymoxanil et des produits systémiques pour lesquels le metalaxyl représente la matière active la plus importante (Staub *et al.*, 1980 ; Shwinn et Margot, 1991 ; Duvauchelle et Andrivon, 1996 ; Andrivon et Lebreton, 1997). L'utilisation des fongicides de contact, pénétrants ou systémiques, reste la principale mesure de lutte contre le mildiou de la pomme de terre. Toutefois, l'utilisation massive de fongicides systémiques a conduit à sélectionner des isolats résistants à ces matières actives, qui appartiennent principalement au groupe des phénylamides. De plus, les effets nocifs de l'emploi des pesticides sur la santé des utilisateurs et sur l'environnement amènent aujourd'hui à les utiliser d'une façon plus raisonnée. Ainsi, des systèmes de prévisions des risques ont été développés afin de rationaliser l'utilisation des traitements chimiques préventifs (Montarry, 2008).

#### **II.4.3. Lutte génétique :**

La meilleure alternative à l'utilisation des fongicides est la lutte génétique. De nombreux programmes reposant sur l'introduction de gènes de résistance ont été engagés, pour la sélection de variétés de bonne valeur agronomique et une bonne résistance au mildiou. Ces programmes se sont longtemps basés sur l'introduction de résistances spécifiques, à caractère mono génique. Actuellement, onze de ces gènes (R1-R11) ont été identifiés et introduits chez *S. tuberosum* à partir de *S. demissum*. Des gènes similaires ont également été identifiés chez d'autres espèces apparentées à *S. tuberosum*, telles que *S. bulbocastanum*, *S. berthaultii* ou *S. phureja*. Cependant, ces gènes sont très rapidement contournés par les populations parasites et ne peuvent constituer à eux seuls une méthode de lutte durable. Les sélectionneurs s'orientent vers la recherche de résistances polygéniques (Montarry, 2008).



**II.4.4. Lutte biologique :**

Au cours des deux dernières décennies, de nombreux travaux ont été menés dans le but de rechercher des méthodes de protection du rendement plus douces, respectueuses de la santé humaine et de l'environnement (Ngamo & Hance, 2007).

Avec l'avènement des techniques de biologie moléculaire et dans le cadre de la recherche des méthodes alternatives de protection des cultures, plusieurs laboratoires académiques et publics ainsi que des entreprises privées dans le monde, se sont intéressés au développement de la lutte biologique, associée souvent à l'utilisation de bio pesticides. Cependant, leur développement dont l'usage des phytopesticides, produits de la biodiversité locale, se présente aujourd'hui comme une alternative prometteuse.

Dans ce sens, différents essais ont déjà mis en évidence l'action de certains extraits végétaux et des huiles essentielles contre les agents pathogènes du mildiou de la pomme de terre (Blaeser 1999; Latten 1994; Neuhoff 2002 *in* Krebs *et al.*, 2006).

**II.5. Effet antifongique des huiles essentielles d'agrumes sur le *Phytophthora*:**

L'efficacité antibactérienne des huiles essentielles d'agrumes a été approuvée sur les Enterobacteriaceae, et les Pseudomonaceae. Voir Antifongique sur : Saccharomycetaceae type « *Saccharomyces cerevisiae* », et les Cryptococcaceae (Chemat *et al.*, 2010).

Le limonène, principal constituant de l'huile essentielle des oranges, irradié par le soleil, est toxique pour plusieurs champignons pathogènes des fruits : les *Phytophthora parasitica* et *P.citrophthora* sont les plus sensibles (Alilou *et al.*, 2009). Par ailleurs, les polyméthoxylates flavones des Citrus confèrent une résistance pour le *Phytophthora citrophthora* et *Penicillium digitatum* (Barta et Hui, 2006).

# Matériels et méthodes

## I. l'étude des huiles essentielles de trois espèces d'agrumes :

### I.1 Le choix, l'identification, et la récolte du matériel végétal :

Le matériel végétal est constitué des feuilles et fruits de trois variétés d'arbres appartenant à trois espèces différentes du genre citrus, de la famille des rutacées. Etant des agrumes d'importance économique et industrielle, appelés communément : L'oranger, le citronnier, et le bergamotier (Fig.10). Désignés par les botanistes sous les noms suivants :

\* **L'oranger** : *Citrus sinensis* Cadenera.

\* **Le citronnier** : *Citrus limon* Eureka.

\* **Le bergamotier** : *Citrus bergamia* Castagnaro (Poiteau & Risso, 1928 ; Tanaka, 1961 in Galais, 1922), ou *Citrus aurantium L ssp bergamia* Castagnaro (Swingle & Reece, 1967 in Galais, 1992).

L'identification des espèces a été effectuée par l'institut technique de l'arboriculture fruitière et de la vigne ITAF.V à l'aide de la flore et à partir des portes greffés et greffons certifiés, authentifiées pour notre travail après consultation de l'herbier de cet institut. L'objectif était d'extraire l'huile essentielle des feuilles et des écorces des fruits de chacune pour comparer leurs rendements, leurs compositions chimiques et leur action antifongique.

La récolte a été réalisée après la maturation des fruits, le 26 Janvier 2011 de 9 :30h à 11 :30h car l'heure de la récolte influe directement le rendement en huiles essentielles. On a pris dans la même matinée trois échantillons d'environ trois kg. La température était ce jour là comprise entre 6°C et 17°C avec une moyenne de précipitations de 1,8mm.



*Citrus sinensis* Cadenera



*Citrus limon* Eureka



*Citrus bergamia* Castagnaro

**Figure 10.** Les fruits récoltés des trois espèces étudiés.

## I.2 Présentation du lieu de prélèvement des échantillons d'agrumes :

Depuis ses frontières algéroises jusqu'à l'Atlas Blidéen, la Mitidja qui avait tant attiré les convoitises de la colonisation ; elle recouvre aujourd'hui une surface agricole de l'ordre de 220 000 ha (Imache *et al.*, 2010), sous des conditions caractéristiques d'une zone marécageuse et d'une terre fertile (Auzias & La bourdette, 2009).

Les échantillons ont été prélevés dans les vergers appartenant à l'institut technique de l'arboriculture fruitière et de la vigne (ITAF.V) dans la station mère sis à Boufarik. Cet institut date depuis 1927 quand il fut une ferme de démonstration s'étalant sur 16 ha, avant d'atteindre 52,5ha de superficie suite à l'acquisition de l'annexe I et l'annexe II. Actuellement, il représente une station expérimentale ne comptant que 48ha d'espèces ligneuses ; qui a pour objectif le développement de l'arboriculture fruitière et de la viticulture tout en s'appuyant sur la conservation des ressources génétiques ainsi que sur les techniques de production et la conduite des vergers.

### a) Présentation du verger :

Le verger dans lequel nos échantillons ont été prélevés est celui de l'annexe I de Bouamrous, situé à Halwya à 4 Km de Boufarik (Fig.11). Cette large vallée de la Mitidja de 23ha d'agrumes, elle est répartie en plusieurs parcelles où les espèces étudiées se localisent essentiellement dans la parcelle K1, K2 et une parcelle P dite de collection et de conservation du patrimoine génétique (voir figure 4). Les 309 variétés d'agrumes de la station sont plantées en 1974 sur un sol sablo limoneux dépourvu de calcaires, et elles bénéficient d'un hiver doux et d'un été chaud avec une température moyenne de 17,6°C selon la station météorologique de Soumaa.

### b) Les parcelles de prélèvement :

L'échantillonnage a eu lieu dans trois parcelles du verger (voir Tableau 05).

**Tableau 05** : Parcelles de prélèvement des espèces étudiées :

Arbre	Nom scientifique de la variété	Parcelle	Porte greffe
oranger	<i>Citrus sinensis Cadenera</i>	K2	Bigaradier
citronnier	<i>Citrus limon Eureka</i>	K1	Bigaradier
bergamotier	<i>Citrus bergamia Castagnarro</i>	P	/

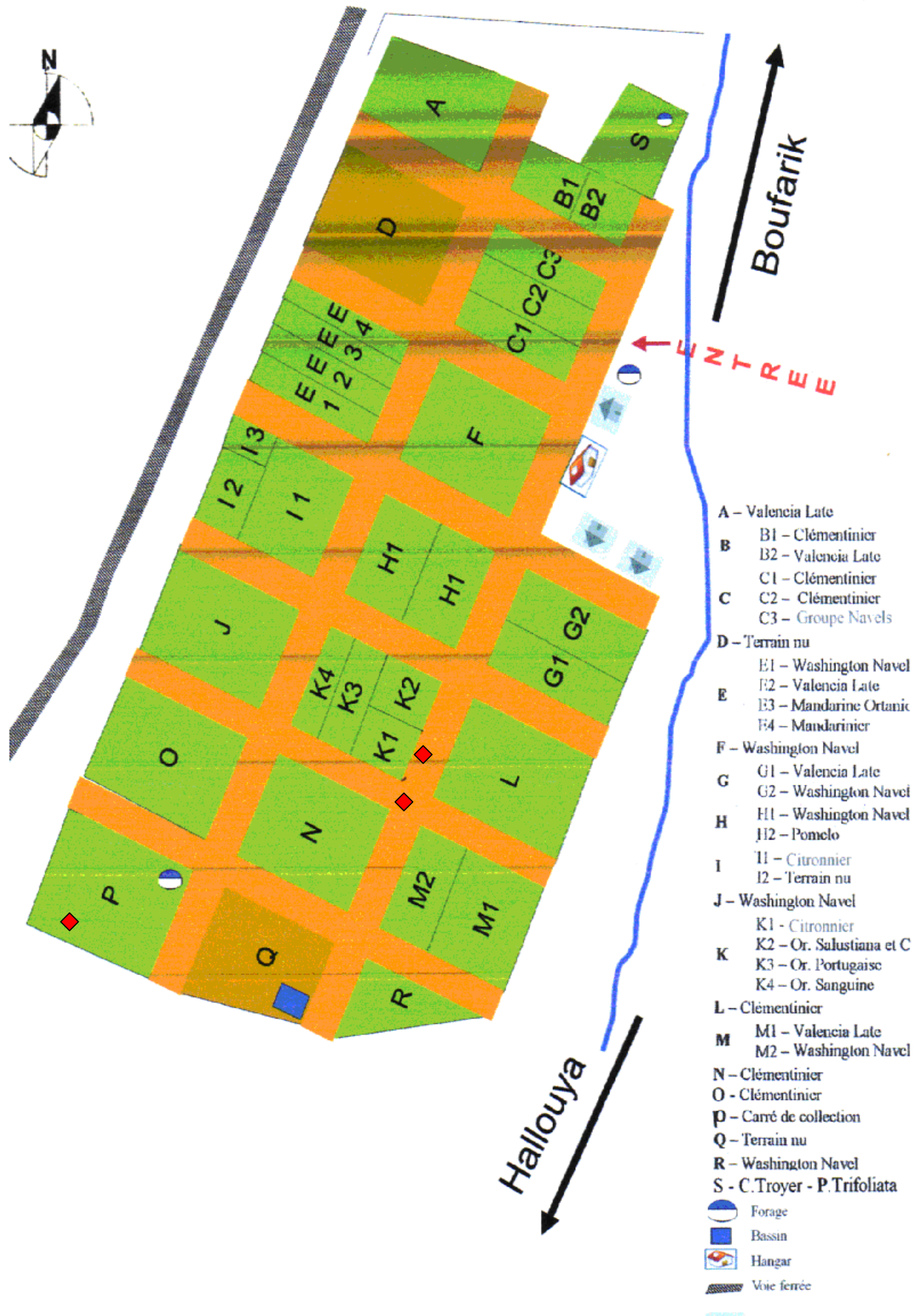


Figure 11 : Présentation de l'annexe I de Bouamrous « Halwya » (ITAF.V, 2011)

### c) Les Données climatiques du verger :

Etant donné que les conditions climatiques dans lesquels le végétal est soumis influent le rendement en huiles essentielles (Bruneton, 1993), on a pris en considération les données climatiques délivrés par l'ITAF.V lors de l'échantillonnage ; ces données ont été enregistrés à la station météorologique de Soumaa, et sont représentées dans le tableau 06.

**Tableau 06 : Données climatiques annuelles du lieu de prélèvement lors de l'échantillonnage (station météorologique de Soumaa, 2011).**

DATE	T. MOYENNE (°C)	T. MAX(°C)	T. MIN(°C)	Pluviométrie (mm)
Janv. 2010	12,08	16,04	8,20	67,2
Fév. 2010	13,78	18,23	9,02	92,1
Mar. 2010	14,11	19,39	9,23	122,8
Avril. 2010	16,08	21,59	11,02	53,3
Mai. 2010	18,51	24,47	12,80	30,8
Juin. 2010	22,9	29,53	16,61	20,9
Juil. 2010	26,80	33,82	20,39	0
Aout. 2010	26,28	32,82	20,48	35,8
Sep.10	23,44	29,43	18,2	5,5
Oct. 2010	19,47	25,25	14,64	80,2
Nov. 2010	14,75	18,79	11,33	122,8
Déc. 2010	12,41	17,70	7,93	74,1
Janv. 2011	11,11	15,94	7,20	92,4

### I.3 Préparation du matériel végétale :

#### a) Analyse du matériel végétale :

Avant le séchage du végétale, on a effectué une étude biométrique du fruit et feuilles des trois espèces. Nous avons mesuré donc : le poids, la longueur et la largeur des feuilles d'une part. Et l'épaisseur de l'écorce, le poids, le diamètre, et la hauteur du fruit d'une autre. Les

feuilles ont été éparpillé sur un morceau de journal pour dessécher, quant aux fruits, on les a épluché, retenu uniquement les écorces qu'on a coupé en de petits morceaux de 1 cm<sup>2</sup> de surface, éparpillés pour dessécher aussi à l'ombre et à l'air libre. Après le séchage, les écorces et les feuilles ont été broyés jusqu'à obtenir une poudre (Fig.12).



**Figure 12.** La poudre des écorces et feuilles des trois espèces étudiés.

**b) Détermination de la matière sèche :**

Pour connaître le taux de la matière sèche contenue dans les feuilles et les écorces, on a appliqué la méthode rapporté par Lindon et Lorient (1994) constituée de 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.

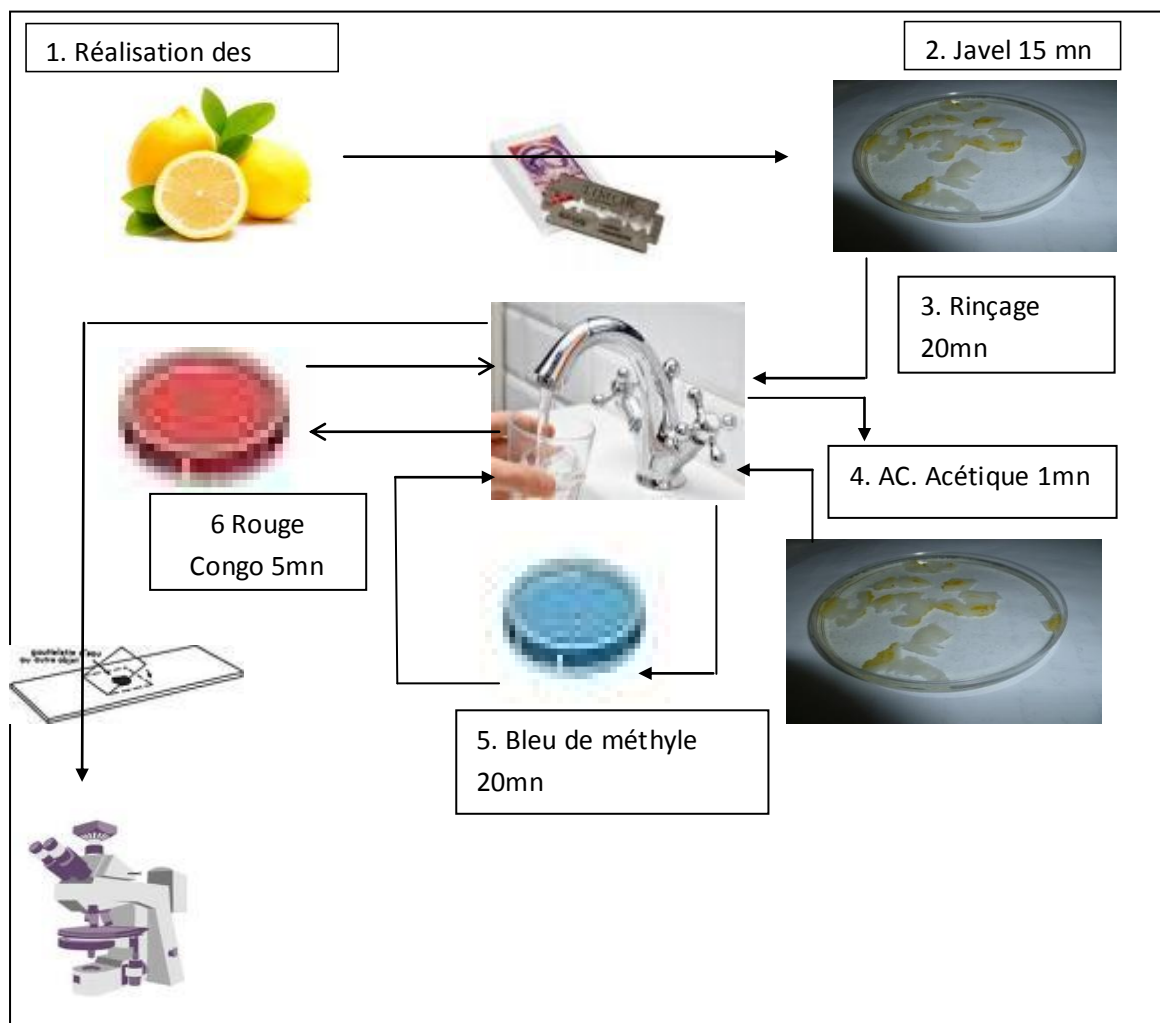
**PF** : poids frais.

On a mis 50g de poudre de l'écorce et des feuilles des trois espèces ; dans l'étuve à 105°C pendant 24h, on a retiré cette poudre pour la mettre dans le dessiccateur afin d'éliminer l'humidité, puis mesurer la quantité d'eau qu'a perdu cette unité.

#### I.4 Réalisation de coupes histologiques sur les écorces d'agrumes :

Afin de connaître la structure histologique responsable de la sécrétion des huiles essentielles, des coupes transversales des péricarpes des fruits ont été colorées selon la technique de double coloration (bleu de méthyle et rouge Congo) utilisée par (Boukhatem 2010 ; Madjene et Madani 2010). Cette technique comprend les étapes suivantes (fig.13) :

- \* 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.







**Figure 13.** La coloration des coupes selon la technique de double coloration (Madjene, 2010).

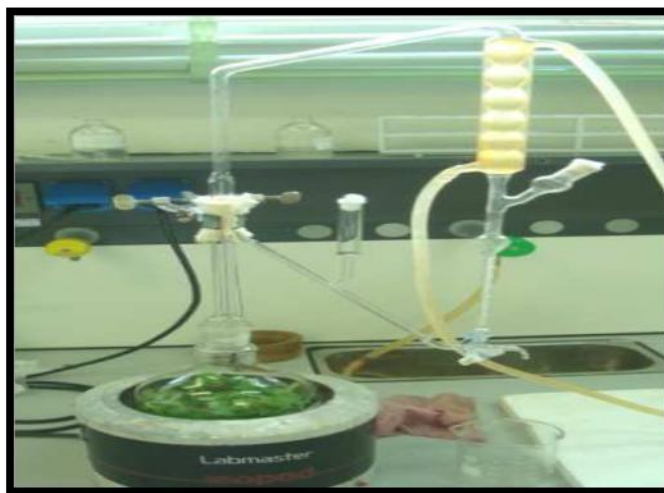
### **I.5 Extraction des huiles essentielles :**

On a utilisé deux procédés d'extraction différents pour obtenir les huiles essentielles d'écorces et de feuilles des trois espaces, ces procédés sont : l'hydro distillation et l'extraction par solvant organique volatil.

#### **I.5.1 Extraction par hydro distillation :**

##### **Principe :**

L'hydro distillation par un appareil de type *Clevenger* (Fig.14), consiste à laisser baigner directement le végétal dans une enceinte (un ballon) d'eau, à qui les vapeurs après chauffage à ébullition entraînent au fur et à mesure des particules légères qui se condensent sur les parois plus froides (réfrigérant) du serpentín, ainsi ces essences seront récupérés par décantation à partir d'un récipient gradué relié à cet enceinte car celui-là comporte à la fois de l'eau, et de l'huile essentielle qu'il faut séparer.



**Figure 14.** Montage de l'hydro distillation (Boukhatem et *al.*, 2010).

Dans ce travail, l'extraction a été réalisée sur 50g de poudre d'écorces et de feuilles de chaque espèce ; qu'on a versé dans un ballon contenant 500ml d'eau distillée, et qu'on a laissé bouillir durant 3 heures.

### **I.5.2 Extraction par solvant organique :**

#### **Principe :**

Cette technique rapporté in Biallo *et al.* (2004) repose sur l'interaction entre le solvant choisit, et le végétal qu'on laisse reposer dedans le temps nécessaire pour que les particules cibles quittent le végétale et diffusent à travers les parois cellulaires pour gagner le solvant, ce dernier sera récupéré en grande partie par évaporation rotative grâce au rota vapeur ; avec une température et des rotations appropriées selon la volatilité du solvant. Dans notre étude, on a laissé reposer 50g de poudre du végétal dans un Erlen contenant 200ml de solvant durant 48 heures. Le solvant utilisé est l'Ether de pétrole et vue que celui là demeure très volatil on a réglé le rota vapeur à 60 rotations.

Les huiles essentielles obtenues ont été versées dans un récipient permettant de la retirer et d'en déterminer le volume à l'aide d'une seringue graduée.

### **I.6 Evaluation du rendement en huile essentielles :**

Après avoir noté la quantité des huiles essentielles lues dans les graduations millimétriques de l'appareille utilisé pour l'hydro distillation, ou après avoir mesuré par des seringues le volume d'huiles essentielles obtenues après l'évaporation de l'Ether de pétrole ; le rendement en huile essentielles a été calculé par la formule suivante :

$$R = (V/M) \times 100$$

**R** : production d'huile essentielle en ml par apport à 100g de matière sèche.

**V** : Volume d'huile essentielle en ml.

**M** : poids de la matière végétal exprimé par apport à la matière sèche.

### **I.7 caractérisation physicochimique des huiles essentielles :**

#### **I.7.1 propriétés organoleptiques et physiques:**

On a fait une comparaison entre les huiles essentielles des trois espèces, entre les huiles essentielles des feuilles et des écorces, et entre celles obtenues par hydro distillation et par solvant. En s'intéressant à : la couleur, l'odeur, la saveur, l'état et l'aspect.

### I.7.2 Mesure de l'indice de réfraction :

L'indice de réfraction des huiles essentielles est généralement élevé, supérieur à celui de l'eau, ceci indique leur richesse en composants déviants la lumière polarisé (AFNOR, 2000).

Le réfractomètre de table qu'on a utilisé nous a permis de lire l'indice de réfraction après avoir vérifié l'alignement central de la zone claire à la zone sombre dans l'oculaire droit, puis en lisant deux chiffres et compter les graduations en dessous puis en dessus de la règle dans l'oculaire gauche.

L'indice de réfraction des huiles d'agrumes a été déterminé à l'aide d'un réfractomètre à la température de l'ambient (26°C).

L'indice de réfraction  $\eta_D^{20}$ , à la température de référence selon Abouda (2007), est donné par la formule suivante :

$$\eta_D^t = \eta_D^{t'} + 0,0004 (t'-t)$$

- $\eta_D^t$  : l'indice de réfraction de l'huile essentielle.
- $\eta_D^{t'}$  : est la valeur de la lecture, obtenue à la température  $t'$ .
- $t'$  : la température à la quelle a été effectuée la détermination.
- $t$  : la température de référence ( $t=20$  °C).

### I.7.3 Mesure de la densité :

La densité relative d'une huile essentielle est le rapport entre la masse d'un certain volume d'huile à 20°C et la masse d'un même volume d'eau distillé à 20°C (AFNOR, 2000) ; évalué à l'aide d'un pycnomètre et déduite par la formule suivante rapporté *in* Abouda (2007) :

$$d_{20}^{20} = \frac{m_2 - m_0}{m_1 - m_0}$$

\*  $d_{20}^{20}$  : La densité à 20°C.

\*  $m_0$  : la masse en gramme du pycnomètre vide.

\*  $m_1$  : la masse du pycnomètre remplie d'eau.

\*  $m_2$  : la masse du pycnomètre remplie d'huile essentielle.

### **I.8 Analyse chimique par chromatographie phase gazeuse CPG:**

La chromatographie en phase gazeuse s'applique à des échantillons gazeux ou susceptibles de s'évaporer sans aucune dégradation à l'intérieur de l'injecteur (Tranchant, 1983).

La phase mobile est alors un gaz tels que l'hélium, azote, argon ou hydrogène appelé gaz vecteur qui traverse la colonne. La colonne contenant la phase stationnaire, est un tube enroulé ; placé dans un four thermostaté. Selon la méthode rapportée par Boutouchent et Bouguettaf (2010), les conditions opératoires sont les suivantes :

Type de chromatographie : chromatographie Chrompack CPGool.

La colonne capillaire : S.E30 (30m de long et 0,32 de diamètre interne).

Détecteur : flamme (aire+hydrogène).

Température de la colonne : 75°C (pendant 8 minutes) jusqu'à 225°C (4°C/minutes).

Température de l'injecteur : 250°C.

Température du détecteur : 250°C.

Volume d'injection : 0,1 microlitres.

Débit du gaz vecteur : 2ml/minute.

Gaz vecteur : azote.

Vitesse du papier : 0,1 cm/minute.

Sensibilité 1400.

Pression : 5KPa

Longueur d'onde : 260nm.

- On réalise un chromatogramme de référence à un étalon du limonène dilué par le n-hexane pour présenter un pic dominant du limonène. Et injecter des échantillons dilués dans 0,4ml de n-hexane.
- D'autres composés outre le limonène seront déduits par comparaison des temps de rétention des molécules par apports aux résultats des travaux précédents sur les huiles essentielles des trois espèces, et dans les mêmes conditions opératoires.

## **II. Etude du pouvoir antifongique *in vitro* et *in vivo* des huiles essentielles d'agrumes extraites à l'égard de *Phytophthora infestans*:**

Parmi les problèmes phytosanitaires des cultures, le mildiou ou brûlure tardive causée par *Phytophthora infestans*, est considéré comme une majeure contrainte qui menace la croissance et la production de la pomme de terre en Algérie (Alim., 2010).

La lutte chimique contre ce redoutable pathogène 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.

Ainsi, dans le cadre de recherche de méthodes alternatives de lutte biologique contre cette maladie, notre travail représente une première approche dans cette originalité. Il consiste à étudier le pouvoir antifongique *in vitro* et *in vivo* des huiles essentielles d'agrumes extraites à l'égard de deux isolats Algériens A1 et 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.

### **. II.1 Matériel végétal :**

Le matériel végétal utilisé pour cette expérimentation est représenté par les extraits d'huiles essentielles obtenues précédemment de trois espèces d'agrumes : *C.sinensis* Cadenera, *C.limon* Eureka, et *C.bergamia* Castagnaro qui ont servi *in vitro* pour la préparation d'une gamme de solutions à différentes dilutions : 1/100, 1/10, et pure.

*In vivo*, des feuilles détachées saines de la variété *Spunta* de la pomme de terre ont fait l'objet d'étude du pouvoir antifongique des huiles essentielles utilisés et la survie des isolats déjà traités par ces extraits (Fig.16 ; Fig.17).

## II.2 Matériel fongique :

Deux isolats fongiques purifiés de *Phytophthora infestans* ; sujets de traitement par trois huiles essentielles d'agrumes à des fins inhibitrices, ont été prélevés de la collection des isolats algériens des zones de production de la pomme de terre qui ont déjà fait déjà l'objet de deux mémoires de fin d'études (Ahmed serrir & Moussaoui ,2011 ; Saadoune,2011). L'un isolé de la région de Bourkika et l'autre de la région de Bouira ont été entretenus par repiquage sur milieu à base de petits pois agar (composition voir annexe) et incubés à 18°C pendant 20 jours (Hammi, 2003).

## II.3 Etude du pouvoir antifongique *in vitro* :

Le pouvoir antifongique *in vitro* a été basé sur l'inhibition de la croissance mycélienne des deux isolats de *P.infestans* et réalisé suivant la méthode de contact directe décrite par Mishra & Dubey (1994) sur milieu PPA maintenu en surfusion à 45 °C, Les procédures microbiologiques, et Les concentrations minimales inhibitrices (CMI) des huiles essentielles ont été déterminées selon la méthode rapportée par Remmal *et al.* (1993), et Satrani *et al.* (2001) in El Ajjouri *et al.* (2008).

On prépare des émulsions diluées de l'eau agar avec de l'huile essentielle, en mesurant à chaque fois et respectivement à l'aide d'une micropipette 100 microlitre d'huiles essentielles de chaque espèce contre 10ml d'eau agar, puis 100 microlitre d'huiles essentielles contre 100ml d'eau Agar, pour retenir les dilutions suivantes : 1/10 et 1/100 ml. Chaque dilution sera répétée quatre fois sur chacune des souches de champignons étudiées. En outre, de l'huile essentielles pure des trois espèces sera aussi appliquée sur chaque souche et répétée trois fois.

Pour chaque dilution, on ajoute à 13,5 ml du milieu PPA pour se solidifier sur environ 1,5 ml de l'émulsion Eau Agar-huile essentielle préalablement déposée au milieu des boîtes Pétri. Les boîtes sont légèrement agitées pour homogénéiser le milieu. D'autre part, des témoins correspondent au repiquage des isolats fongiques A1 et A2 sur milieu PPA frais.

Ainsi, à l'aide de pipettes Pasteur stériles, un disque d'inoculum de chaque isolat est prélevé séparément puis, déposé au centre des boîtes de pétri. Ces dernières seront bien fermées et

entourées d'un para film. , L'incubation des boites ainsi préparées se fait dans l'étuve réglée à la température de 20°C pendant 7 jours pour évaluer la croissance.



**Figure 15 : Repiquage des isolats fongiques sur milieu PPA .**

Durant l'incubation, on mesure quotidiennement le diamètre des isolats fongiques traités par les huiles en celui des témoins afin de déterminer le taux d'inhibition de chaque huile testée selon la formule de Pandey *et al.* (1982). suivante :

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

- 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).

### **II.3.1 Morphologie des isolats de *P.infestans* traités et témoins :**

Pour comprendre et pouvoir définir l'effet des huiles essentielles sur les isolats fongiques. Une description structurale a été réalisée après 7 jours d'incubation, par observation directe des cultures traitées et témoins des isolats A1 et A2 de *P.infestans* sous microscope photonique au grossissement (X100).

### **II.3.2 Sporulation :**

Après incubation de 15 jours de croissance les isolats fongiques développés sur milieux traités et témoins à la température de 20°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 des isolats

A1 et A2 traités par les différents huiles et à différentes dilutions ainsi que ceux 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 huile d'agrumes 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).

### **II.3.3 Survie des isolats de *P.infestans* :**

Afin de confirmer l'effet fongistatique ou fongicide des huiles essentielles d'agrumes testés, on s'est basé sur la technique modifiée de Mahanta *et al.* (2007).

Pour cela, les extraits de plantes ayant montré une inhibition remarquable sur la croissance mycélienne des deux isolats de *P.infestans* ont été pris en considération. Ainsi, ce test repose sur la reprise ou non de la croissance mycélienne de l'isolat inhibé par l'huile essentielle, après ré-inoculation des explants sur milieu PPA frais dans les mêmes conditions d'incubation précédentes. L'observation a été suivie quotidiennement et prolongée jusqu'à 20 jours (Haddouchi & Benmansour.,2008). Dans les boîtes où il n'y a pas eu de germination, le fragment du champignon a été repiqué dans un autre milieu pour contrôler sa survie.

### **II.4 Pouvoir antifongique des huiles essentielles d'agrumes *in vivo* :**

Le pouvoir antifongique *in vivo* consiste à l'inoculation des feuilles détachées traitées par trempage dans les différentes huiles à différentes concentrations et les feuilles témoins par les isolats A1 et A2 de *P.infestans* .En parallèle, les isolats inhibés *in vitro* par les huiles à différentes concentrations ont été préparées en suspensions sporangiales comme précédemment et utilisées pour les tests de phytopathogénéicité sur les feuilles détachées témoins. En effet, cette activité antifongique comporte les étapes suivantes :

#### **II.4.1 Récolte des feuilles de pomme de terre :**



Sur une petite parcelle expérimentale de la station régionale de l'INPV de Boufarik, des feuilles saines de pomme de terre de la variété *Spunta* cultivée dans le cadre de la recherche pour une étude sur le mildiou de la pomme de terre ont été récoltées.

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 (Fig.17).



**Figure 16 : Champ de récolte des feuilles de la variété *Spunta* de pomme de terre à tester.**



**Figure 17 : Les feuilles préparées pour le traitement.**

#### **II.4.2 Préparation d'inoculum à partir des isolats A1 et A2 :**

Des suspensions sporangiales ont été préparées à partir des cultures pures des deux isolats A1 et A2 de *P. infestans* âgées de trois semaines. Ce qui consiste à racler la culture en présence de 15 ml d'eau distillée stérile puis récupérer chaque suspension dans un tube à essai stérile soumis à l'agitation, puis à l'aide de la cellule de malassez, la sporulation est déterminée pour chaque isolat traité ou témoin. Les suspensions ainsi préparées ont été ajustées par de l'eau distillée stérile à une concentration de l'ordre de  $3 \times 10^5$  sporanges/ml. Dans un second lieu, les isolats développés *in vitro* sur milieux traités par les huiles essentielles d'agrumes ont aussi été mis en suspension pour vérifier leur survie *in vivo* sur les feuilles détachées.

#### II.4.3 Inoculation des feuilles détachées :

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 détachées et découpées en rond de pomme de terre ont été placées en nombre de 5 par boite.

#### II.4.4 Trempage dans les huiles et inoculation du champignon :

Les disques foliaires de chaque boite sont soumis au trempage dans les huiles essentielles d'agrumes à différentes concentrations 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 5 µl des suspensions sporangiales de l'ordre de  $3 \times 10^5$  sporanges/ml des isolats A1 et A2. En , outre une boite a été consacrée aux témoins négatifs inoculés par de l'eau distillée stérile, et une autre boite consacrée aux témoins positifs inoculés par les isolats fongiques non traités. Parallèlement les suspensions sporangiales préparées à partir de l'activité antifongique *in vitro* ont été inoculées comme précédemment à raison de cinq disques foliaires par traitement. La lecture des résultats a porté sur l'expression des symptômes en termes de pourcentage de superficie infectée par le mildiou de la pomme de terre. Ainsi, ont été déterminés les % d'inhibition d'expressions des symptômes selon la formule suivante :

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

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

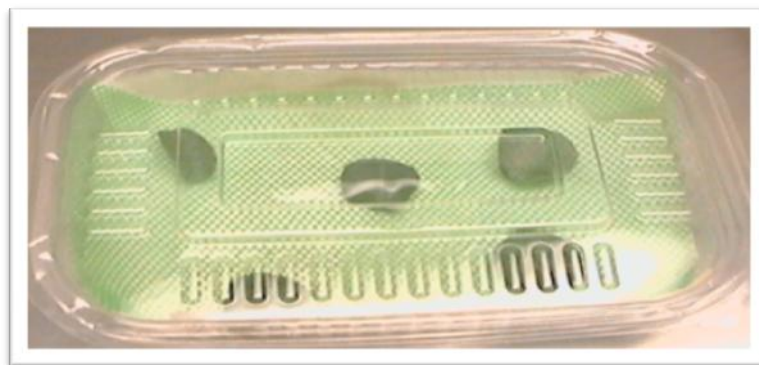


Figure 18 : Préparation du milieu pour le traitement.

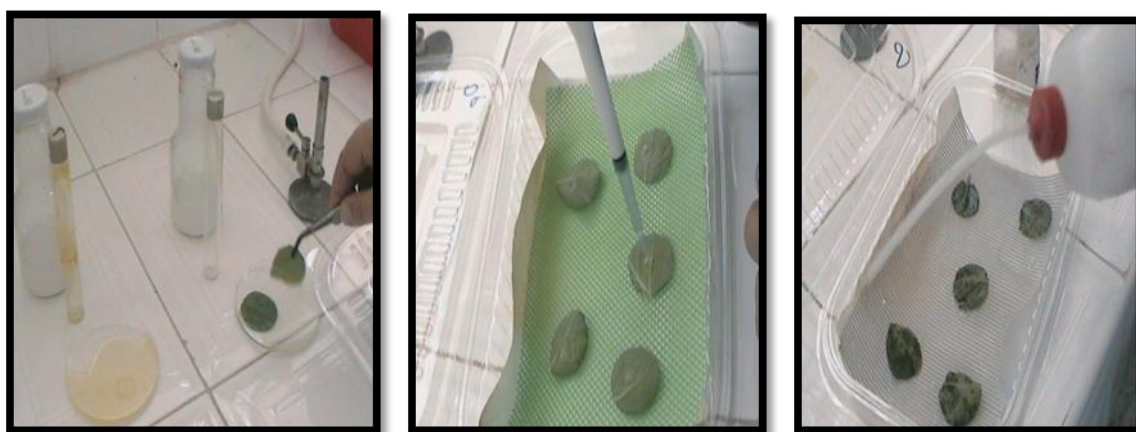


Figure 19 : Trempage dans les huiles essentielles et inoculation des isolats de *P.infestans*.

## II.5 Analyse statistique :

L'activité antifongique des huiles essentielles d'agrumes 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 quatre 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 des souches fongiques testées et la comparaison entre les trois huiles essentielles tout en considérant les dilutions, et les isolats fongiques, 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  $P < 0.05$ .

Les corrélations existantes entre les différents extraits et leurs dilutions ainsi que les isolats de *P.infestans* sont mises en évidence par une analyse en composantes principales AFC et CAH.

Pour ce type de test, les différents extraits et leurs dilutions ont des coordonnées comprises entre -1 et +1 et appartiennent à un cercle de corrélation. L'interprétation de l'AFC se fait à partir de l'examen du cercle de corrélation et de la position du statut des variables sur les axes factoriels (Philippeau, 1989).

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

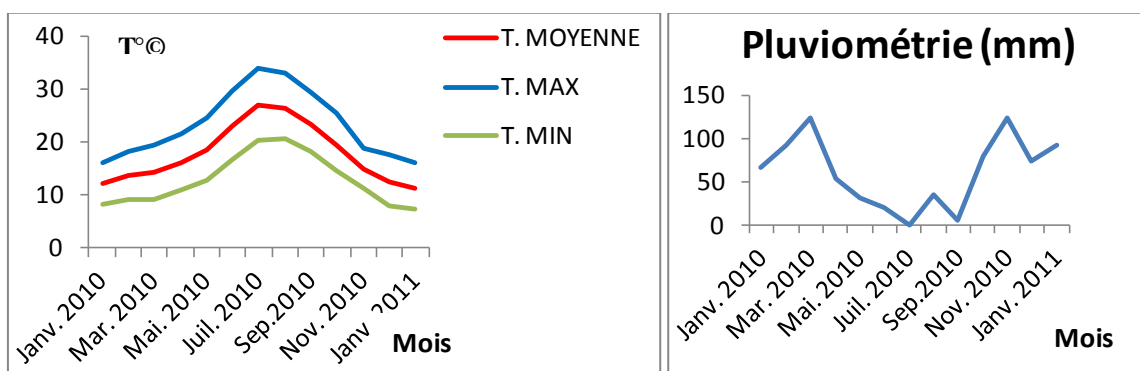
# Résultats et discussions

## I. L'extraction, l'identification, et la caractérisation des huiles essentielles des trois espèces d'agrumes :

### I.1 Analyse des conditions climatiques :

Parmi les facteurs de variabilité des huiles essentielles, on trouve le climat auquel est exposé le végétal ; un paramètre qui influe son rendement en huile essentielles et sa teneur en eau en influençant son métabolisme. Cette influence peut se répercuter à la fois sur la qualité et la quantité des huiles essentielles (Bruneton, 1993 ; et Bruneton, 1999).

Selon les données délivrés par la station météorologique de Soumaa ; les conditions climatiques auxquels étaient soumis les arbres faisant l'objet de notre échantillonnage une année avant la récolte (Tableau05) révèlent que nos échantillons bénéficiaient d'une période hivernale douce par ses températures peu élevées avec des moyennes allant de 11,11°C à 13,18°C, ainsi que par ses précipitations et sa pluviométrie jusqu'à 122,8mm par mois soit une moyenne de 5 jours par mois. Ces conditions rependent alors aux exigences climatiques définies dans la bibliographie, et semblent adéquates pour la croissance des feuilles, l'épanouissement des fleurs et donc à la nouaison et à l'apparition des fruits fiables à l'extraction des huiles essentielles qu'ils doivent contenir.



**Figure 20:** Histogrammes représentatifs des températures et pluviométrie annuels de la zone de récolte.

### I.2 Etude des paramètres biométriques des fruits et feuilles utilisés à l'extraction :

Pour avoir des informations sur la qualité des échantillons prélevés et pour comprendre l'influence de ces paramètres sur le rendement en huiles essentielles, une étude biométrique (voir tableau 07) nous a permis d'enregistrer qu'il sera admis que les fruits récoltés sont de petits à moyen fruits charnus pesants plus de 100g pour l'unité, de moyen calibre de l'ordre de

4 à 6 cm. Quant aux feuilles elles sont longues à diamètre et poids considérable, chose qui indique leur bon développement.

**Tableau 07 : Etude biométriques des trois espèces étudiées.**

<b>Esp</b>	<b>Organe</b>	<b>Écha</b>	<b>Longue ur (cm)</b>	<b>Diamètre (cm)</b>	<b>Epaisseurs d'écorces (cm)</b>	<b>Poids (g)</b>
<i>Citrus Sinensis Cadenera</i>	Feuilles	E1	7,2	3	/	0,47
		E2	8,6	3,20	/	0,41
		E3	6,8	2,4	/	0,45
		<b>M</b>	<b>7,53</b>	<b>2,86</b>	/	
	Fruit	E1	5,1	3,5	0,48	107,75
		E2	6,3	5,2	0,4	102,95
		E3	6,00	4,4	0,38	182,02
		<b>M</b>	<b>5,8</b>	<b>4,36</b>	<b>0,42</b>	
<i>Citrus Limon Eureka</i>	Feuilles	E1	5,8	2,2	/	0,46
		E2	6,2	3,2	/	0,50
		E3	7,8	3,2	/	0,48
		<b>M</b>	<b>6,6</b>	<b>2,8</b>		
	Fruit	E1	7	5,4	0,62	136,48
		E2	6,5	5	0,8	135,87
		E3	8,4	6,2	0,6	136,26
		<b>M</b>	<b>7,3</b>	<b>5,53</b>	<b>0,67</b>	
<i>Citrus Bergamia Castagnaro</i>	Feuilles	E1	8,2	3,00	/	0,38
		E2	7,9	2,8	/	0,37
		E3	8,5	3,8	/	0,40
		<b>M</b>	<b>8,2</b>	<b>3,2</b>		
	Fruit	E1	6,6	5,1	0,56	132,6
		E2	7,1	6,8	0,5	130,1
		E3	6,8	5,8	0,58	138,00
		<b>M</b>	<b>6,83</b>	<b>5,9</b>	<b>0,54</b>	

### I.3 Détermination de la matière sèche :

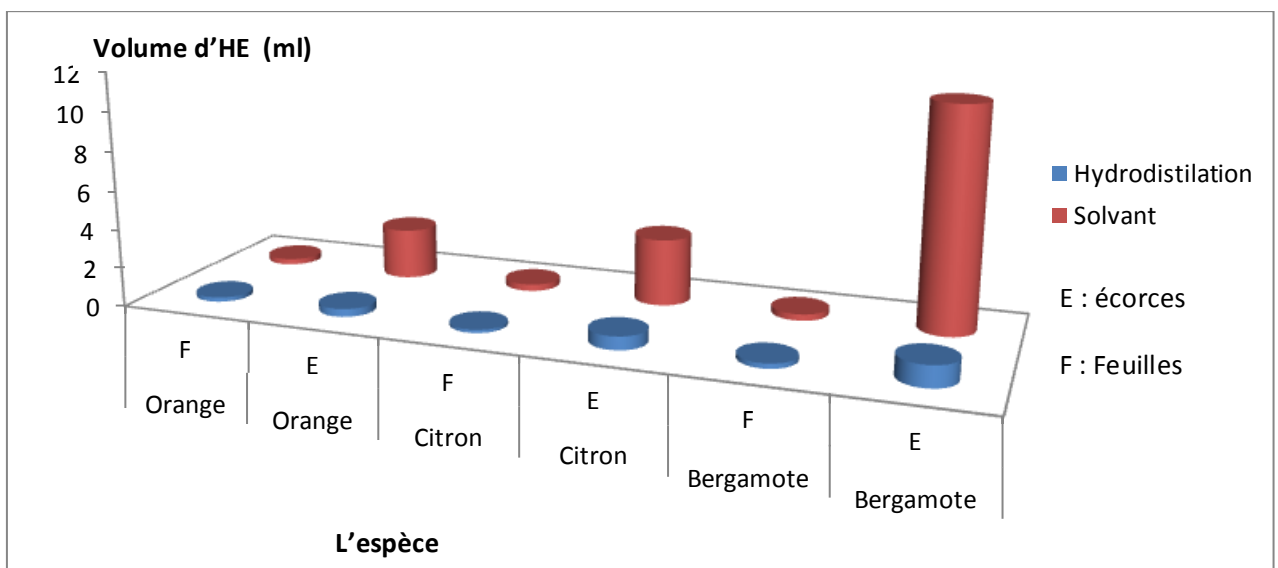
Les résultats obtenus dans l'évaluation du taux de la matière sèche, et donc de la proportion d'eau contenue dans la poudre des écorces et feuilles des trois espèces sont représentés dans le tableau 08. Ces résultats nous laissent suggérer que dans tous les cas étudiés, les écorces sont plus charnues que les feuilles. En outre le taux de matière sèche varie d'une espèce à l'autre d'où il est le plus élevé dans les feuilles de bergamote avec une valeur de 78,9% et les écorces d'orange à 48,6% (Tableau 08).

**Tableau 08 :** Taux de matière sèche des trois espèces séchées à l'étuve en (g).

Nom commun de l'espèce	Partie utilisée	Poids frais de la poudre (g)	Poids après 24h dans l'étuve à 105°C (g)	Taux de matière sèche (%)
Oranger	Feuilles	50	29,9	59,8
	Ecorces	50	24,3	48,6
Citronnier	Feuilles	50	36,05	72,1
	Ecorces	50	23,85	47,7
Bergamotier	Feuilles	50	39,45	78,9
	Ecorces	50	21,55	43,1

#### I.4 Production des huiles essentielles :

On remarque que l'obtention par solvant nous donne jusqu'à 12,50ml d'huile de bergamote, à 5,09ml d'huile de citron, et à 3 ml d'huile d'orange ; une quantité plus importante que par l'hydro distillation estimé jusqu'à 1,5ml d'huile de bergamote, à près de 1ml pour l'huile de citron et à 0,41ml pour celle de l'orange, ainsi les écorces en contiennent nettement plus D'essences que les feuilles selon le tableau 09. En outre, la bergamote s'avère la plus riche en huiles essentielles en termes d'espèces utilisées pour l'extraction.



**Figure 21: Volume des huiles essentielles d'écorces et de feuilles obtenues en moyenne des trois espèces d'agrumes en (ml).**



**Tableau 09 : Rendements des huiles essentielles d'agrumes sur 100g de MS de poudre**

<b>Esp</b>	<b>Partie</b>	<b>Echa</b>	<b>Rendement d'huile en (%) obtenu par hydro distillation</b>	<b>Rendement d'huile en (%) obtenu par extraction par solvant</b>
<i>Citrus Sinensis Cadenera</i>	Feuilles	E1	0,16	0,50
		E2	0,63	0,46
		E3	0,30	0,51
		<b>M</b>	<b>0,36</b>	<b>0,49</b>
	Ecorces	E1	0,86	6,17
		E2	0,82	4,52
		E3	0,82	5,34
		<b>M</b>	<b>0,83</b>	<b>5,34</b>
<i>Citrus Limon Eureka</i>	Feuilles	E1	0,41	0,66
		E2	0,13	0,27
		E3	0,11	0,48
		<b>M</b>	<b>0,22</b>	<b>0,47</b>
	Ecorces	E1	1,25	10,48
		E2	0,94	10,06
		E3	2,09	10,69
		<b>M</b>	<b>1,43</b>	<b>10,41</b>
<i>Citrus Bergamia Castagnaro</i>	Feuilles	E1	0,45	0,48
		E2	0,26	0,36
		E3	0,22	0,43
		<b>M</b>	<b>0,31</b>	<b>0,42</b>
	Ecorces	E1	3,48	29,00
		E2	2,08	23,20
		E3	1,99	25,75
		<b>M</b>	<b>2,52</b>	<b>25,98</b>

On remarque que les huiles essentielles obtenues ne représentent qu'une petite fraction qu'on récupère sur 100g de matière sèche de la poudre utilisée pour l'extraction par hydro distillation, On outre ce rendement est proportionnel aux volumes cueillis voir plus important

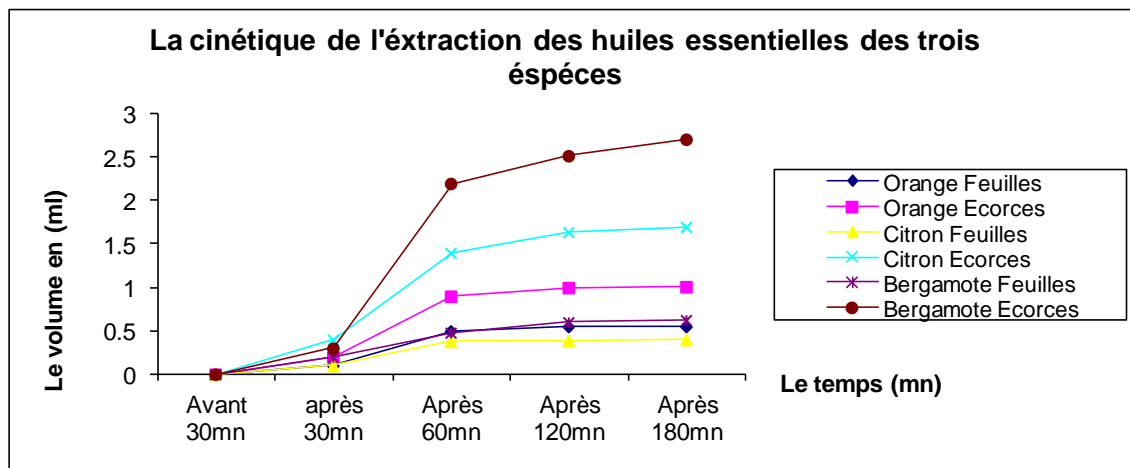
lorsqu'il s'agit de l'obtention par solvant ou à partir des écorces ; et jusqu'à 25,98% en moyenne d'huile essentielle de bergamote.

**I.5 L'influence du temps d'extraction sur le rendement en huiles essentielles :**

Durant l'hydro distillation, on a enregistré en moyenne l'évolution du volume des extraits sur les trois heures d'extractions (Tableau 10).

**Tableau 10 : L'évolution de La moyenne des volumes récupérés avec le temps sur les trois heures d'extraction par hydro distillation :**

		Le volume de l'huile essentielle obtenue en (ml)			
Espèce	Partie	après 30mn	Après 60mn	Après 120mn	Après 180mn
<b>Orange</b>	Feuilles	0,1	0,5	0,55	0,55
	Ecorces	0,2	0,9	1	1,01
<b>Citron</b>	Feuilles	0,1	0,38	0,39	0,4
	Ecorces	0,4	1,4	1,64	1,7
<b>Bergamote</b>	Feuilles	0,2	0,48	0,6	0,625
	Ecorces	0,3	2,2	2,52	2,71



**Figure 22 : l'influence du temps d'extractions sur le volume des huiles essentielles obtenues.**

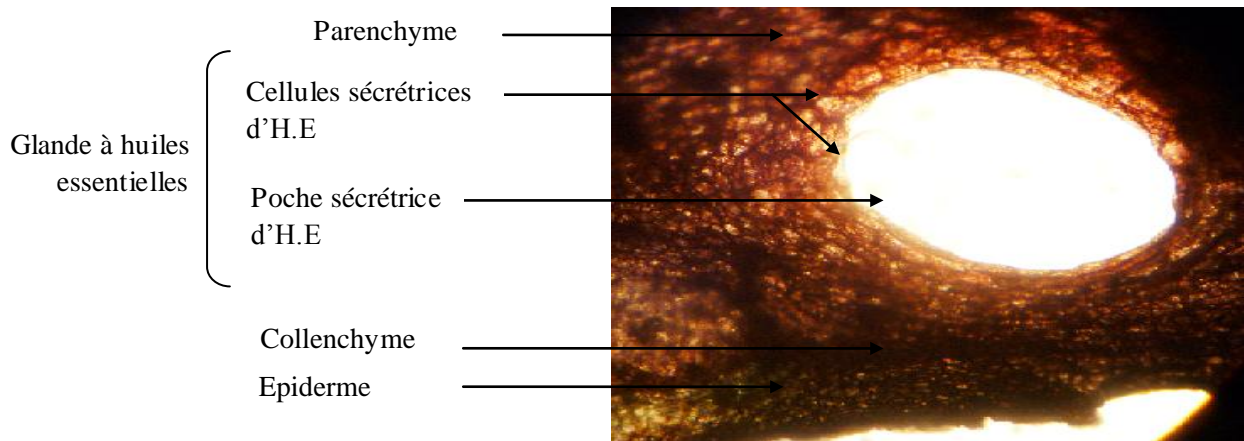
On remarque que sur les trois heures nécessaires pour cueillir le maximum d'huiles essentielles, l'évaporation des essences volatiles et leur condensation en huile commence à partir de 30mn d'extraction, alors qu'elle évolue en grande partie dans la demi-heure qui suit (après 1 heure d'extraction), pour s'améliorer légèrement jusqu'à se stabiliser durant la 2ème et 3ème heure.

## I.6 Etude histologique des écorces d'agrumes:

### I.6.1 Structure du péricarpe de l'orange :

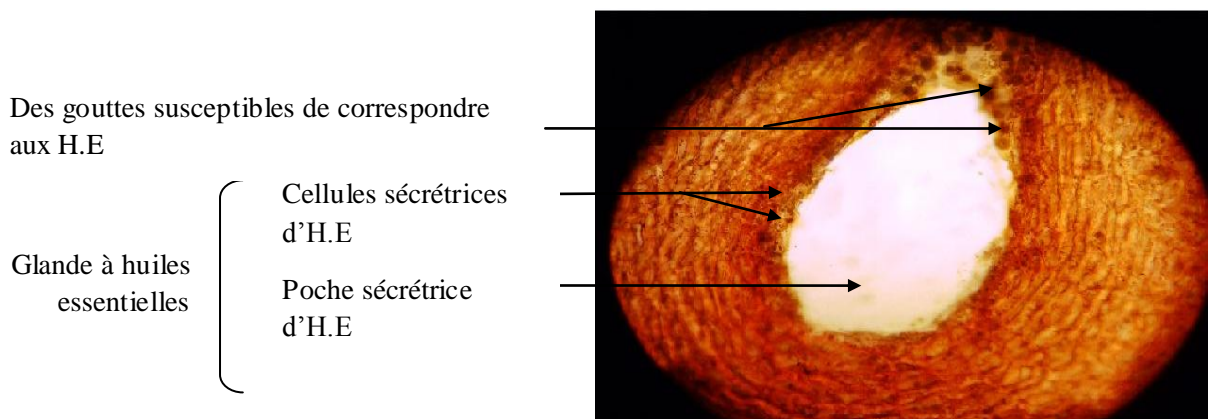
La coupe transversale du péricarpe du fruit du *Citrus sinensis Cadenera* (ig.23) montre de l'extérieur vers l'intérieur ce qui suit :

- Un épiderme cutinisé, et un collenchyme qui n'apparaît pas très bien.
- Glande sécrétrice : Poche sécrétrice entourée d'assises de cellules aussi dites sécrétrices.
- Parenchyme.



**Figure 23 : coupe transversale du péricarpe de l'orange montrant le flavedo observé au microscope photonique G : 100X.**

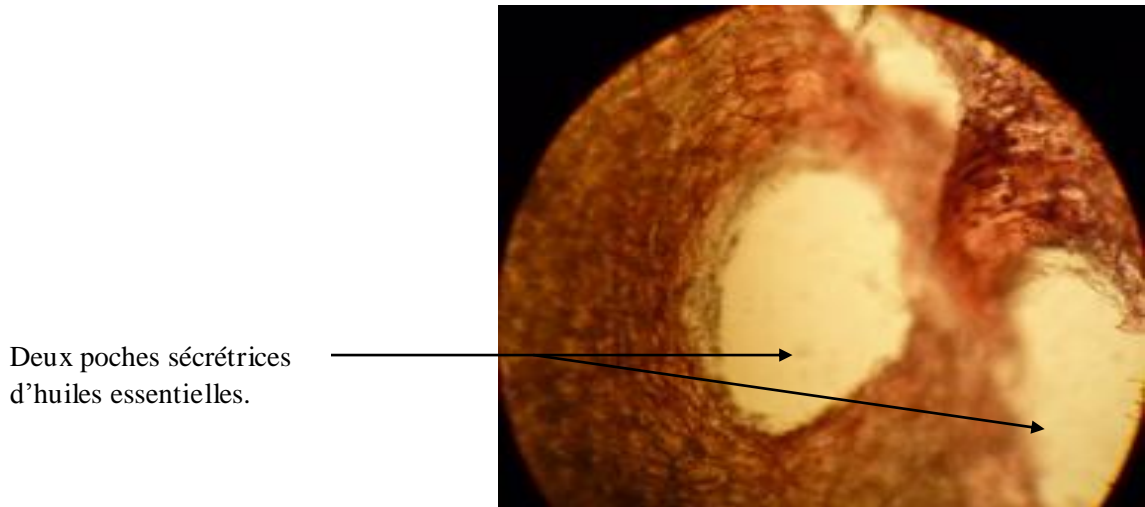
Au même grossissement, on peut distinguer les cellules sécrétrices autour de la poche à essence qui constituent la glande à huiles essentielles (Fig.24).



**Figure 24: coupe transversale du péricarpe de l'orange montrant le flavedo observé au microscope photonique G : 100X**

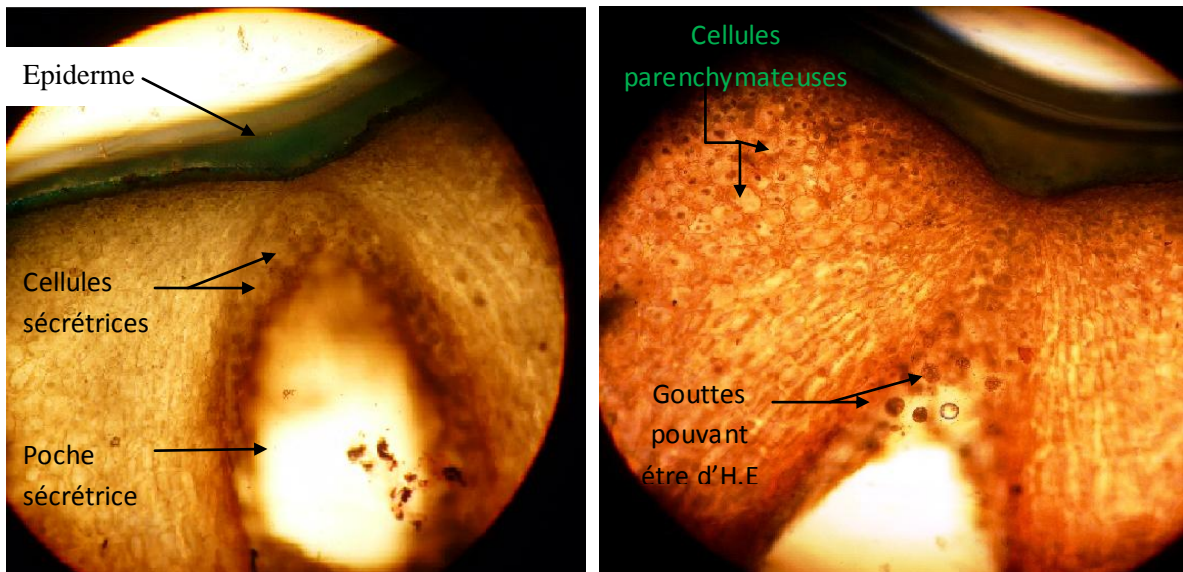
### I.6.2 Structure du péricarpe de la bergamote :

Ayant la même structure tissulaire que celui de l'orange, le péricarpe de la bergamote ne diffère de ce dernier que par la taille et la répartition des glandes excrétrices d'huiles essentielles qui sont légèrement plus étroites et plus rapprochées voir (Fig.25).



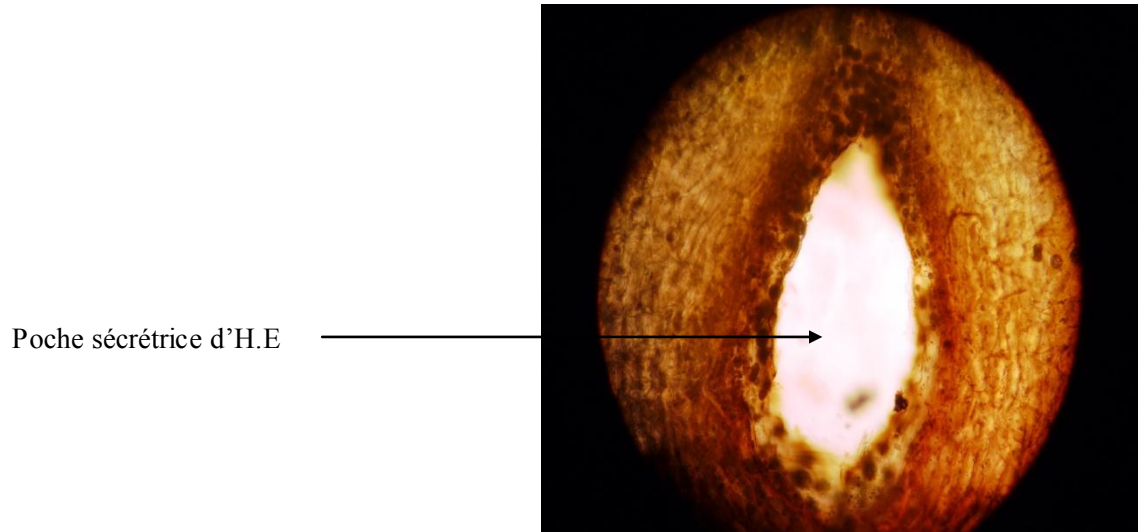
**Figure 25** : coupe transversale du péricarpe de la bergamote montrant le flavédo observé au microscope photonique G : 100X

### I.6.3 Structure du péricarpe du citron :



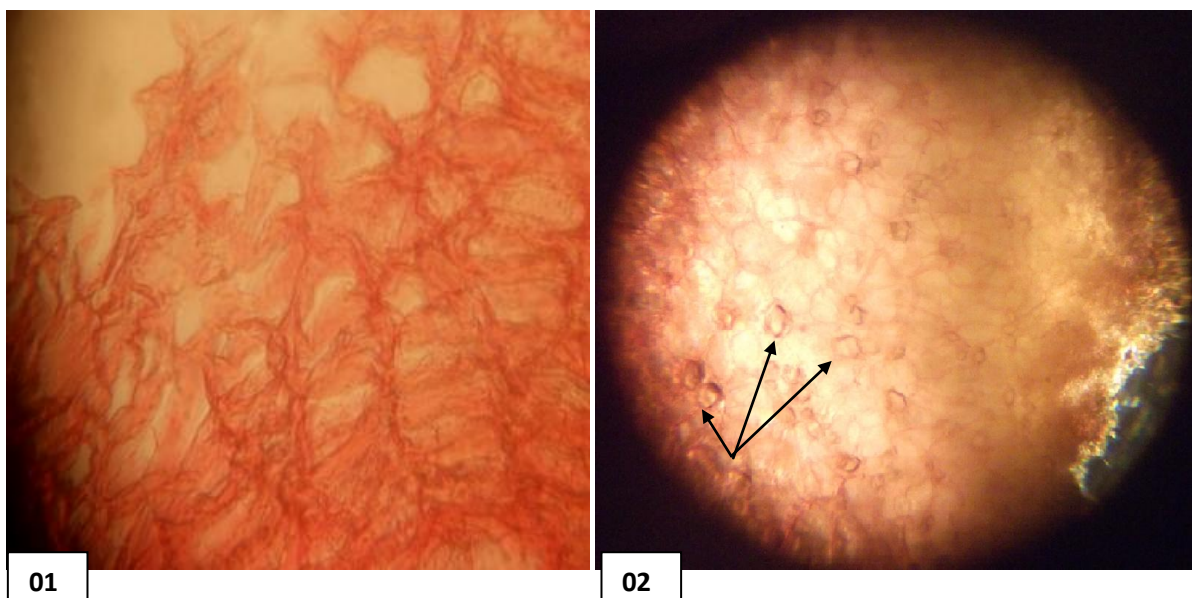
**Figure 26** : coupes transversales du péricarpe du citron montrant le flavédo observé au microscope photonique G : 100X.

Avec une structure similaire à celles de l'orange et de la bergamote, les tissus du Flavédo du Citrus limon Euréka sont aussitôt riches en glandes à essences, ces dernières sont grossières composées de six à huit assises de cellules sécrétrices qui s'organisent autour de la poche (Fig.27).



**Figure 27** : coupe transversale du péricarpe du citron montrant le flavédo observé au microscope photonique G : 100X.

Ces glandes sécrétrices se disposent généralement au niveau du parenchyme, caractérisé chez les agrumes par sa forme étoilée et sa teneur en oxalate de calcium (Ahmed Arafa, 2005).



**Figure 28** : Le parenchyme étoilé (01), et les cristaux ressemblants aux oxalates de Calcium (02) du péricarpe de Citrus limon Eureka observé au microscope photonique à G : 400X



**I.7 Les caractéristiques organoleptiques :**

La caractérisation organoleptique a donnée les résultats figurants dans les tableaux 11 et 12.

**Tableau 11 :** Les caractéristiques organoleptiques des huiles essentielles des trois espèces d'agrumes obtenues par hydro distillation :

Caractéristiques Esp	H.E des différents organes	Odeur	Couleur	Aspect	Etat
<i>orange</i>	Feuilles	Douce, Faible.	incolore	Liquide Mobile Limpide	Volatile
	Ecorces	Douce, Forte		Liquide Mobile Limpide	Très volatile
<i>Citron</i>	Feuilles	Forte, caractéristique du zest de citron	Jaune clair	Liquide Mobile Limpide	Très volatile
	Ecorces	Forte, caractéristique du zest de citron	Jaune pâle	Liquide Mobile Limpide	Très volatile
<i>bergamote</i>	Feuilles	Forte.	incolore	Liquide Mobile Limpide	Volatile
	Ecorces	Très forte, âcre	incolore	Liquide Mobile Limpide	Très volatile

**Tableau 12 :** caractères organoleptiques des huiles essentielles des trois espèces d'agrumes obtenues par solvant :

Caractéristiques Esp	H.E des différents organes	Odeur	Couleur	Aspect	Etat
<i>orange</i>	Feuilles	Douce, Faible.	Vert foncé	Liquide Mobile Limpide	Volatile
	Ecorces	Douce, Forte	orange	Liquide Mobile Limpide	Très volatile
<i>Citron</i>	Feuilles	Forte, caractéristique du zest de citron	Vert clair	Liquide Mobile Limpide	Très volatile
	Ecorces	Forte, caractéristique du zest de citron	Jaune	Liquide Mobile Limpide	Très volatile
<i>bergamote</i>	Feuilles	Forte.	Vert clair	Liquide Mobile Limpide	Volatile
	Ecorces	Très forte, âcre	Jaune foncé	Liquide Mobile Limpide	Très volatile

Quelque soit le mode ou la partie sujette de l'extraction, les caractères organoleptiques demeurent les mêmes ; sauf qu'en utilisant le solvant l'huile essentielles s'est imprégnée de la pigmentation de l'organe utilisé voir les nuances des caroténoïdes pour les fruits, et de la chlorophylle pour les feuilles, cela indique que ces molécules seront probablement miscibles dans l'Ether de pétrole.

Selon AFNOR (NFT75-203) in Abouda (2007), l'huile essentielle d'orange serait volatile, à odeur très forte caractéristique du fruit, incolore ou jaune pâle, à aspect liquide, mobile et limpide.

Selon AFNOR (NFT75-335) in Madjene et Madani (2010), l'huile essentielle de citron aussi volatile, caractéristique du péricarpe frais du citron, jaune (clair, verdâtre ou foncé), d'aspect liquide, mobile, et limpide.

Selon AFNORNF et ISO3520 in Djaidjaa (2006), l'huile essentielle de bergamote est généralement d'odeur très forte, caractéristique du fruit du bergamotier. Incolore, liquide, mobile, et limpide.

## **I.8 Analyses physico-chimiques :**

### **I.8.1 L'indice de réfraction :**

Les résultats de mesure de l'indice de réfraction pour les huiles essentielles des trois espèces a montré qu'on ne peut pas éliminer complètement le solvant qui reste dans l'huile à l'état de traces, d'où celles obtenues par l'Ether de pétrole présente un indice de réfraction plus élevées que celles obtenues par hydro distillation (Tableau 13). D'autre part, on suppose l'existence de certains éléments de couleur forte dans les huiles essentielles des écorces à qui l'indice de réfraction était plus élevé que celui des huiles extraites des feuilles.

**Tableau 13 :** L'indice de réfraction des huiles essentielles obtenues à 26°C

<b>HE</b>	<b>L'indice de réfraction à 26°C de l'huile obtenu par hydro-distillation.</b>	<b>L'indice de réfraction à 26°C de l'huile obtenu par solvant.</b>
<b>Orange feuilles</b>	<b>1,3326</b>	<b>1,4760</b>
<b>Orange écorce</b>	<b>1,4424</b>	<b>1,4713</b>
<b>Bergamote feuille</b>	<b>1,3212</b>	<b>1,3251</b>
<b>Bergamote écorce</b>	<b>1,4632</b>	<b>1,4780</b>
<b>Citron feuilles</b>	<b>1,3471</b>	<b>1,4813</b>
<b>Citron écorces</b>	<b>1,4650</b>	<b>1,4732</b>

### I.8.2 La densité relative :

La densité des huiles essentielles obtenue est comme l'a indiqué la bibliographie inférieure à celle de l'eau étant de (0,832 à 0,861) < à 1. En outre, les essences obtenues par hydro distillation étaient plus denses que celles obtenues par solvant (Tableau 14).

**Tableau 14 :** La densité relative des huiles essentielles obtenues à 20°C.

HE	densité relative à 20°C des huiles essentielles obtenues par hydro-distillation.	Densité relative à 20°C des huiles essentielles obtenues par solvant.
Orange feuilles	0,861	0,841
Orange écorce	0,856	0,832
Bergamote feuille	0,851	0,834
Bergamote écorce	0,857	0,849
Citron feuilles	0,884	0,856
Citron écorces	0,858	0,836

### I.9. Résultats d'analyse chromatographique :

La chromatographie phase gazeuse (CPG) nous a permis de déduire la présence d'une vingtaine de substances chimiques inconnues dans les trois huiles essentielles extraites par hydro distillation.

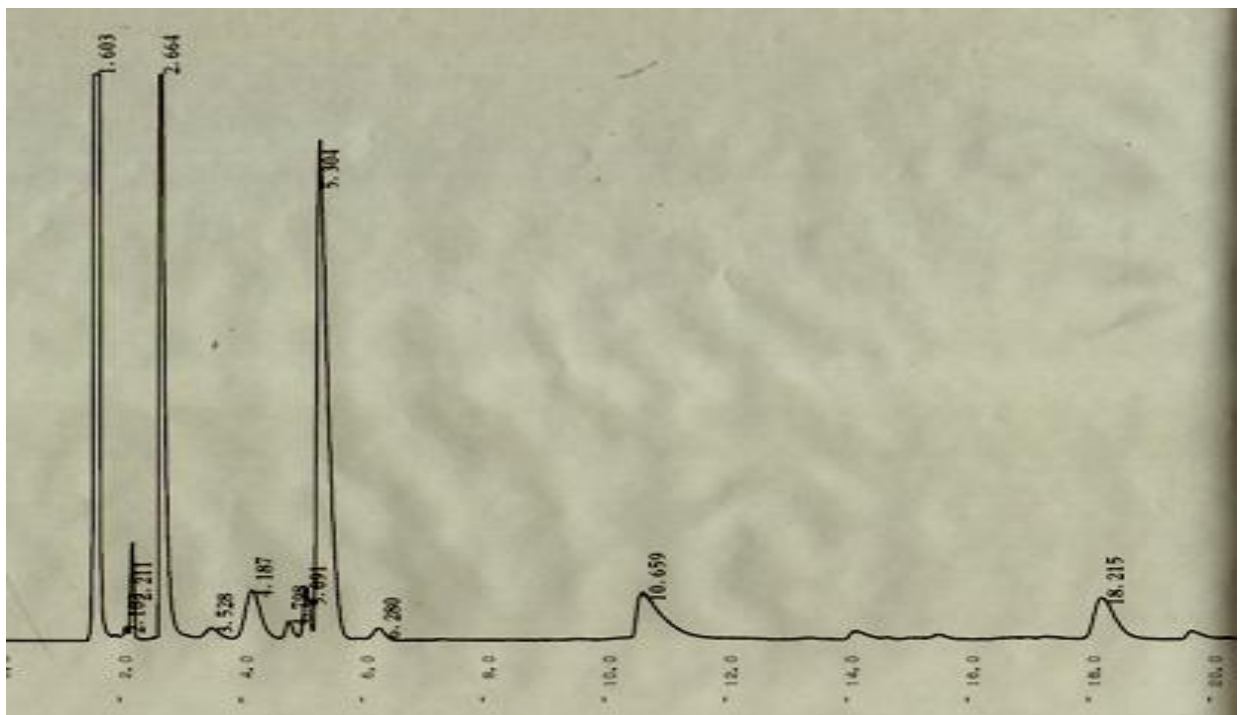
En comparant les temps de rétentions des pics correspondants à ces molécules par rapport au pic de l'étalon (Limonène pur à 100% voir annexes) on a pu confirmer les proportions du limonène dans nos trois essences estimées à 93,52% dans l'huile de citron, à 97,37% dans l'huile d'orange et à 87,96 dans l'huile de bergamote (Fig.27 ; 28 ; 29).

En comparant les temps de rétentions de certaines de ces molécules inconnues par rapport à celles identifiées dans les travaux de Madjene et Madani (2010) & Hellal (2011), sur les huiles essentielles d'agrumes et dans les mêmes conditions opératoires, on peut supposer que ces molécules peuvent correspondre à celles représentées dans le tableau suivant (Tableau 15).

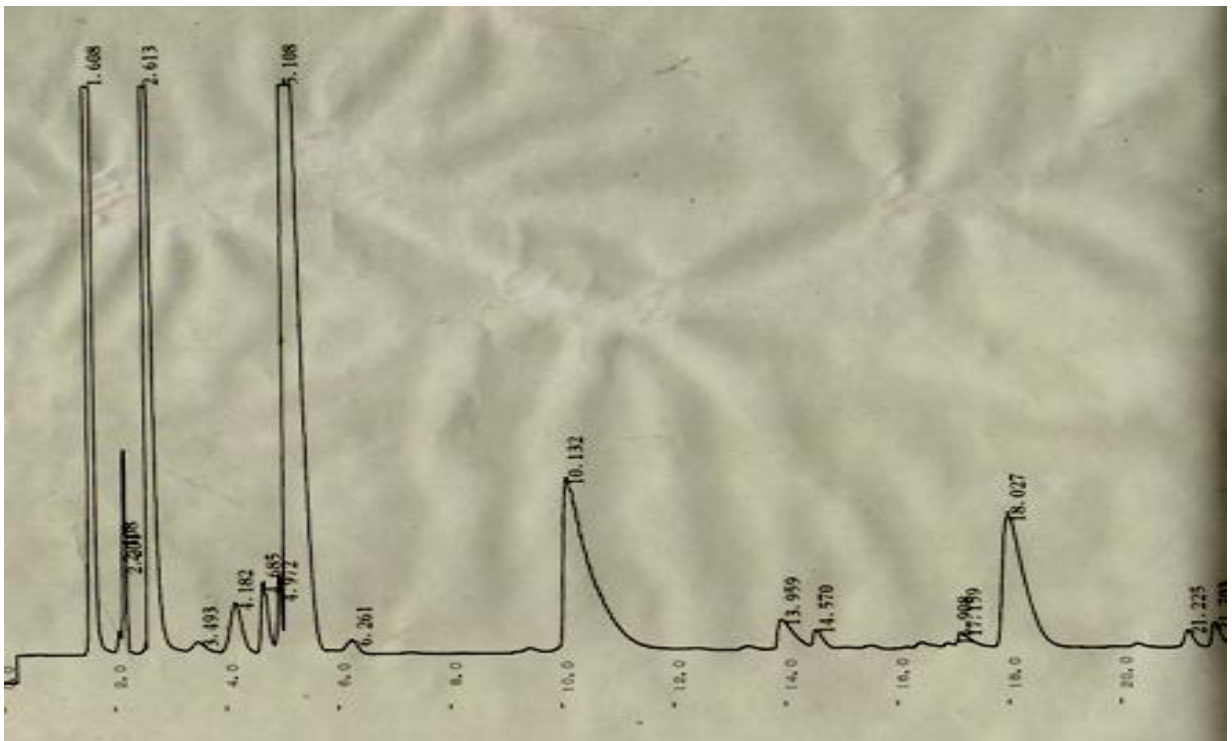


**Tableau 15 : Identification approximative des composés des trois huiles essentielles après comparaison des temps de rétention.**

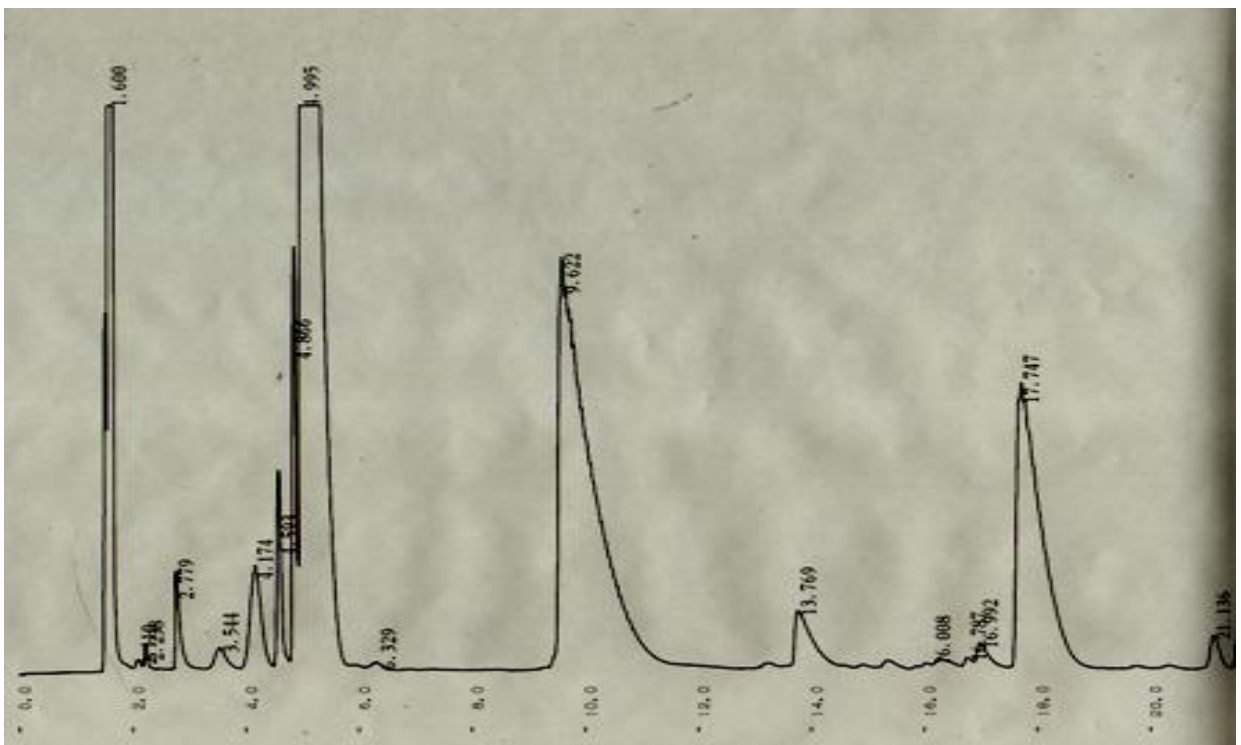
Les molécules	Temps de rétention (mn)	(%) dans l'huile d'orange	(%) dans l'huile de citron	(%) dans l'huile de bergamote
Limonène	1,6	97,37	93,52	87,96
Géranol	2,1	0,007	0,017	0,009
Acétate de Néryl	2,2	0,06	0,12	0,01
Isocaryophyllène	2,6	0,76	1,65	/
Citrals	2,7	/	/	0,10
$\beta$ Pinène	3,5	0,02	0,01	0,05
Myrcène	4,7	0,02	0,09	0,2
Linalol	17,1	/	0,03	/
Néral	21,2	/	0,03	/
Acétate de Géranyl	24,7	0,01	/	0,1
<b>Total sur 100%</b>		<b>98,24</b>	<b>95,46</b>	<b>88,42</b>



**Figure 29: Chromatogramme de l'huile essentielle des écorces de l'orange extraite par hydro distillation.**



**Figure 30: Chromatogramme de l'huile essentielle des écorces du citron extraite par hydro distillation.**



**Figure 31: Chromatogramme de l'huile essentielle des écorces de la bergamote extraite par hydro distillation.**

## Discussion générale :

Les essais réalisés afin de contribuer à l'étude des huiles essentielles de trois espèces de *Citrus* : *sinensis* *Cadenera*, *limon* *Eureka*, et *bergamia* *Castagnaro*, ont permis d'obtenir les résultats suivants :

- Les données biométriques des feuilles et fruits utilisés à l'extraction, notamment l'épaisseur des écorces sont probablement fonction caractéristique de la teneur en matière sèche et donc du rendement en huiles essentielles car moins les écorces des trois espèces sont épaisses plus elles sont riches en matière sèche. Cependant, ces résultats sont comparables à ceux de Boutouchent et Bouguettaf (2010) qui ont étudiés ces paramètres pour trois variétés d'orange de la même région.
- L'examen microscopique réalisé suivant la technique de double coloration après la confection des coupes histologiques, nous a permis de distinguer les structures responsables de la sécrétion des huiles essentielles, qui se caractérisent par la présence de des glandes sécrétrices au niveau du parenchyme composés de cellules sécrétrices qui entourent de grossières poches ; ces résultats sont idem pour celles de Madjene et Madani (2010) réalisés sur des coupes de citron.
- L'extraction des huiles essentielles par le dispositif de *Clevenger* a permis d'obtenir un rendement de 0,22% à 0,36 % par les feuilles, comparables aux taux définis par Anton et Silano (2001) qui rapportent que le Citrus limon en contient entre 0,2% à 0,6% par hydro distillation. Mais pour les écorces nos résultats ont fait l'exception allant de 0,83% à 2,52% ; cela s'explique par l'utilisation de la poudre et non pas des écorces séchées entières car la surface qu'occupent les huiles à l'intérieur des cellules deviennent réduites par broyage, et donc leur sécrétion et leur extraction seront facilitées.
- Selon Lota *et al.* (2002), ces teneurs en huiles essentielles (des feuilles, et écorces), varient en fonction de l'espèce, de son génotype et environnement. Et qu'on peut classer dans cette étude par ordre décroissant comme suit : bergamote>citron>orange. Cette classification demeure la même dans les deux procédés utilisés pour leur obtention voir l'hydro distillation et l'extraction par solvant.
- Ce dernier procédé, il nous a permis d'atteindre un rendement qui a dépassé la normale entre 0,42% à 0,49% pour les feuilles et de 5,34% à 25,98% pour les écorces. Cependant, ces résultats restent comparables en ce qui concerne les huiles de zeste d'oranges et citron de 5,34% et 10,41% par rapport à ceux de Boutouchent et Bouguettaf (2010) estimés de 10,85% à 11,68% qui avaient utilisés le même solvant « Ether de pétrole ».

- Les écarts entre les rendements d'huiles cueillis par les deux méthodes peuvent s'expliquer, par la présence de certains composés dans la poudre d'agrumes, qui sont insolubles à l'eau, et solubles à l'Ether de pétrole (Milpied, 2009) qui a permis leur extraction avec l'huile, dans une plus grande proportion.
- En outre, l'exception qu'a fait l'extraction par solvant de l'huile de bergamote peut joindre l'utilisation de la poudre, la nature de l'espèce, et la solubilisation dans l'Ether pour être interprétée, tout comme elle peut remettre en cause la non récupération totale du solvant après évaporation rotative car elle a été effectuée en dernier par le solvant déjà récupéré des deux premières extractions (faute de non disponibilité de quantités suffisantes du solvant).
- Les caractéristiques organoleptiques de nos huiles essentielles obtenues, sont comparables à celles définies par l'association française de normalisation AFNOR rapporté par (Djaidjaa, 2006 ; Abouda, 2007 ; Madjene & Madani, 2010).
- L'analyse physicochimique des huiles essentielles des trois espèces de *Citrus* a permis de déduire que leur couleur varie en fonction de l'indice de réfraction car là où elles sont incolores à jaune pâle leur indice est de : 1,321 à 1,465 et là où elles sont colorés il va de : 1,325 à 1,48. Ces résultats sont comparables à ceux de Chemat et *al.* (2010), et ceux de Boutouchent & Bouguettaf (2010) évalué respectivement entre 1,475 et 1,460.
- D'autre part, la densité des huiles obtenues par distillation était moins élevée, que les concrètes Etheropétroliques mais avec des valeurs entre : 0,832 à 0,861 ; comparables à celles édictées par Sallé (1991) estimées entre 0,845 à 0,860 pour l'orange, entre 0,875 à 0,883 pour le citron et entre 0,85 à 0,87 pour la bergamote.
- L'analyse chimique par chromatographie en phase gazeuse nous révéla que le taux du composé majeur « Limonène » varia d'une espèce à une autre voir à 97,37% dans l'huile d'orange, de 93,52% dans l'huile de citron et moins concentré à 87,96% dans l'huile de bergamote. Ces résultats sont comparables à ceux de Boutouchent et Bouguettaf (2010) où les chromatogrammes de trois variétés d'oranges ont indiqués un taux de limonène compris entre 54,2% à 97,08%.
- En outre, et en comparant les résultats de nos chromatogrammes par rapport à ceux de Hellal (2011) dans les mêmes conditions opératoires, ainsi qu'à ceux de Madjene & Madani (2010), on suppose l'abondance des composés suivants: Le limonène, le géraniol, l'acétate de Néryl, le  $\beta$  pinène, et le myrcène communs à toutes les huiles analysées, plus les citrals de 0,1% dans l'huile de bergamote, le Linalol et le Néral à 0,03% dans l'huile de citron, et enfin : l'acétate de Géranyl à 0,1% dans l'huile de bergamote et à 0,01% dans l'huile d'orange. La composition chimique est donc fonction de l'espèce.

**II. Activité antifongique des huiles essentielles d'agrumes sur *Phytophthora infestans* :**

**II.1. Pouvoir antifongique *in vitro* :**

**II.1.1. Pouvoir antifongique des huiles d'agrumes sur la croissance mycélienne de *P. infestans* :**

L'analyse de la variance des pourcentages d'inhibition de la croissance mycélienne n'a pas montré de différences significatives entre les trois huiles essentielles utilisées, leurs concentrations, et les deux isolats de *P. infestans* étudiés, mais une différence hautement significative a été signalée en ce qui concerne la période d'incubation. Ainsi, cette dernière évolue au cours du temps (Tab.16).

Cependant, en modèle GLM une variabilité a été approuvée entre les trois huiles concernant les taux d'inhibition de la croissance mycélienne des souches A1 et A2 de *P. infestans* ; d'où l'huile d'oranger a révélé le taux d'inhibition de croissance le plus important qui n'atteint même pas 20%, ce qui confirme son faible pouvoir antifongique. A n'importe quelle dilution l'inhibition reste faible mais à l'état pur, l'huile essentielle est plus active. Par ailleurs, l'inhibition évolue dans le temps en fonction de la croissance mycélienne des deux isolats fongiques. Parallèlement, l'inhibition de la croissance mycélienne a été légèrement plus marquée sur l'isolat A2 que celui de A1 donc l'isolat A2 de Bourkika est faiblement sensible aux huiles testées que celui de A1 de Bouira, qui a montré une résistance modérée vis à vis des trois huiles d'agrumes testées (Figs.32 & 33).

**Tableau16: Analyse de la variance des différents paramètres étudiés *in vitro*.**

<b>Facteurs</b>	<b>Somme des carrés</b>	<b>d.d.l.</b>	<b>Carrés moyens</b>	<b>F-ratio</b>	<b>P</b>
<b>H.E</b>	553.772	2	276.886	2.853	0.068
<b>Dose</b>	557.865	2	278.932	2.874	0.067
<b>Souche</b>	42.772	1	42.772	0.441	0.510
<b>Date</b>	5473.256	2	2736.628	28.198	0.000

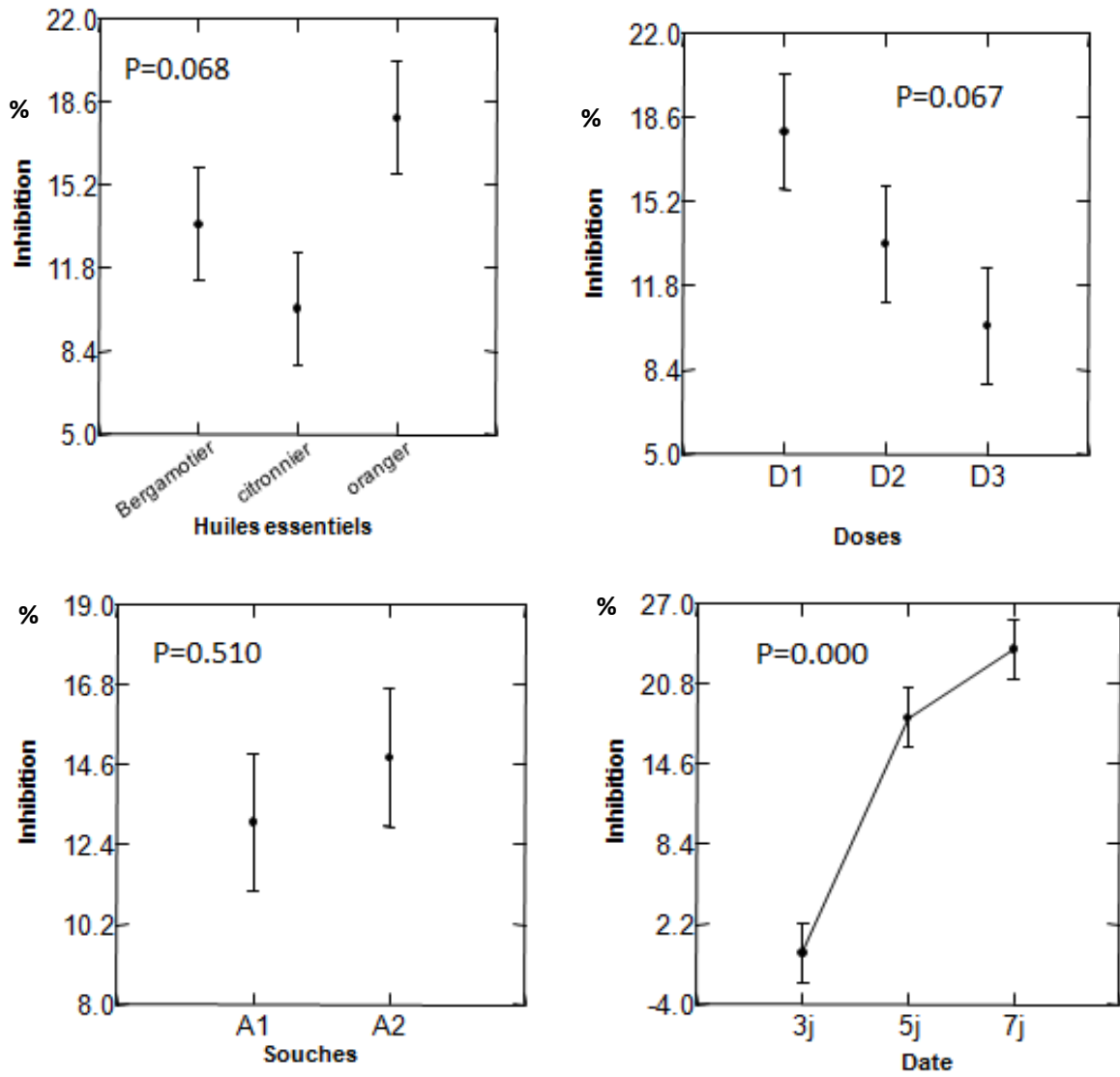
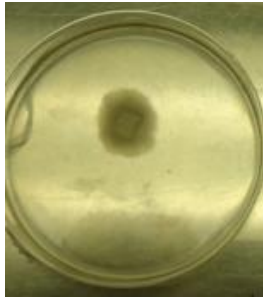
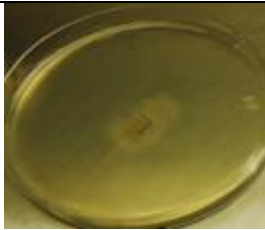
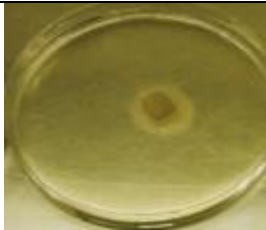
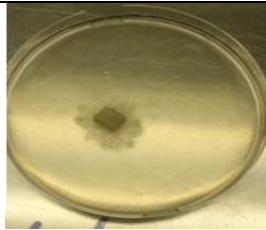
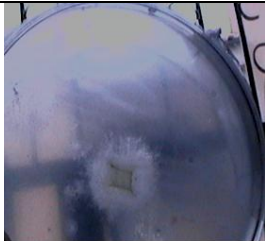
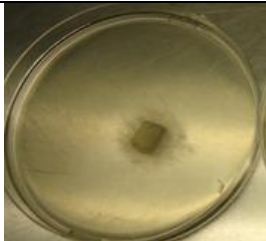
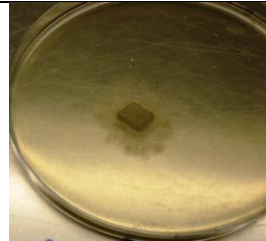
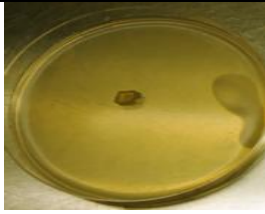
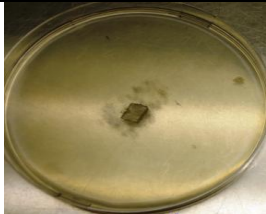
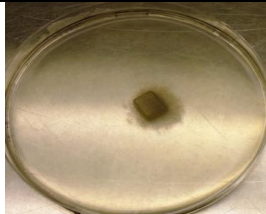
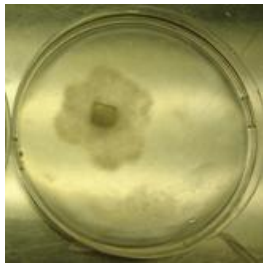
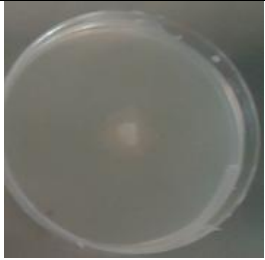
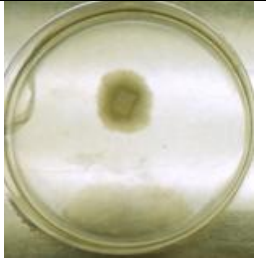
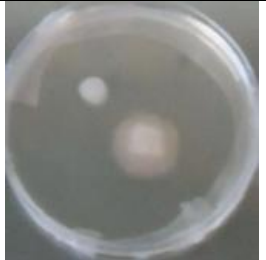




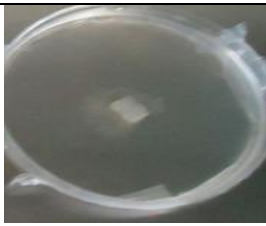
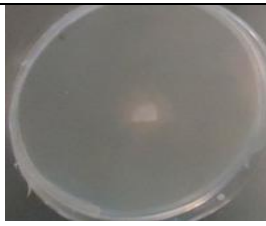


Figure 32 : Pouvoir antifongique des huiles d'agrumes en modèle GLM selon la nature des huiles, leurs dilutions, les souches et le temps d'incubation.

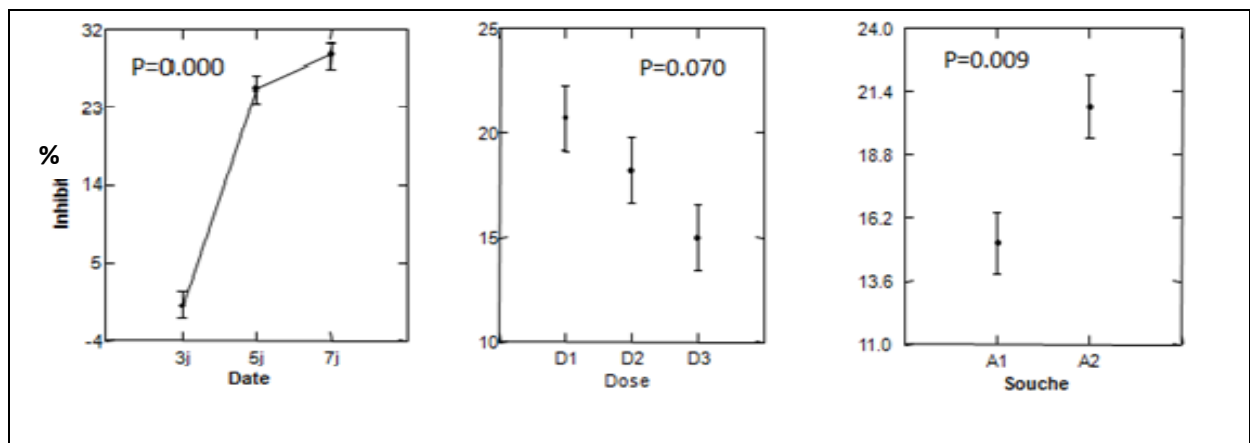
Figure 33 : variabilité de la croissance mycélienne des souches A1 et A2 de *P.infestans* sous traitements des trois huiles essentielles d'agrumes testées.

Témoins	H.E	Pure	1/10	1/100
<div style="border: 1px solid black; display: inline-block; padding: 2px; margin-bottom: 5px;">A1</div> 	Orange			
	Citron			
	Bergamote			
<div style="border: 1px solid black; display: inline-block; padding: 2px; margin-bottom: 5px;">A2</div> 	Orange			
	Citron			
	Bergamote			

Par ailleurs, l'analyse de la variance des pourcentages d'inhibition de la croissance mycélienne n'a pas montré de différence significative entre les dilutions de l'huile d'oranger mais la différence était significative au cours du temps et entre les souches (Tableau 17). Ainsi, en modèle GLM, la croissance de la souche A2 était plus inhibée par l'huile d'oranger que celle de la souche A1 (Fig34).

**Tableau 17 : Effet d'huile essentielle d'orange sur le développement des deux isolats:**

Facteurs	Somme des carrés	d.d.l.	Carrés moyens	F-ratio	P
Dose	98.977	2	49.488	3.337	0.070
Souche	141.557	1	141.557	9.544	0.009
Date	2952.020	2	1476.010	99.513	0.000



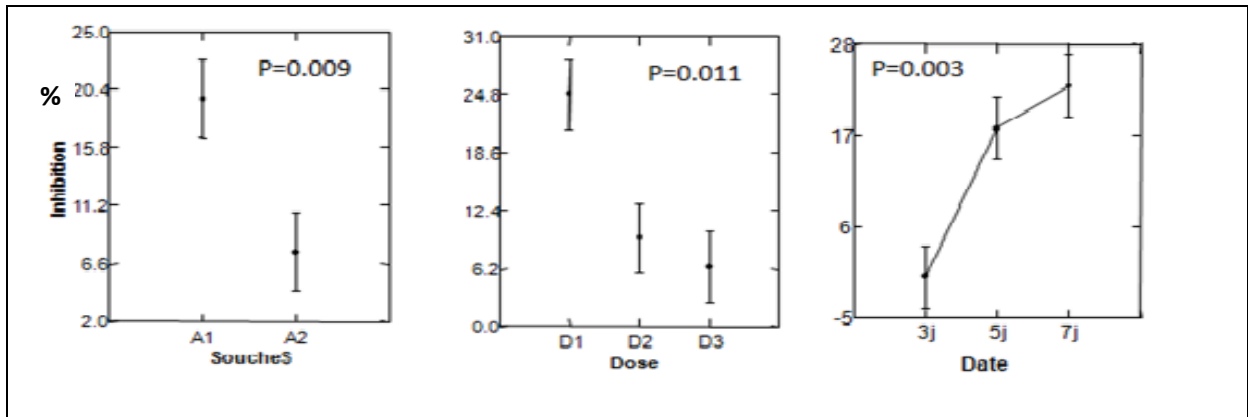
**Figure 34 : Pouvoir antifongique de l'huile d'orange en modèle GLM selon les dilutions de l'huile, les souches et le temps d'incubation.**

En revanche, l'analyse de la variance des pourcentages d'inhibition de l'huile essentielle de bergamote a montré des résultats très hautement significatifs entre les souches, les dilutions, et l'évolution de l'inhibition dans le temps (Tab.18). En modèle GLM, la souche A1 était plus sensible à l'huile de bergamotier que celle de A2 (Fig.35).

**Tableau 18 : Effet d'huile de Bergamote sur Le développement des souches A1 et A2 de *P.infestans***

Facteurs	Somme des carrés	d.d.l.	Carrés moyens	F-ratio	P
Dose	1160.690	2	580.345	6.783	0.011
Souche	665.437	1	665.437	7.777	0.016
Date	1745.188	2	872.594	10.198	0.003





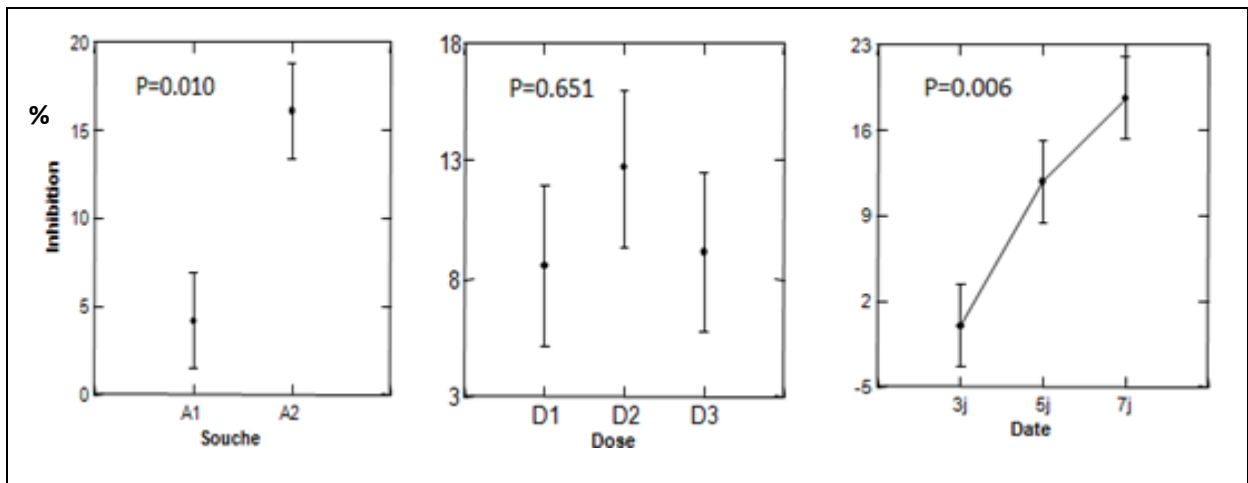
**Figure 35 : Pouvoir antifongique de l’huile de bergamote en modèle GLM selon les dilutions de l’huile, les souches et le temps d’incubation.**

D’autre part, l’analyse de la variance des pourcentages d’inhibition de la croissance mycélienne n’a pas montré de différence significative entre les dilutions de l’huile de citron mais la différence était significative au cours du temps et entre les souches (Tableau 19). Ainsi, en modèle GLM, la croissance de la souche A2 était plus inhibée par l’huile de citron que celle de la souche A1 (Fig36).

Comme l’orange, l’huile de citron était plus efficace sur la souche A2, seulement à l’état pur cette huile s’est avérée favorable à la stimulation de la croissance de la souche A1. la dilution 1/10 était la dilution idéale pour inhiber à près de 13% la croissance de ce pathogène mais cette inhibition a récidivé en diminuant à nouveau la concentration de cette huile à 1/100 pour atteindre à la fin 8% seulement (Fig36).

**Tableau 19 : Effet d’huile de citron sur le développement des souches A1 et A2 de *P.infestans* :**

Facteurs	Somme des carrés	d.d.l.	Carrés moyens	F-ratio	P
Dose	59.816	2	29.908	0.445	0.651
Souche	636.346	1	636.346	9.458	0.010
Date	1066.055	2	533.028	7.922	0.006



**Figure 36 : Pouvoir antifongique de l'huile de citron en modèle GLM selon les dilutions de l'huile, les souches et le temps d'incubation.**

### II.1.2 Etude des corrélations des taux d'inhibition de la croissance mycélienne en fonction des trois huiles d'agrumes et des souches de *P.infestans* :

Une analyse en composante principale a été utilisée pour effectuer une analyse globale des résultats. Cette analyse a été effectuée sur les trois huiles d'agrumes avec leurs dilutions, les deux souches A1 et A2 et les % d'inhibition de la croissance mycélienne. L'étude des corrélations a été réalisée sur deux axes.

Axe1 représenté par la catégorie de données présentant de fortes contributions (52.47 %) et l'axe2 représenté par les données de faibles contributions (47.53%) (Fig.37).

**Selon l'axe 01 on distingue :**

\*le groupe correspondant à l'huile d'orange avec ses trois dilutions qui ont présenté le pouvoir antifongique beaucoup plus sur l'isolat A2. Parallèlement l'huile de citron avec ses trois dilutions ayant montré une faible inhibition de la croissance mycélienne des deux souches néanmoins meilleure sur A2 qu'à A1.

\* Le groupe correspondant à l'huile de bergamote pure (Dose 1) à qui le pouvoir antifongique était plus faible que le groupe précédent mais, plus efficace sur l'isolat A1 .

\*le groupe correspondant à l'huile de bergamote diluée à 1/10ème et 1/100ème à qui l'effet était plus faible sur les deux souches.

Selon l'axe 02 on distingue :

\* un seul groupe à effet positif correspondant à l'huile d'orange et celle de citron à différentes doses efficaces beaucoup plus sur la souche A2.

En effet, les calculs de la distance euclidienne sur la base d'une similarité de -2,1 a montré la présence de 3 groupes (Fig.37 & Fig.38).

\*Groupe 1 : celui de l'huile de bergamote pure, qui a atteint le plus grand pourcentage d'inhibition voir une moyenne de 29,96% sur la souche A1 et 19,68% sur A2 (voir annexe)

\*Groupe 2 : il comprend en amont l'huile de l'orange avec ses trois doses qui étaient efficace sur A2 et peu efficace sur A1, suivi de l'huile de citron et ses trois doses peu efficaces sur A2 que sur A1.

\* Groupe 3 : Il correspond aux huiles diluées de bergamote à 1/10<sup>ème</sup> et 1/100<sup>ème</sup> qui étaient très peu efficaces sur les deux isolats à la fois plus ou moins rapproché de A1.

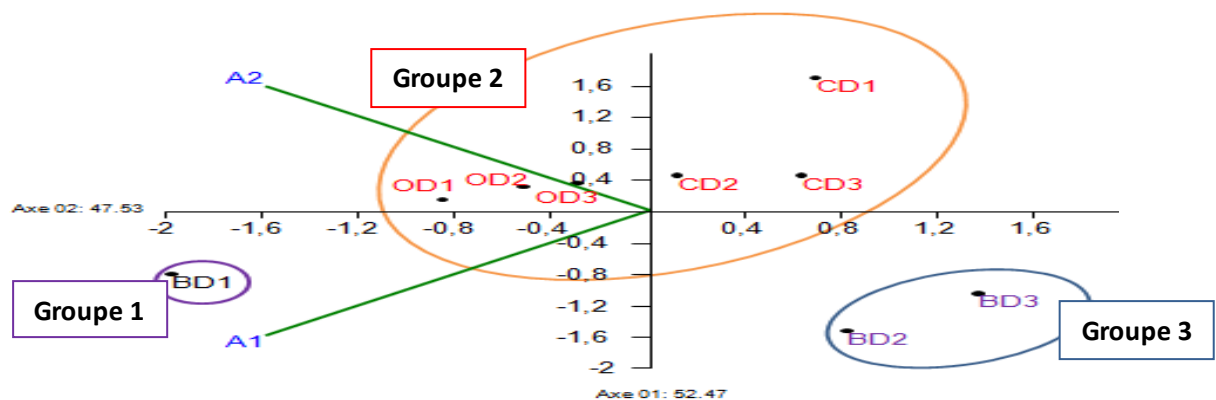


Figure 37 : Analyse en composante principale (ACP) des différents paramètres en fonction des huiles et des souches A1 et A2.

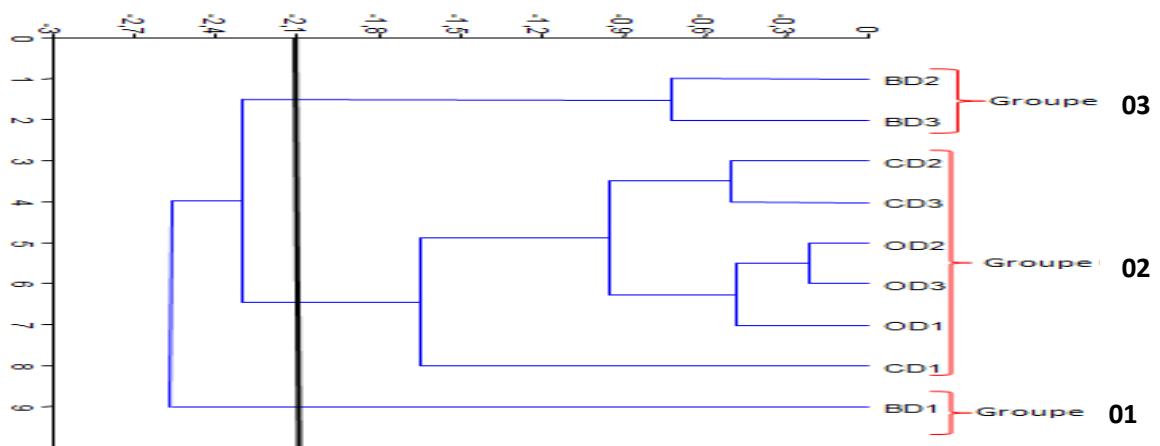
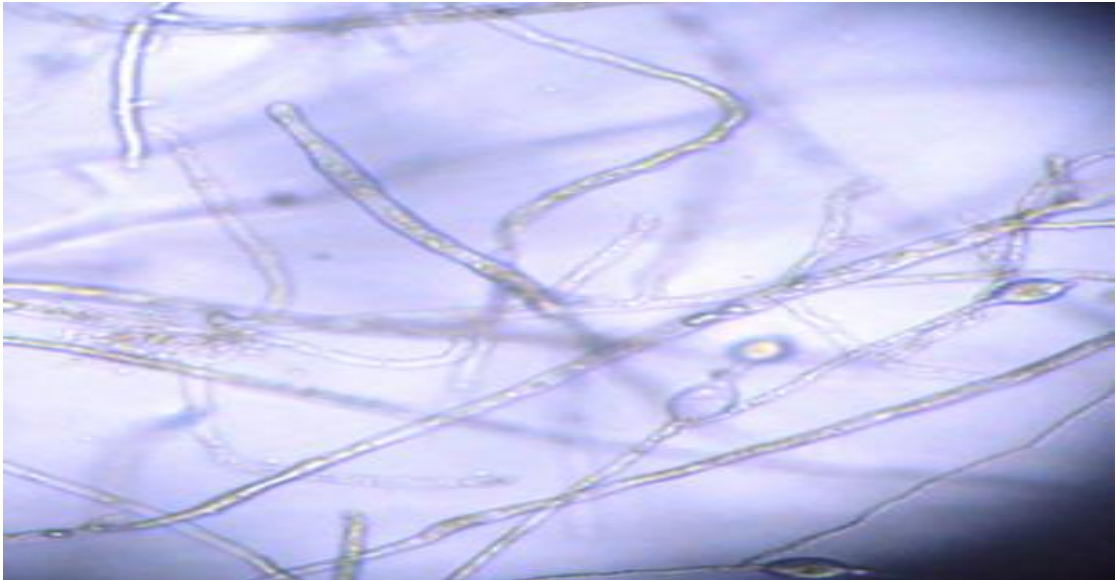


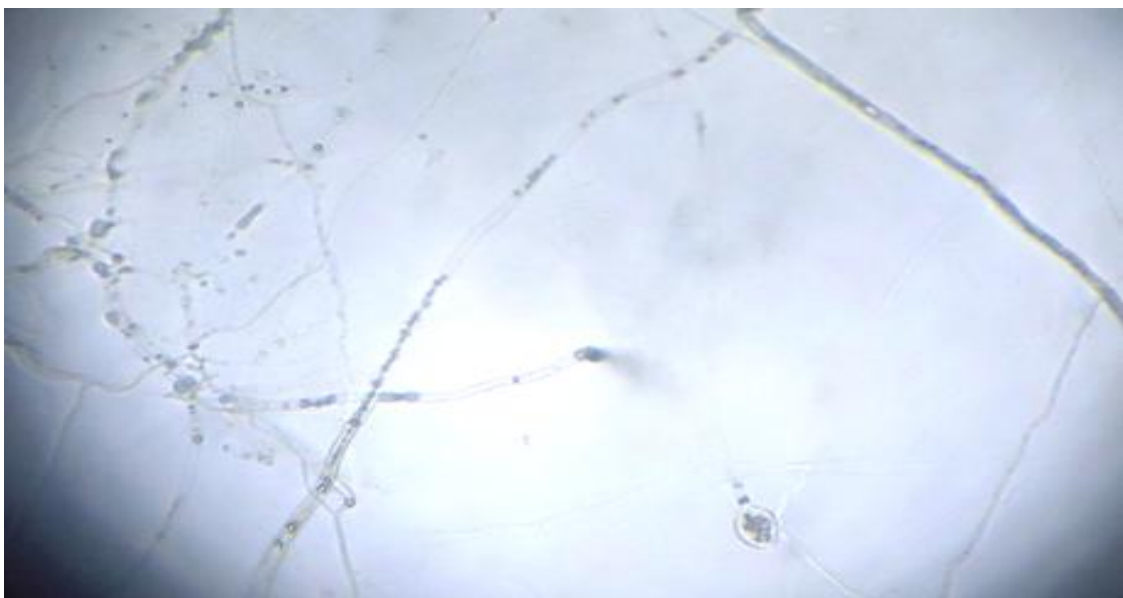
Figure 38 : Classification hiérarchique des différents paramètres en fonction des huiles, des doses, et des souches A1 et A2

**II.1.3 Aspect morphologique des souches de *P.infestans* traitées par les huiles d'agrumes :**

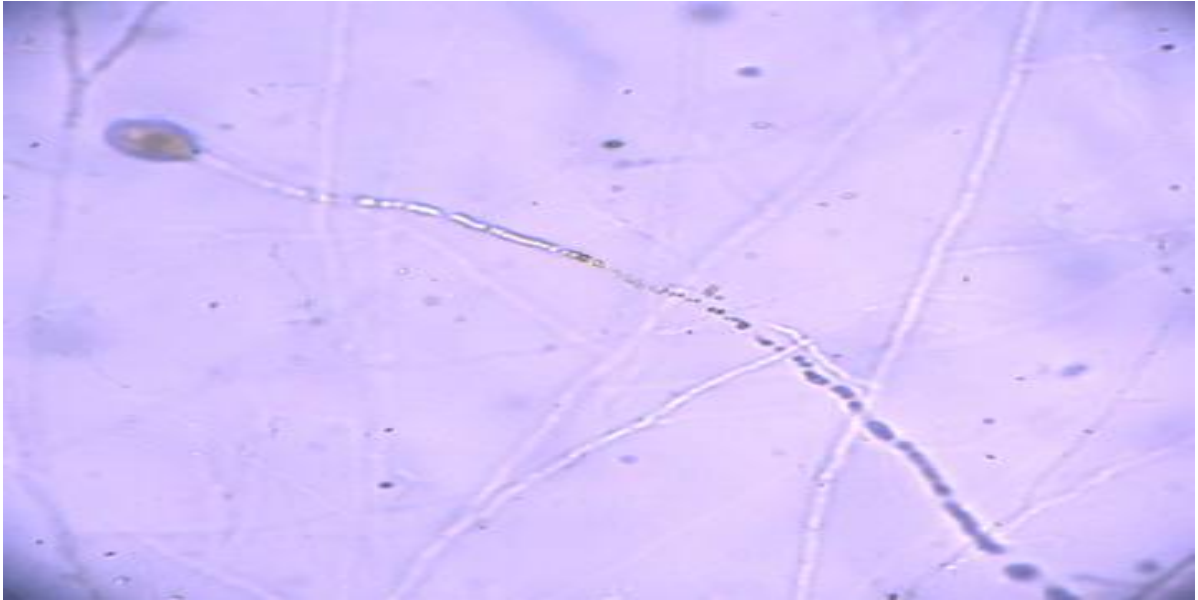
L'inhibition de la croissance mycélienne des souches A1 et A2 de *P.infestans* peut être résumée par l'effet des huiles sur la lyse et la vésiculation du mycélium présentant parfois un diamètre plus réduit. Ce qui a induit des cultures de faibles croissances (Fig.40 & fig.41). L'absence de sporulation ou la présence rare de sporanges, présentant parfois des déformations a réduit le taux de germination et par conséquent la croissance mycélienne.



**Figure 39 : Morphologie d'un isolats de *P.infestans* témoins (Gx100).**



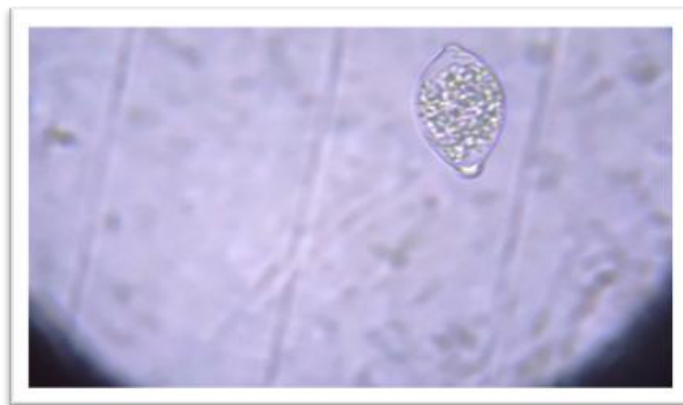
**Figure 40: Morphologie des isolats de *P.infestans* traités par l'huile essentielle de bergamote pure (Gx100).**



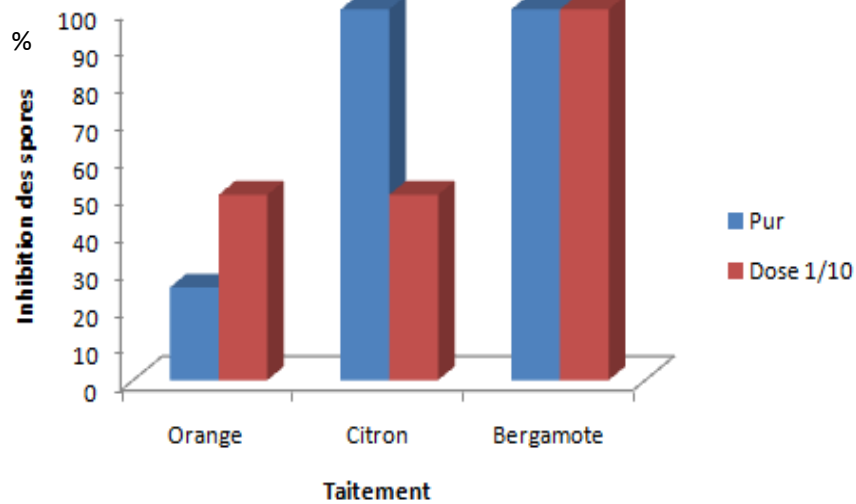
**Figure 41: Morphologie des isolats de *P.infestans* traités par les huiles essentielles d'agrumes observés au microscope à (Gx100).**

#### **II.1.4 Pouvoir antifongique des huiles d'agrumes sur la sporulation de *P.infestans* :**

La sporulation du champignon traité par les huiles essentielles nous a été révélée très faible après un comptage à l'aide d'une cellule Malasséz, (Tab.11), ces spores ont un aspect citriforme (Fig.38). En effet, le pouvoir antifongique *in vitro* de l'huile de bergamote pure et diluée à 1/10 a révélé une efficacité de 100% d'inhibition de la sporulation de l'isolat A2 de *P.infestans* et par degré moindre l'huile de citron et celle d'orange (Fig.43). Cependant, il était important donc de déterminer leur effet fongistatique ou fongicide.



**Figure 42 : Morphologie d'un sporange de *P.infestans* observée au microscope photonique (GX100).**



**Figure 43 : Taux d'inhibition de la sporulation de *P. infestans* sous l'effet des huiles d'agrumes**

**Tableau 20 : Effet des huiles essentielles sur la sporulation des souches A1 et A2 de *P. infestans* .**

Traitement	Taux de sporulation (Sporanges/ml)
Témoin	$2 \times 10^5$
Orange pure	$1,5 \times 10^5$
Orange 1/10	$1 \times 10^5$
Citron pure	$0 \times 10^5$
Citron 1/10	$1 \times 10^5$
Bergamote pure	$0 \times 10^5$
Bergamote 1/10	$0 \times 10^5$

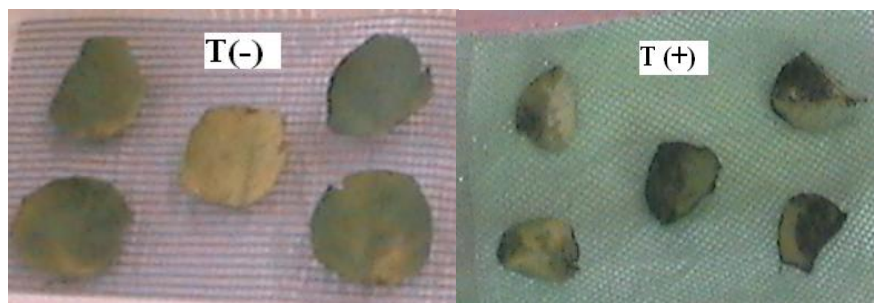
### II.1.5 Survie de *P. infestans* traité par les huiles d'agrumes :

En effet, le transfert des explants mycéliens des isolats A2 préalablement inhibé par l'huile de bergamote pure et dilué à 1/10 , 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*.

## II.2 Pouvoir antifongique *in vivo* :

### II.2.1 Effet des huiles d'agrumes sur le pouvoir infectieux de *P.infestans* :

Dans cette partie du travail, l'effet des huiles essentielles d'agrumes sur les deux souches A1 et A2 de *P.infestans* a été estimé par rapport au taux d'infections sur le disque foliaire exprimant l'expression des symptômes du mildiou sur les feuilles traitées par ces huiles. On a pu déduire donc que le trempage à différentes concentrations, a montré une efficacité des huiles essentielles dans le développement des symptômes. Ce développement rudimentaire s'est prononcé par de légères nécroses, chloroses, accompagnés d'un léger brunissement suite à l'imprégnation des huiles essentielles (Fig.45). Le témoin (+) au champignon inoculé qui a considérablement révélé des signes de la maladie par rapport au témoin (-) ne contenant que de l'eau distillé stérile ; nous a donné une idée sur l'état des feuilles, et sur la virulence du champignon (Fig.44).



**Figure 44 : Les témoins positifs et négatifs de la souche A1.**



Figure 45 : Effets des huiles essentielles d'agrumes sur les souches A1 et A2 de *P.infestans in vivo* .

Isolats	H.E	Pure	1/10	1/100
A1	Orange			
	Citron			
	Bergamote			
A2	Orange			
	Citron			
	Bergamote			

L'analyse de la variance a montré une différence très hautement significative entre le pouvoir anti infectieux des différentes huiles essentielles, sur les deux souches de *P.infestans* (Tab.21). Seulement il n'y avait pas de différence entre le pouvoir antifongique des huiles où on a trempé les feuilles traitées ou celles contenues en solutions avec les champignons

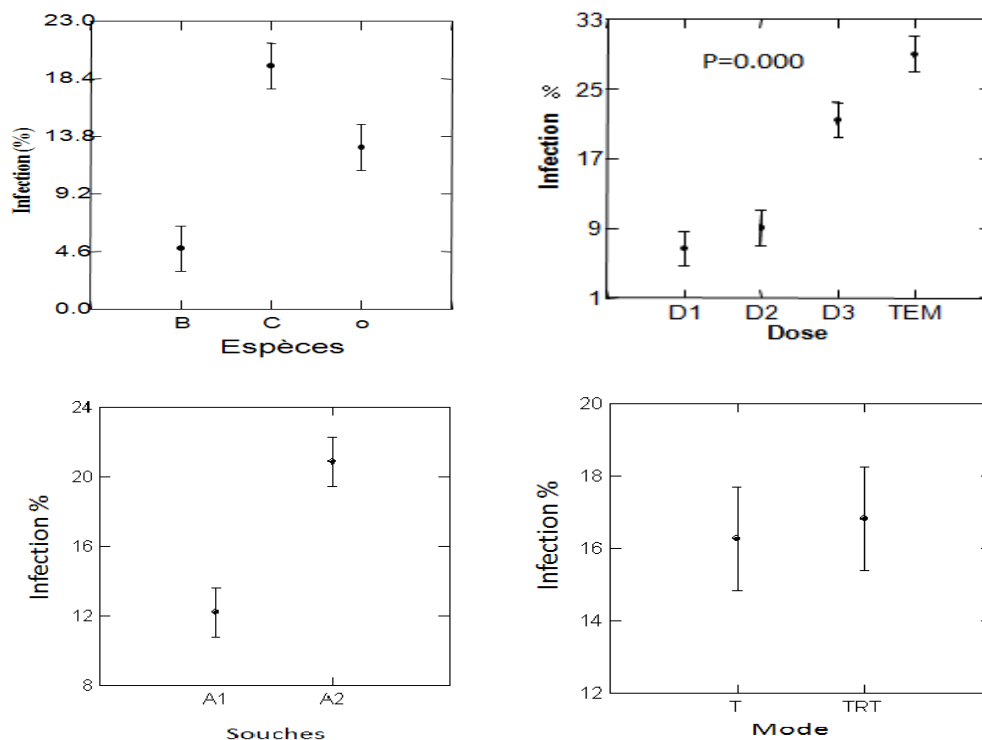


préalablement traitées par les huiles *in vitro*. Chose qui peut être due à la non survie du champignon ou à la présence constante des particules volatiles dans le milieu raclé.

Et en termes de dose, l'infection progresse pour atteindre en moyenne près de 20%, cela peut s'expliquer par la croissance du champignon qui augmente avec la diminution des concentrations des huiles essentielles. Cette différence s'est avérée très hautement significative (Fig.46).

**Tableau 21 : Analyse de la variance du taux d'infection *in vivo* en fonction des huiles, des doses, des souches et le mode de traitements**

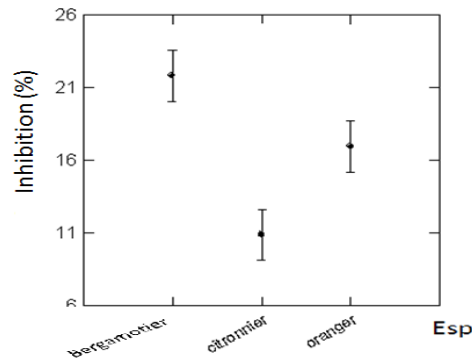
Facteurs	Somme des carrés	d.d.l.	Carrés moyens	F-ratio	P
HE	960,792	2	480,396	9,715	0
Mode	3,797	1	3,797	0,077	0,78
Souche	901,333	1	901,333	18,227	0
Dose	3991,594	3	1330,531	26,906	0



**Figure 46: Taux d'infection du mildiou sur les feuilles de pomme de terre trempées et traitées par les différentes huiles à différentes doses sur les deux souches de *P.infestans*.**

## II.2.2 Pouvoir inhibiteur des huiles essentielles d'agrumes sur *P.infestans in vivo* :

Parallèlement à l'efficacité des huiles *in vitro*, *in vivo* elle s'est révélée aussi percevable sur l'isolat A1, chose qui peut être due à l'effet des composés volatils des huiles, avec un plus grand effet inhibiteur de l'huile de bergamote estimé à près de 21% puis de l'orange à 16% et enfin un faible effet inhibiteur de 11% pour le citronnier (Fig.47).



**Figure 47: l'inhibition de l'expression des symptômes du mildiou *in vivo*.**

## II.2.3 La corrélation entre le pouvoir anti infectieux *in vivo* en fonction des différents paramètres étudiés :

Les analyses de corrélation par le logiciel statistique (Fig.48), nous ont permis de distinguer trois principaux groupes semblables par apport aux taux d'infections, classés comme suit :

\*Groupe 1 : contient les traitements et trempages des deux doses pures et 1/10<sup>ème</sup> de la bergamote ainsi que l'huile d'orange pure. Ces paramètres étaient ceux qui ont donné la meilleure efficacité sur le champignon et donc où l'infection était absente.

\*Groupe 02 : contient les dilutions restantes de l'orange et de la bergamote qui avaient agit sur la souche A2, ainsi que celles traitées par le citron pure qui ont donné une efficacité moyenne sur A1 à rudimentaire sur A2. On parle donc d'une infection moyenne sur les deux isolats traités.

\*Groupe 03 : contient les paramètres qui était éloignées des deux souches à qui l'efficacité n'était pas significative. Ainsi l'infection était positive dans ce groupe.

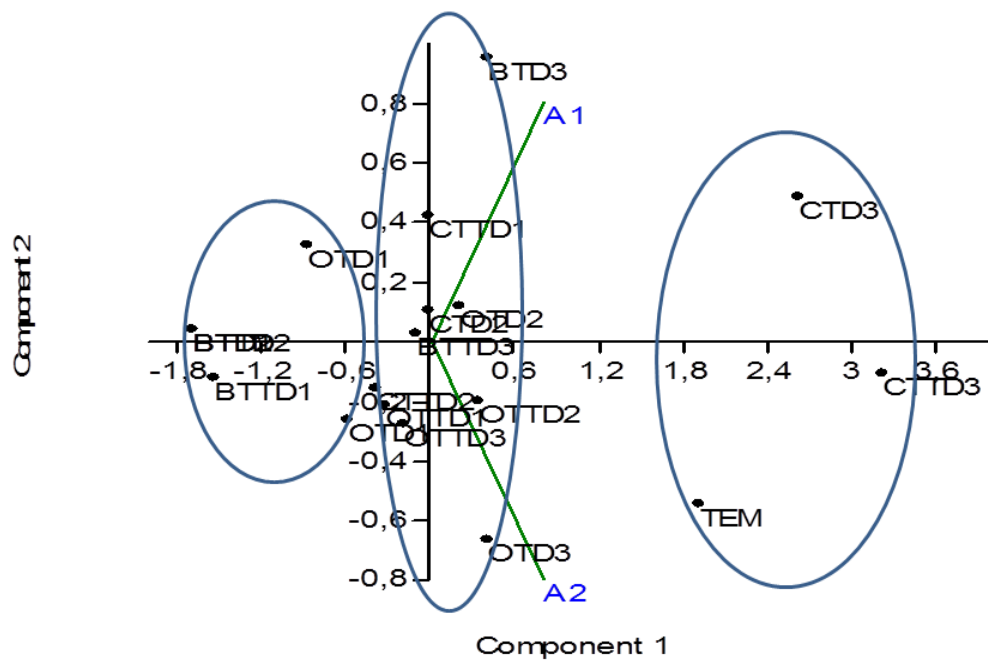


Figure 48 : La corrélation entre le pouvoir pathogène *in vivo* des différents paramètres étudiés par le model Glm.

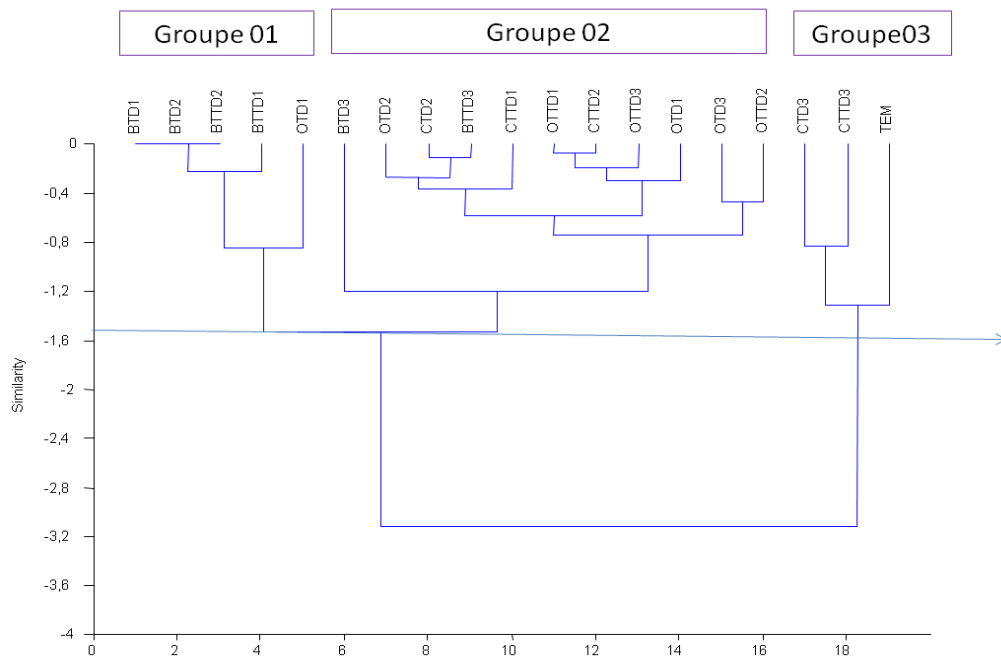


Figure 49 : Classification hiérarchique des différents paramètres en fonction des huiles, des doses, et des souches A1 et A2 *in vivo*.

### Discussion générale :

Ce présent travail a révélé un faible effet antifongique sur deux isolats Algériens de: *Phytophthora infestans* suite à un test *in vitro* et *in vivo* des huiles essentielles de trois espèces de Citrus : *sinensis Cadenera*, *limon Eureka*, et *bergamia Castagnaro*.

Par la technique de contact direct sur un milieu à base de petits pois Agar *in vitro*, un pourcentage d'inhibition rudimentaire, des trois espèces étudiées a été estimé de l'ordre de 20% qui s'est répercuté sur la structure du pathogène par la lyse de son mycélium, son aspect vesiculisé, ainsi que la sporulation limitée. Cela peut être dû à l'effet volatil du milieu où peuvent exister dans une plus faible mesure des principes actifs défavorables à un développement normal de la croissance et de la reproduction de ces champignons.

Cependant, Le pouvoir antifongique des espèces végétales n'est limité à aucune famille ou espèce botanique, ni spécifique à aucun champignon, cette activité n'est pas due aux composés majoritaires mais à une synergie entre les différentes composantes des huiles. Le limonène, principal constituant de l'huile essentielle des oranges, irradié par le soleil, est toxique pour plusieurs champignons pathogènes des fruits : les *Phytophthora parasitica* et *citrophthora* sont les plus sensibles (Alilou *et al.*, 2009). Par ailleurs, les polyméthoxylates flavones des Citrus confèrent une résistance pour le *Phytophthora citrophthora*, *Penicillium digitatum*, (Barta et Hui, 2006).

Il s'est avéré notamment que les citrals présents en fraction considérable dans l'extrait total du jus de fruit de *Citrus medica* étaient responsable de l'inhibition par la méthode de dilution en milieu liquide de: *Candida albicans* et *Trychophytum rubum*, où l'inhibition de l'ordre de 24 à 38mm par des concentrations minimales inhibitrices de 2% à 4% (Kueté *et al.*, 2009). Ce qui traduit, le pourcentage d'inhibition rudimentaire des huiles d'agrumes étudiées sur ce phytoparasite qui peut être lié à leur teneur en Citrals ou en d'autres composés antifongiques présents en faible quantité dans nos huiles essentielles.

Le manque d'activité peut être prouvé par l'extraction de ces composés bioactifs dans un solvant différent de l'eau. L'attention devrait également être prêtée aux interactions possibles entre le solvant et les corps dissous alors que le solvant peut réagir avec certains composés pour produire des complexes ou pour causer la décomposition, la déshydratation ou l'isomérisation de ces composés (Yrjönen, 2004).

Par ailleurs, l'inoculation du champignon et son traitement par les huiles sur les feuilles détachées de pomme de terre de variété *Spunta in vivo* a permis l'expression de légères nécroses, chloroses, accompagnés d'un léger brunissement suite à l'imprégnation des huiles essentielles mais sans l'expression total de la maladie ; cela peut joindre le constat effectué *in vitro* pour parler d'une probable ambiguïté entre la survie et le pouvoir antifongique des agrumes sur ce champignon qui a réduit leur taux d'infection.

Dans ce sens, Le test *in vivo* de l'huile essentielle d'*astericus imbricatus* sur les fruits de clémentine inoculé artificiellement par les spores de *P. digitatum* qui se sont manifesté par les symptômes et non pas une infection à partir du 3<sup>ème</sup> jours de stockage est du à son effet inhibiteur sur ce champignon (Alilou *et al.*, 2009).

Sur les cultures de solanacées, Soro *et all* (2010) ont démontré l'effet inhibiteur *in vitro* et *in vivo* de l'huile essentielle de *Xylopiia Aethiopica* sur le *fusarium oxysporum* champignon parasite des cultures de tomate où les résultats ont révélés une inhibition complète du mycélium *in vitro* avec une meilleure croissance des tiges et feuilles de tomate *in vivo*.

Nos résultats traduits par les pourcentages d'inhibition de la croissance mycélienne ou par le tau d'infection des feuilles, sont comparables à ceux rapportés par de nombreux travaux menés sur des champignons phytopathogènes. Le pouvoir antifongique des huiles essentielles de multiples plantes parmi lesquels les huiles obtenues des agrumes, ont pu démontré l'existence d'un pouvoir antifongique de ces derniers vis-à-vis du *Phytophthora Citrophthora*, Selon Alilou *et al.*,(2009) .

Parallèlement, les résultats ont montré que dans les conditions de laboratoire et dans le cadre d'essais en pots, certains extraits de plantes limitaient les attaques du mildiou de la vigne causé par *Plasmopara viticola* (Kast & Buchenauer, 2002 in Krebs *et al.*,2006). Les meilleurs résultats ont été obtenus avec des extraits de lierre (*Hedera helix*), de bourdaine (*Frangula alnus*), de rhubarbe médicinale (*Rheum palmatum*), de primevère officinale (*Primula veris*) et de saule blanc (*Salix alba*).

Aussi, Eyana (2007) a vérifié les propriétés antifongiques des *Anacardiacee* du Togo, notamment sur le *Phytophthora infestans*. Dans ce cas, différents essais ont déjà mis en évidence l'action de certains extraits végétaux contre les agents pathogènes du mildiou de la pomme de terre (Blaeser 1999; Latten 1994; Neuhoff 2002 in Krebs *et al.*,2006).

L'activité antimicrobienne des huiles essentielles est principalement fonction de leur composition chimique, en particulier leurs composés phénoliques (Yakhlef, 2010). leur valeur tient à l'intégralité des constituants et non seulement à leurs composés majoritaires (Lahlou,

2004). Les molécules antifongiques sont soit fongistatiques, toxiques, et peuvent engendrer des résistances. (Prasad et Kapoor, 2004). On en distingue plusieurs classes: les phénols ou composés phénoliques, les polyènes, les dérivés azotés, les analogues nucléosidiques, les allylamines (Chami, 2005).

Plusieurs études menées sur l'effet antifongique des huiles essentielles ont été réalisées tels l'effet de *Xylopiia Aethiopica* sur *fusarium oxysporum* qui a provoqué une inhibition complète de la croissance mycélienne *in vitro*, ainsi qu'un bon développement des tiges et feuilles de tomate *in vivo* (Soro et all., 2010).

Selon les résultats obtenues au terme de ce modeste travail, l'inefficacité ou le faible effet des huiles essentielles d'agrumes comme bio fongicides contre le mildiou, peut détenir du mode d'extraction où il est probable que l'hydro distillation n'a pas permis l'entraînement d'un principe actif fongicide s'il existe. Il sera donc intéressant de formuler un autre mode d'application des agrumes permettant l'extraction de l'ensemble de leurs molécules pour agir mieux sur ce champignon. De plus, il est impératif de bien conditionner l'huile essentielle, et le végétal sujet de l'extraction.

# Conclusion

## Conclusion

Au terme de ce modeste travail, nous jugeons important de rappeler les résultats obtenus.

Dans un premier temps, l'extraction des huiles essentielles d'agrumes nous a permis de montrer que l'organe utilisé (écorces et feuilles), et le mode d'obtention (hydro distillation et l'Ether de pétrole) avaient une influence quantitative sur le rendement en huile essentielles, ainsi la poudre s'en est révélée nettement plus riche que le végétal en l'état. En outre, les analyses physico-chimiques déterminées selon des méthodes standardisées, ont donné des résultats comparables aux normes AFNOR indiquant la qualité de nos huiles.

Une analyse chromatographique nous a dévoilée une vingtaine d'espèce chimiques dont on a pu déterminer le limonène principal composant des trois huiles, avec en faible concentrations : le géraniol, l'acétate de néryl, l'iso-caryophylène, avec le Citral exceptionnellement identifié dans l'huile essentielle de bergamote.

Dans un second temps, les huiles essentielles d'agrumes agissent différemment sur le champignon mais elles ne l'inhibent pas complètement. Elles ne sont donc pas efficaces comme bio fongicides contre le mildiou, cela peut dépendre du mode d'extraction où il est probable que l'hydro distillation n'a pas permis l'entraînement d'un principe actif avec l'huile qui peut inhiber la croissance de *P.infestans* s'il existe. Il sera intéressant de tester le pouvoir antifongiques des agrumes sous une autre forme que les huiles essentielles voir les extraits aqueux sur *P.infestans*, ou de tester ces huiles essentielles sur d'autres agents pathogènes des agrumes, parasites de quarantaines, et sur d'autres parasites de cultures.

La souche A2 affiche une virulence plus importante que la souche A1 du *Phytophthora infestans* par apport aux témoins, seulement les huiles essentielles d'agrumes lui ont été plus *inhibitrices in vitro* qu'*in vivo*.

L'expression de quelques symptômes accentués *in vivo* voir l'apparition de légères nécroses notamment aux concentrations 1/100 peut être expliqué *in vitro* par la présence de quelques sporanges vivantes ; visibles sous microscope après 7 jours d'incubation.

Cette inefficacité peut toutefois être liée à la conservation des huiles si elle avait fait défaut, sachant que les huiles utilisées avaient été conservés durant 4 mois dans le frigidaire, dans des flacons appropriés et fermés hermétiquement. Les contaminations par *Penicillium* sp. sur milieux contenant les huiles, peut être aussi lié à l'état phytosanitaire ou à la maturité des agrumes qui ont servi à l'extraction, il est donc recommandé de bien choisir le végétal.



# Références bibliographiques

## Références bibliographiques

- **Abouda L., 2007:** Caractérisation physico-chimique de l'huile essentielle d'orange douce (*Citrus sinensis*), thèse d'ingénieur en génie des procédés organiques, université de Blida, Algérie. 47p.
- **AFNOR, 2000:** Huiles essentielles, échantillonnage et méthodes d'analyses, Tome 1, édition Tour Europe, Paris, 159-471p.
- **Ahmad Khan I., 2007:** Citrus genetics, Breeding and biotechnology, CABI North American office, 370p.
- **Ahmed-Serir, B. & Moussaoui, A., 2011 :** Le mildiou de la pomme de terre *Solanum tuberosum* L. en Algérie : Caractérisation culturale et pathogénique de trois isolats Algériens de *Phytophthora infestans* (Mont.) De Bary. Th. Ing.Univ. Saad Dahleb de Blida, Algérie. 47p.
- **Alilou H., Idrissi Hassani L-M., Aghelas F., Chebli B., 2009:** Composition des huiles essentielles et activité antifongique de quelques plantes du Sud Marocain, vol 1, Agadir. 26-47p.
- **Alim, Y., 2010 :** La filière de pomme de terre en Algérie: 12-13p.
- **Amarti F., Sartini B., Ghanmi M., Farah A., Aafi A., Aarab L., El -Ajjouri, M. & Chaouche A., 2010 :** Composition chimique et activité antimicrobienne des huiles essentielles de *Thymus algeriensis* Boiss. and Reut et *Thymus ciliatus* (Desf) Benth. du Maroc, *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* **14** (1), 141-148p.
- **Andrison. & Leberton L., 1997 :** Mildiou de la pomme de terre, ou en sommes-nous après 150 ans ?. *Phytoma* 494 (5). 24-27p.
- **Anton R., Silano V., Patri G., 2002 :** plantes dans les cosmétiques, plantes et préparations à base de plantes, Health and Fitness, Paris. 218p.
- **Arafa A-A., 2005 :** Morphologie des plantes épicées ,université El-mansoura, Egypt.409p.
- **Auzias D., Labourdette J-P., 2009 :** Le Petit Futé Alger, 1ère édition, nouvelles éditions de l'université, Paris . 256p.
- **Baba Aissa F., 1999 :** Encyclopédie des plantes utiles, Flore d'Algérie et du Maghreb, Substances végétales d'Afrique d'Orient et d'Occident, Algérie, 369p. Edition Librairie moderne Rouïba. Alger.368p.

- **Bagamboula C.F., Uyttendaele M. and Debevere J., 2004:** Inhibitory effect of thyme and basil essential oils, carvacrol, thymol, estragol, linalool and p-cymene toward *Shigella sonnei* and *S. flexneri*. *Food. Microbiol.* 21: 33-42p.
- **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 : 4p.
- **Bardeau F., 1976 :** La médecine par les fleurs, Editeur R Laffont, Paris . 335p.
- **Bardin J-M,** 2004: Dictionnaire des plantes médicinales et des médecines douces : Les plantes qui guérissent, Edition de Lodi, Paris. 312p .
- **Bekhechi CH., et Abdelwahid DJ., 2010 :** Les huiles essentielles, Edit 1.04.5145., office des publications universitaires, Alger . 55p.
- **Bendriss. Houari, 2003 :** *BENDRISS Houari thèse de magister en génie chimique ; valorisation des extraits de plantes aromatiques et médicinales de « Ruta chalepensis, et Marrubium vulgare » ; Université Hassiba BEN BOUALI –CHLEF.* 133p
- **Beninal L., 2011 :** Diversité génétique de *Phytophthora infestans* agent du mildiou de la pomme de terre en Algérie. Th. Mag. E.N.S.A El Harrach. : 88p.
- **Bernhards, U. (1998).** La pomme de terre *Solanum tuberosum L.* Monographie. Institut National Agronomique Paris – Grignon.:154p
- **Beylier-Maurel M.F., 1976 :** Activité bactériostatique des matières premières de parfumerie. *Rivista Italiana E.P.P.O.S.* 58:283-286p.
- **Biallo D., Sanogo R., Yasambou H. et autre (2004)** Étude des constituants des feuilles de *Ziziphus mauritiana* Lam. (Rhamnaceae). *C. R. Chimie.* : 1073-1080p.
- **Blaeser, P. & Steiner, U. (1999).** Antifungal activity of plant extracts against potato late blight (*Phytophthora infestans*). *Modern Fungicides and Antifungal Compounds* 11-12th. International Reinhardtsbrunn Symposium, Friedrichrode, Germany, 24-29th May, 1998: 491- 499p.
- **Boukhatem M-N., Hamaidi M-S., Hakim Y., Saidi F., 2010 :** Extraction, composition et propriétés physico-chimiques de l'huile essentielle du Géranium Rosat (*Pelargonium graveolens L.*) cultivé dans la plaine de Mitidja (Algérie). *Nature et technologie*, Blida ; Algérie. 37-38-39p.
- **Boutouchent R. & Bouguettaf I., 2010 :** Evaluation des rendements en huiles essentielles de trois variétés d'orange (Valancia late, Double fine, et Sanguinelli) par

- deux procédés d'extraction. Thèse d'ingénieur d'état en agronomie, université Saad Dahleb de Blida. 71p.
- **Bouzouita, N., Kachouri, F., Ben-Halima, M. & Chaabouni, M.M., 2008 :** Composition chimique et activités antioxydante, antimicrobienne et insecticide de l'huile essentielle de *Juniperus phoenicea*. *J. Soc. Chim. Tunis* **10** : 119-125.
  - **Bruneton J., 1993 :** Pharmacognosie, plantes médicinales, 2<sup>ème</sup> édition :Lavoisier, Paris, 464p.
  - **Bruneton J., 1997 :** Element de phytochimie et de pharmacologie. Edition Lavoisier. Techniques et documentation, Paris, 75p.
  - **Bruneton J., 1999 :** P'harmacologie, phytochimie des plantes medicinales, 3<sup>ème</sup> édition : Lavoisier, Techniques et documentation, 207,208p.
  - **Bruneton J., 2001 :** Plantes toxiques, végétaux dangereux pour l'homme et les animaux, 2<sup>ème</sup> édition : Lavoisier, Tec & Doc, Paris, 460, 462, 463, 464p.
  - **Bruneton, J., 1999 :** Pharmacognosie- Phytochimie-Plantes médicinales. 3<sup>ème</sup> édition. Techniques & documentation :1120p.
  - **Calvet R., 2005 :** Les pesticides dans le sol: conséquences agronomiques et environnementales, Edition France agricole, Paris, 637p.
  - **Chami F., 2005 :** Etude de l'activité antimicrobienne de l'huile essentielle de *Thymus vulgaris* et de ses constituants. Thèse de doctorat d'Etat és Sciences Pharmaceutiques. Montpellier. 126p
  - **Chami F., 2005 :** Evaluation *in vitro* de l'Action Antifongique des Huiles Essentielles d'Origan et de Girofle et de leurs Composés Majoritaires *in vivo* Application dans la Prophylaxie et le Traitement de la Candidose Vaginale sur des Modèles de Rat et de Souris Immunodéprimés, thèse de doctorat d'état en biologie, pharmacologie expérimentale, Université Sidi Mohamed Ben Abdallah,Fès ;126p.
  - **Chamont, S., 2010 :** Le micro-organisme pathogène de la culture description de l'agentpathogène,[http://ephytia.inra.fr/hypp/hypp\\_utilisateur/index\\_appli.php?portail=bioagresseurs&produit=hypp&main=3&ssrub1=7&ssrub2=56&ssrub3=1512&ssrub4=232&id\\_fiche=14&theme=19](http://ephytia.inra.fr/hypp/hypp_utilisateur/index_appli.php?portail=bioagresseurs&produit=hypp&main=3&ssrub1=7&ssrub2=56&ssrub3=1512&ssrub4=232&id_fiche=14&theme=19). Les sporangiophores émergent souvent à travers les stomates.champignon évolue, la lutte aussi. *Perpectives Agricoles* 236:1-20p.
  - **Chemat F., Ferhat M., Meklati B., 2010 :** Citrus d'Algérie Les huiles essentielles et leurs procédés d'extractions, office des publications national, Algérie, 157p.
  - **Christine, D. S., Roberts W. S. & Fry W. E., 2000 :** Molecular Techniques and the mystery of the popato late blight, in *Potato Late Blight Pathogen* : 21-42p.

- **Costa T.R., Fnendes, F., Santos, S.C., Olivera, C.M.A., Liao L.M., Ferri P.H., Paulo J.R., Ferreira H.D., Sales B.H.N.& Silva M.R.R., 2000:** Antifungal activity of volatile constituents of *Eugenia dysenterica* leaf oil. *J. Ethnopharmacol.* 72 (1–2). : 111–117p.
- **Djaidjaa A., 2006 :** influence des procédés d'extraction sur le rendements en huiles essentielles chez les agrumes, mémoire d'ingénieur d'état, institut des sciences agronomiques, Blida, 93p.
- **Djenane D., Sanchez-Escalante, A., Beltran, J.A. & Roncales, P., 2002 :** Ability of alpha-topherol, taurine and rosemary, in combination with vitamine C, to increase the oxidative stability of beef steaks displayed in modified atmosphere. *Food Chemistry*, 407–415p.
- **Douglas A., Skoog., Donald M., West F., et Jams H, 1997 :** Chimie analytique, Edition boeck et Larcier, Bruxelles, 996p.
- **Douglas J.; Garvey M.C.;& Croteau R., 1995:** Terpenoid metabolism, the plant cell 7, USA, 1015-1026p.
- **Dubois, L., 2009 :** Mildiou de la pomme de terre : raisonner ses interventions et choisir le fongicide adapté ; <http://www.syndicat-agricole.com/actualites/vie-pratique-pomme-de-terre-mildiou-de-la-pomme-de-terre-raisonner-ses-interventions-et-choisir-le-fongicide-adapte&fldSearch=:FGEN6FMD.html> consulté le 8/09/2011.
- **Duraffourd C., et Lapraz J.C., 2002 :** Traité de phytothérapie clinique, médecine et endobiogénie, édition Masson, Paris, 827p .
- **El Ajjouri M., Satrani B., Ghanmi M., Aafi A., Farah A., Rahouti M., Amarti F., Aberchane M., 2008 :** Activité antifongique des huiles essentielles de *Thymus capitatus* (L) Hoffm. & Link contre les champignons de pourriture de bois d'œuvre. *Biotechnol Agron. Soc. Env, Fés, Maroc.*: 347- 348p.
- **El-Guili M., Achbani E., Fahad K., Jijakli H., 2009 :** Bio pesticides, alternatives à la lutte chimique : 266-268p.
- **Eyana Kpemessi A., 2007 :** les anacardiaceae du Togo, étude botanique, écologique, et propriétés antifongiques, thèse de doctorat ; université de Reims, Champagne Ardenne. UFR PHARMACIE. 144p
- **Fluck H., 1977 :** Herbes médicinales : petit guide panoramique. Edition delachaux et Niestlé SA, Paris .125p.
- **Gallegly, M. E., & Galindo, J. , 1958:** Mating types and oospores of *Phytophthora infestans* in nature in Mexico. *Phytopathology* 48 :274 277p.
- **Garnero J., 1985 :** Abrégé de phytochimie, Edition Masson, Paris, 217p.

- **Gaucher D., Duvachelle S. & Andrivon D., 1998** :Mildiou de la pomme de terre- le champignon évolue, la lutte aussi. Perspectives agricoles 236 :1-20p.
- **Gisi I.U. & Cohn Y., 1996**: Resistance to phenylamide fungicide; A case study with *Phytophthora infestans*. PhD Thesis, Wageningen Agricultural University, Netherlands.:147p.
- **Greche H. & Hajjaji N., 2000**: Chemical composition and antifungal properties of the essential oil of *Tanacetum annuum*. Journal of essential oil research 12 :122-124.
- **Grison A., 1991** : La germination et les relations entre nombre de germes, nombre de tiges. Revue pomme de terre Française 463(3-4) :57-66p.
- **Grunwald N.J. & Plier, W.G. 2005** : The biology of *Phytophthora infestans* at its center of origin. Annual Review of Phytopathology 43 :171-190p.
- **Haddouchi F. & Benmansour A., 2008** : Huiles essentielles, utilisations et activités biologiques. Applications à deux plantes aromatiques. Les technologies de laboratoires 8 : 23p.
- **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](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.
- **Hampton M.C., 1992**: Some thoughts on demography of the great potato famine. Plant. 76 : 1284-1286p.
- **Harison J.G., 1992**: Effects of the aerial environment on late blight of potato foliage. Plant Pathol. 41 : 384-396p.
- **Harrison J. G. & Lowe, R., 1990**: Effects of humidity and air speed on sporulation of *Phytophthora infestans* on potato leaves. Plant Pathology 38 : 585-591p.
- **Hellal Z., 2011** : Contribution à l'étude des propriétés antibactériennes des huiles essentielles extraites des citrus, Application sur la sardine ; *Sardina pilchardus* ; thèse de magister en biochimie appliquée et biotechnologie ; université de Tizi-Ouzou, Algérie. 78p.
- **Hmiri S., Rahouti M., Habib Z., Satrani B., Ghanmi M., El-Ajjouri M., 2011**: Evaluation du potentiel antifongique des huiles essentielles de *Mentha pulegium* et d'*Eucalyptus camaldulensis* dans la lutte biologique contre les champignons

- responsables de la deterioration des pommes en conservation. Bulletin de la Société Royale des Sciences de Liège, Vol. 80, p.824 - 836
- **Hulin V., Mathot A., Mafart P. and Dufossé L., 1998 :** Les propriétés antimicrobiennes des huiles essentielles et composés d'arômes. Sci. Aliments 18: 563-582p.
  - **Imache A., Bouarfa S., Hartani T., 2010 :** La Mitidja 20 Ans Apres Realites Agricoles Aux Portes D'Alger, Edition Quae, Versailles cedex, France . 283p.
  - **Inouye S., Tsuruoka T., Uchida K. and Yamaguchi H., 2001:** Effect of Sealing and Tween on the Antifungal Suceptibility Testing of Essential Oils. Microbiol. Immunol. 45(3): 201-208p.
  - **Jacquemond C., Agostini D., et Curk F, 2009 :** Des agrumes pour CEVITAL (Algerie), BIHA. Bureau d'ingénierie en horticulture et agro-industrie, Alger, 101p.
  - **Jamoussi B., 1955 :** Les maladies de dépérissement des agrumes, Tome 1, Paris, 44p.
  - **Janssen A.M., Scheffer J.J.C. and Baerheim Svendsen A., 1987:** Antimicrobial activity of essential oils: a 1976–86 literature review. Aspects of the test methods. Planta. Med. 53: 395-398p.
  - **Krause R.A., Massie L.B. & Hyde R.A., 1975:** Blitecast, a computerized forecast of potato late blight. Plant Disease 59 :95 – 98p.
  - **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.
  - **Kuepper G. & Sullivan P., 2001:** Organic Alternatives for Late Blight Control in Potatoes. Note sur les techniques de maîtrise de ravageurs de programme de transfert technologique vers les régions rurales (Appropriate Technology Transfer for Rural Areas, ATTRA).
  - **Kuete V., Simo I-K., Nagameni B., 2009 :** Antibacterial and antifungal activities of the crude extract and compounds from *Dorstenia turbinata* (Moraceae) . South Africai J botany. 75 : 256-261p.
  - **Lafont R., 2005 :** Methodes physiques de séparation et d'analyse et methodes de dosage des biomolecules, université Pierre et Marie Curie, [www.snv.jussieu.fr/bmedia/lafont/index.html](http://www.snv.jussieu.fr/bmedia/lafont/index.html). consulté le 16 Novembre 2010 à 21h00.
  - **Lahlou M., 2004:** Methods to study phytochemistry and bioactivity of essential oil. Phytotherapy Research 18 : 435-448p.

- **Lattaoui N., 1989** : Pouvoir antimicrobien des huiles essentielles de 3 espèces de Thym à Profils chimiques différents ; Thèse de 3ème cycle, option Microbiologie, E.N.S Takadoum Rabat. 126p
- **Latten J., 1994**: Biologische Bekämpfung phytopathogener Pilze mit Hilfe von Pflanzenextrakten, Justus Liebig University, PhD thesis : 121p.
- **Lee K.H., Huang E.S., Pagana J.S. and Geissman T.A., 1971** : Cytotoxicity of sesquiterpenes lactones. Cancer. Res. 31: 1649-1654p.
- **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](mailto:srvp.DRAF-HAUTE-NORMANDIE@agriculture.gouv.fr) consulté le 10/05/2011.
- **Linden G., Lorient D., 1994** : Biochimie agro-indusrielle. Ed. Masson, Paris. 360 p.
- **Lota M-L., Rocca S., Jacquemond C., Tomi F., 2002**: Volatile components of of peel and leaf oils of limon and lime species, Journal of agriculture and food chemistry, (4) 50: 796-805p.
- **Loussert R., 1989** : Les agrumes, volume 2, production, Edit. Lavoisier, Paris, 157p.
- **Loussert R., 1989** : Les agrumes 1, Arboriculture, Edit. Lavoisier, Paris . 113p.
- **Luttge V., Kluge M., Bauer G., 2002** : Botanique, traité fondamental, Edit Lavoisier, Paris 85, 463p .
- **Maaro , E.B., 2010** : Stratégies de lutte 2010 contre le mildiou de la pomme de terre. <http://www.omafra.gov.on.ca/french/crops/facts/2010-late-blight.htm>.consulté le:04/05/2011.
- **Madjene A. & Madani F., 2010** : **Contribution à la mise en évidence de L'effet anti-inflammatoire et analgésique de l'huile essentielle des feuilles et du péricarpe du fruit du citron.** Thèse d'ingénieur en biotechnologie végétale, université de Blida, Algérie . 39p.
- **Mahanta J.J., Chutia M., Bordoi M., Adhikary R.K., Pathak M.G., & Sarma T.C., 2007** : *Cymbopogon citratus* L. essential oil as a potential antifungal agent against key weed moulds of *Pleurotus* spp. Spawns. Flavour and Fragrance Journal 22 : 525-530p.
- **Mailhebiau P., 1994** : La nouvelle aromathérapie, caractérologie des essences et tempéraments humains, 2ème édition Jakin, Paris. 635p.



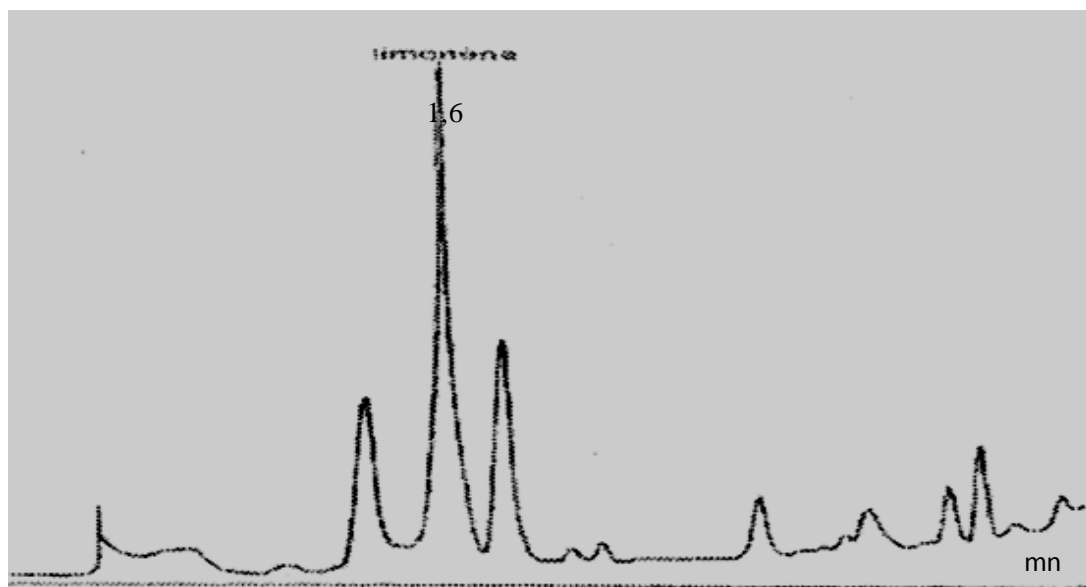
- **Malecky M., 2008** : Métabolisme des terpenoides chez les caprins, thèse de doctorat en Physiologie de la Nutrition Animale (biotechnologie) ; école doctorale ABIES. France.171p
- **Martini et Seiller, 1999** : Actifs et additifs ; Edition Lavoisier, technique et documentation, Paris . 244p.
- **Ménage G., 1750** : Dictionnaire étymologique de la langue Française, Tome premier, nouvelle édition, Paris . 732p.
- **Meziane D., 1991** : Histoire de la pomme de terre. Diététique (25) : 29p.
- **Milpied H., 2009** : Progrès en dermato-allergologie, Edit GERDA, Bordeaux, 392p.
- **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.
- **Montarry J., 2008** : Réponse adaptative des populations de *Phytophthora infestans*, agent du mildiou de la pomme de terre, au déploiement en culture de son hôte *Solanum tuberosum* . mystery of the potato late blight, in Potato Late Blight Pathogen : 21-42p.
- **Moulai Y., 2010** : Contribution à l'étude du mildiou de la pomme de terre dans la région de Bouira et essai de comportement de quelques variétés à l'égard de *Phytophthora infestans*. Mem. 'Ing. En Agronomie.E.N.S.A. El Harrach :79p.
- **Moulai, Y., 2010** : Contribution à l'étude du mildiou de la pomme de terre dans la région de Bouira et essai de comportement de quelques variétés à l'égard de *Phytophthora infestans*. Mem. 'Ing. En Agronomie.E.N.S.A. El Harrach :79p.
- **Munoz-Mingarro D., Acero N., Linares F., Pozuelo J.M., Galande A., & Mera Incenten J.A., 2003** : Biological activity of extracts from *Catalpa bignonioides* Walt. (Bignoniaceae). J. Ethnopharmacol.: 163-167p.
- **Negi P.S., Chauchan A.S., Sadla G.A., Rohinsheree Y.S. & Ramteke R.S., 2005:** Antioxidant and antibacterial activities of various seabuckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) seed extracts. Food Chem 92.: 119–124p.
- **Ngamo L.S.T., & Hance T.H., 2007** : Diversité des ravageurs des denrées et méthodes alternatives de lutte en milieu tropical. Tropiculteur 25 (4) : 46p.
- **Niederhaussen J.S., 1991:** *Phytophthora infestans*: the Mexican connection. In : lucas, J.A.,Shattok,R.C.,Shaw,D.S.,Cook,L.R., eds. *Phytophthora*, Cambridge university press, U.K: 25-45p.

- **Odoul M., 2003** : Les huiles essentielles, La lettre de l'institut Français (Dis moi où tu as mal, Je te dirai pourquoi), Shiatsu 2, Paris, 218p.
- **Paitier, G. , 1980** : Le mildiou de la pomme de terre. Phytoma (4) : 23-27p.
- **Pandey D.K, Tripathi N.N., Tripathi R.D., & Dixit S.N., 1982** : Fungitoxic and phytotoxic properties of the essential oil of *Caesulia axillaris Roxb.* (Compositae). Angerwandte Botanik 56 : 256-257p.
- **Peter H., Raven, Ray F., Evert, Susen E., 2003** : Biologie végétale, Edition De Boeck, Paris, 968p.
- **Philippeau G., 1989** : Comment interpréter les résultats d'analyse en composantes principales (ACP). Institut Technique des Céréales et Fourrages (ITCF), Paris. 195p
- **Poiteau A., Risso A., 1822** : Histoire naturelle des orangers, Edition Audot., Libraire., Editeur de l'herbier de l'amateur, Paris, 286p.
- **Polèse J-M., 2005** : La culture des agrumes, édition Artémis, Paris, 93p.
- **Polèse J-M., 2006** : La culture de pomme de terre, Edition édition Artémis, Paris 95p.
- **Polèse J-M., 2008** : La culture des agrumes, 2ème édition Artémis, Paris, 93p.
- **Praloran J-C., 1971** : les agrumes. GP, Edit, Maisonneuve et Larose, Paris, 565p.
- **Prasad R., Kapoor K., 2004**: Multidrug resistance in yeast *Candida*. Int. Rev. Cytol. 242: 215-248p.
- **Radtke, W. & Rieckman, W., 1991** : **Maladies et ravageurs de la pomme de terre.**in Gelsenkirchen-Buer, Editions Th. Mann, 1991. Un album in-4, cartonnage éditeur, : 168p.
- **Rayan, A., 2011** : La production de pommes de terre en Algérie en 2010 ; [http://www.algerie-dz.com/article\\_19137.html](http://www.algerie-dz.com/article_19137.html) consulté le 12/06/2011
- **Remmal A., 1994** : 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
- **Richard et Multon, 1992 la fabrication des extraits : extraction par le dioxyde de carbone,** in **Epices et Aromates, Tech et Doc, Lavoisier, Paris, 193-153pp**
- **Rohner, A., 2002**: Genetic characterisation of early-seasonal isolates of *Phytophthora infestans* from Switzerland. Master Th. : 50p.
- **Rok G., 2002** : Botanique et horticulture dans les jardins du Québec, 131p.
- **Rousselle, P., Robert,Y. & Grosnier,J.C., 1996.** La pomme de terre, amélioration,ennemis, maladie et utilisation. I.N.R.A. Paris : 607p.

- **Roux D., Cartier O., 2007** : Cahier du préparateur en pharmacie, botanique, pharmacognosie, et phytothérapie, Tome 3, Edit Wolters Kluwer, Paris, 141p.
- **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 Dhlab de Blida, Algérie. 63p.
- **Sallé J., 1991** : les huiles essentielles. Edition Frison-Roche. Paris, 166p.
- **Smoot, J., Gough, F. J., Lamey, H. A., Eichinmuller, J. J. & Gallegly, M. E., 1958**: Production and germination of oospores of *Phytophthora infestans*. *Phytopathology* 48 :165-171.
- **Soltner , D., 1988**: Les grandes productions végétales. Collection Scientifique des Technologies Agricoles. 16ème édition : 494p.
- **Soro S., Ouatara D., Zirihi G-N., Kanko C., Ake S., 2010** : Effet inhibiteur *in vitro* et *in vivo* de l'extrait de poudre de l'huile essentielle de *Xylopiya Aethiopica* (Dunal) sur *Fusarium oxysporum* f. sp *Radiciis lycopersici*, champignon parasite des cultures de tomate. Européen Journal of Scientific Research. 39, 279-288p.
- **Strand L., 2006** : Integrated pest management for potatoes in the western united states, 2<sup>nd</sup> edition, university of California, Agriculture and natural resources, 106p.
- **Sturz, A.V., Lynch, D. & Watts, S.W., 2003**: The community composition and antibiosis ability of potato phylloplane bacteria against potato late blight following foliar treatments with either JF Compost Tea, ASL Powdered Kelp or Manzate®75DF foliar treatments. 74p
- **Thurston, H. D. & Schultz, O. ,1981**. Late blight in compendium of potato disease. Hooker Eds. APS Press Michigan (USA): 40-42p.
- **Tranchant J., 1983**: Manuel pratique de chromatographie en phase gazeuse, Edition Masson, Paris, France, 413p.
- **Valnet J., 1982** : Traitement des maladies par les légumes, les fruits et les céréales, 8ème édition, Editeur Maloine, Paris.: 275, 350, 351, 352,353p.
- **Valnet J., 2000** : Traitement des maladies par les légumes, les fruits et les céréales, 8ème édition, Editeur Maloine, Paris.e : 270,271, 273p.

- **Valnet J., Duraffourd C.H., Duraffourd P. et Cilapraz J., 1978 :** L'aromatogramme:nouveaux résultats et essais d'interprétation sur 268 cas cliniques. Plant. Med. Phytother. 1: 43-52.1992p.
- **Van Ee S., 2005 :** La culture fruitière dans les zones tropicales, Wageningen, Pays-Bas. 3ème édition, 96p.
- **Vierling E., 2008 :** Aliments et boissons, technologies et aspect réglementaires, Doin editeurs, 3èmes édition, France, 203p.
- **Woheoudama S., 2009 :** Etude synergique du couplage du Système Lactoperoxydase avec d'autres molécules naturelles actives ayant des propriétés antifongiques pour l'amélioration de la conservation en frais des bananes, thèse de doctorat en science agronomiques ; option :*Sciences des Procédés-Sciences des Aliments*, Montpellier. 151p
- **Woodham-Smith, C., 1962:** The Great Hunger, Ireland 1845-1849. Penguin Ltd., London. 528p
- **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.
- **Yuredon., 2004 :** La filière plante, extraits, huiles essentielles, l'échiquier des années 30, Edition Octaédre, conseil Toulouse, 10p.

# Annexes

**Annexe 01 : Chromatogramme de l'étalon (limonène pure)****Annexe 02 : Composition du milieu petits pois Agar.**

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

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

**Annexe 03: la moyenne de la croissance en mm du champignon traité par les huiles et des témoins des deux isolats .**

L'H.E	souche	Pure	1/10	1/100	Témoins
Orange	A1 (mm)	7	7,5	7,75	9,75
	A2 (mm)	10	10,25	10,5	15,5
Citron	A1 (mm)	10	8,25	8,75	9,75
	A2 (mm)	10	11	11,75	15,5
Bergamote	A1 (mm)	5	7	8	9,75
	A2 (mm)	9,75	15	15,1	15,5

**Annexe 04 : Moyennes des pourcentages d'inhibition de la croissance et de la manifestation des symptômes *in vitro* et *in vivo* de *P.infestans*.**

		A1 (%)			A2 (%)		
Souches	L'huile	pure	1/10	1/100	pure	1/10	1/100
<b>In vitro</b>	<b>Orange</b>	18,23	14,56	12,72	23,21	21,86	17,26
	<b>Citron</b>	-2,82	10,03	5,38	19,96	15,37	12,94
	<b>Bergamote</b>	29,96	17,24	11,87	19,68	1,89	1,02
<b>In vivo</b>	<b>Orange</b>	7	12,5	8,75	5	17	26
	<b>Citron</b>	5	17	26	5	11	30
	<b>Bergamote</b>	5	11	30	13	15	36